

Monograf

# SISTEMATIKA POLIFASIK

Untuk Deteksi Keanekaragaman  
Genetik *Salmonella typhi*

Monograf

# **SISTEMATIKA POLIFASIK**

Untuk Deteksi Keanekaragaman  
Genetik *Salmonella typhi*



Dr. Sri Darmawati, M.Si.



Monograf

# SISTEMATIKA POLIFASIK

Untuk Deteksi Keanekaragaman  
Genetik *Salmonella typhi*

# **MONOGRAF: SISTEMATIKA POLIFASIK** untuk Deteksi Keanekaragaman Genetik *Salmonella typhi*

**Sri Darmawati**

Editor: Dr. Niken Satuti Nur Handayani, M.Sc.

Proofreader: Nur Hidayah

Desain Cover: Gringgo

Layout: Imamah

Penerbit:

**AR-RUZZ MEDIA**

Jl. Anggrek 126 Sambilegi, Maguwoharjo, Depok, Sleman  
Yogyakarta, 55282

Telp./Fax.: (0274) 488132

E-mail: arruzzwacana@yahoo.com

ISBN: 978-602-313-491-5

Cetakan I, 2019

Didistribusikan oleh:

**AR-RUZZ MEDIA**

Telp./Fax.: (0274) 4332044

E-mail: marketingarruzz@yahoo.co.id

Perwakilan:

Jakarta: Telp./Fax.: (021) 7816218

Malang: Telp./Fax.: (0341) 560988

*Perpustakaan Nasional: Katalog Dalam Terbitan (KTD)*

Darmawati, Sri

Monograf: Sistematika Polifasik untuk Deteksi Keanekaragaman Genetik *Salmonella typhi* / Sri

Darmawati- Yogyakarta: Ar-Ruzz Media, 2019

viii + 88 hal., 14,8 cm × 21 cm

ISBN: 978-602-313-491-5

1. Biologi

I. Judul

II. Sri Darmawati

## KATA PENGANTAR

**K**arakter morfologi sel dan morfologi koloni pada media padat, yang tampak sama dari isolat *Salmonella typhi* yang berbeda asal, ternyata belum tentu memiliki karakter biokimiawi yang semuanya sama pula. Isolat *S. typhi* yang berasal dari individu yang sama pun kadang menunjukkan adanya perbedaan pola sensitivitas terhadap antibiotik. Hal tersebut telah menunjukkan adanya variasi genetik antar-isolat. Di Indonesia dijumpai *S. typhi* dengan flagella yang dikode oleh gen dengan ukuran 1.512 bp, tetapi dijumpai pula *S. typhi* yang spesifik hanya terdapat di Indonesia dengan gen flagel yang ukurannya 1.262 bp. Demikian pula adanya variasi profil protein pilli yang dimiliki oleh isolat *S. typhi* yang berasal dari beragam daerah di Indonesia. Hal ini semakin menunjang adanya keanekaragaman genetik *S. typhi*.

Perbedaan karakter, baik yang tampak maupun yang tidak tampak langsung, menunjukkan adanya keanekaragaman genetik. Karakterisasi morfologi telah banyak dilakukan untuk identifikasi jenis bakteri, karena mudah, sederhana, dan biayanya murah. Perkembangan teknologi molekuler mendorong adanya perubahan dalam dunia identifikasi bakteri, yang dapat dilakukan berdasarkan

sistematika fenotipik, ataupun dengan sistematika molekuler, seperti dengan sekuens gen 16S rRNA, serta berdasarkan sistematika kimiawi (berdasarkan profil total protein terlarut bakteri).

Monograf *Sistematika Polifasik untuk Deteksi Keanekaragaman Genetik Salmonella typhi* ini berisi tentang teori, konsep, cara kerja praktis di laboratorium, dan hasil-hasil penelitian yang berhubungan dengan identifikasi *S. typhi* dari berbagai isolat, baik identifikasi berdasarkan karakter morfologi maupun secara molekuler (berdasarkan profil total protein terlarut ataupun berdasarkan sekuens gen 16S rRNA). Metode sistematika polifasik, yaitu metode yang mengintegrasikan antara sistematika berdasarkan fenotipik dan molekuler. Identifikasi secara molekuler di Indonesia belum banyak digunakan sehingga dengan monograf yang berisi tentang keanekaragaman karakter bakteri *S. typhi*, peran penting *S. typhi* dalam dunia kesehatan sebagai penyebab penyakit demam tifoid dan bagaimana metode deteksi keanekaragaman genetik *S. typhi* berdasarkan sistematika polifasik, kemudian dapat digunakan untuk menentukan jenis antibiotik yang tepat bagi pasien.

Ucapan terima kasih disampaikan kepada para mahasiswa alumni D-3 dan D-4 Teknologi Laboratorium Medik Universitas Muhammadiyah Semarang yang telah berkontribusi dalam penelitian tentang *S. typhi*. Dunia ilmu pengetahuan akan selalu berkembang. Dengan ditemukannya metode baru dan peralatan penelitian yang lebih canggih, diharapkan saran yang membangun untuk kesempurnaan monograf ini.

Semarang, Oktober 2018

Penulis

# DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Permasalahan.....	3
C. Tujuan.....	4
D. Metode Pemecahan Masalah.....	5
BAB 2 ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN SISTEMATIKA FENOTIPIK <i>Salmonella typhi</i> .....	7
A. Isolasi Bakteri <i>Salmonella typhi</i> .....	7
B. Identifikasi <i>Salmonella typhi</i> .....	10
C. Sistematika Fenotipik.....	19
BAB 3 SDS-PAGE ELEKTROFORESIS DAN SISTEMATIKA KIMIAWI <i>Salmonella typhi</i> .....	25
A. Metode SDS-PAGE Elektroforesis .....	25
B. Cara Isolasi Total Protein Terlarut Sel Bakteri....	27
C. Mengukur Konsentrasi Protein dan Penyimpanannya .....	28

D. Elektroforesis Protein Menggunakan Metode SDS-PAGE .....	30
E. Sistematika Kimiawi <i>Salmonella typhi</i> .....	33
BAB 4 ISOLASI DNA GENOM BAKTERI .....	37
A. Prinsip Isolasi DNA.....	37
B. Cara Isolasi DNA Genom Bakteri Gram-Negatif	38
C. Cara Kerja Mengukur Konsentrasi DNA .....	40
D. Cara Kerja Elektroforesis Gel Agarose .....	40
BAB 5 <i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i> , KLONING, DAN SEKUENSING GEN 16 SrRNA .....	43
A. Prinsip Dasar PCR .....	43
B. Komponen PCR dan Program Amplifikasi Gen 16S rRNA.....	44
C. Kloning Gen 16S rRNA .....	46
D. Sekuensing Gen 16S rRNA .....	50
BAB 6 KEANEKARAGAMAN GENETIK <i>Salmonella typhi</i> .....	53
1. Sistematika Molekuler Bakteri Batang Gram-negatif Anggota Familia <i>Enterobacteriaceae</i> Berdasarkan Sekuens Gen 16SrRNA.....	59
2. Profil Sensitivitas Bakteri Batang Gram-negatif Anggota Familia <i>Enterobacteriaceae</i> terhadap Antibiotik .....	65
PENUTUP.....	71
DAFTAR PUSTAKA.....	73
GLOSARIUM.....	79
INDEKS.....	85

## A. LATAR BELAKANG

*Salmonella typhi* adalah bakteri berbentuk batang, soliter, bergerak karena memiliki flagel (tipe peritrik, yaitu terdapat di seluruh permukaan sel), bersifat Gram-negatif, bakteri intraseluler, termasuk dalam familia *Enterobacteriaceae*, penyebab demam tifoid dan gastroenteritis pada manusia, dengan gejala klinis tidak spesifik dari ringan sampai berat (Valdez dkk., 2009; Fadeel dkk., 2011). Bakteri *S. typhi* dan *S. paratyphi* menyebabkan demam tifoid dan demam paratifoid, yaitu penyakit infeksi sistemik dengan gejala panas, dapat menyebabkan terjadinya perforasi pada usus yang diikuti perdarahan, pembesaran nodus limpatikus, kelenjar limfa (*spleen*), dan hati. Masuknya *S. typhi* ke dalam tubuh manusia terjadi melalui *ingesti* (makanan dan minuman) yang terkontaminasi oleh feses penderita pengidap demam tifoid (Valdez dkk., 2009).

Keberhasilan terjadinya infeksi oleh *Salmonella* disebabkan oleh ekspresi sejumlah gen yang mengode faktor virulensi. Patogenitasnya dengan daya invasi, yaitu dengan kemampuannya masuk ke dalam jaringan *host*, kemudian multiplikasi (memperbanyak diri) dan menyebar ke seluruh tubuh bersama peredaran darah,

sampai pada hati, sumsum tulang, limfa, kandung empedu, dan *Peyer's patch*. Demam tifoid terjadi pada komunitas dengan tingkat higiene dan sanitasi sangat kurang (Darmawati dkk., 2011). *Strain* bakteri anggota *S. typhi* dapat dikelompokkan berdasarkan perbedaan karakter fisiologis, menurut serotipe antigen, yaitu O, Vi, dan H, serta berdasarkan biovar, yaitu kemampuannya untuk memfermentasikan xilosa. Menurut Quintaes dkk. (2002) bahwa berdasarkan kemampuan *strain* memfermentasi D-Xilosa dan L-Arabinosa, terdapat dua biotipe, yaitu biotipe I adalah *strain* yang mampu memfermentasi D-Xilosa, tetapi tidak memfermentasikan L-Arabinosa, dan biotipe III adalah *strain* yang mampu memfermentasikan keduanya.

Keanekaragaman *strain* bakteri anggota *S. typhi*, baik keanekaragaman serotipenya, kemampuan dalam memfermentasikan xilosa dan resistansinya terhadap antibiotik, menunjukkan adanya keanekaragaman genetik *S. typhi* yang berkaitan dengan variasi gen atau genom yang dimiliki oleh setiap individu anggota spesies, yaitu *strain* (Darmawati dan Anwar, 2008). Keanekaragaman genetik *S. typhi* dapat dideteksi menggunakan metode sistematika polifasik. Metode sistematika polifasik merupakan sistematika modern yang mengintegrasikan data fenotipik dan genotipik yang terdiri atas: 1) sistematika numerik-fenetik, 2) sistematika kimiawi, dan 3) sistematika molekuler yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme secara akurat (Vandamme dkk., 1996 *cit.* Sembiring, 2004). Metode tersebut dapat dimanfaatkan untuk mengungkap keanekaragaman genetik mikrobial dengan menempatkan mikrobial

secara logis dalam suatu sistem berdasarkan hubungan similaritas maupun hubungan filogenetis antarsesama mikrobia (Atlas, 1977).

## **B. PERMASALAHAN**

Diagnosis demam tifoid yang banyak digunakan di laboratorium klinik, puskesmas, dan rumah sakit di Indonesia sampai saat ini adalah dengan uji Widal, yaitu uji serologi yang prinsipnya reaksi aglutinasi antara antigen O atau aglutinogen O yang tersusun dari LPS (lipopolisakarida) dan aglutinogen H atau antigen flagel H yang ada pada reagen dan aglutinin O serta aglutinin H yang ada pada serum darah penderita.

Uji Widal banyak digunakan karena mudah, cepat, dan murah, serta tidak banyak membutuhkan peralatan, dan hasilnya sangat bervariasi dan tidak spesifik karena terjadinya reaksi silang. Uji serologi yang lain, seperti Tubex® TF, ELISA, dan Typhidot juga menunjukkan hasil yang tidak spesifik. Ketidakspesifikan hasil uji serologi tersebut karena adanya kesamaan epitop yang dimiliki oleh bakteri batang Gram-negatif yang lain.

Epitop adalah bagian dari antigen yang dapat menimbulkan terjadinya respons imun dan dapat bereaksi dengan produk respons imun. Diagnosis klinis yang tidak spesifik untuk penderita demam tifoid serta uji serologi yang juga tidak spesifik dapat menyebabkan pemberian antibiotik yang tidak tepat, yang dapat menimbulkan terjadinya *strain* bakteri yang *multidrug resistance* (MDR).

Seseorang dapat terinfeksi oleh *strain S. typhi* yang karakter sensitivitasnya berbeda terhadap antibiotik, yang menggambarkan perbedaan profil plasmid, demikian pula perbedaan serotipe maupun

biotipenya. Perbedaan karakter fenotipik tersebut antara lain terjadi karena perbedaan enzim yang dimiliki oleh bakteri, sedangkan enzim adalah protein. Perbedaan profil protein dari *strain S. typhi* merupakan ekspresi dari perbedaan gen yang ada. Keanekaragaman *strain S. typhi* dapat pula dilihat dari hasil klasifikasi molekuler berdasarkan sekuens gen 16S rRNA.

Berdasarkan uraian tersebut, permasalahan yang perlu dipecahkan adalah apakah keanekaragaman genetik *S. typhi* dapat dianalisis menggunakan sistematika polifasik? Tahapan kerja untuk pemecahan permasalahan dengan melakukan analisis keanekaragaman genetik *S. typhi* berdasarkan sistematika polifasik, yaitu:

1. isolasi dan karakterisasi fenotipik *S. typhi* dari sampel darah,
2. isolasi total protein sel bakteri dan SDS-PAGE,
3. isolasi DNA genom bakteri dan elektroforesis agarose,
4. PCR gen 16S rRNA,
5. kloning gen 16S rRNA,
6. sekuensing gen 16S rRNA, dan
7. sistematika polifasik untuk deteksi keanekaragaman genetik *S. typhi*.

### **C. TUJUAN**

Tulisan ini bertujuan untuk: 1) memberikan pemahaman tentang keanekaragaman *S. typhi* yang dapat diungkap menggunakan metode sistematika polifasik, yaitu metode yang mengintegrasikan antara sistematika berdasarkan fenotipik dan molekuler; 2) untuk pengenalan teknik-teknik biologi molekuler seperti SDS-PAGE,

PCR, kloning gen 16S rRNA, dan identifikasi *S. typhi* menggunakan sekuens gen 16S rRNA.

Diharapkan tulisan ini dapat membuka wawasan para mahasiswa, ahli mikrobiologi, dosen, dan peneliti bahwa adanya keanekaragaman genetik *S. typhi* atau *strain* bakteri yang lain dapat diketahui dengan sistematika polifasik. Selain itu juga dapat menjadi bahan tambahan untuk referensi bagi mahasiswa dan dosen, khususnya pada mata kuliah Bakteriologi Klinik dan bahan pengayaan mata kuliah Biologi Molekuler.

#### **D. METODE PEMECAHAN MASALAH**

Pemecahan permasalahan dilakukan dengan metode sebagai berikut.

1. Isolasi, identifikasi *S. typhi*, dan karakterisasi fenotipik
2. Isolasi total protein sel bakteri, isolasi protein flagelin, dan SDS-PAGE
3. Isolasi DNA genom bakteri.
4. Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR.
5. Kloning gen 16S rRNA dan sekuensing.
6. Analisis keanekaragaman genetik *S. typhi*.



# 2

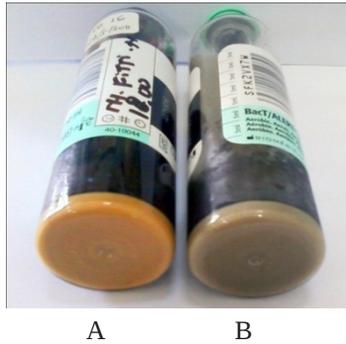
## BAB

# ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN SISTEMATIKA FENOTIPIK *Salmonella typhi*

## A. ISOLASI BAKTERI *Salmonella typhi*

Isolasi bakteri *S. typhi* dapat dilakukan dari sampel darah, urine, feses, sumsum tulang belakang, air, makanan, dan minuman. Keberhasilan isolasi bakteri *S. typhi* dari sampel darah sangat bergantung pada: 1) waktu pengambilan sampel pada pasien (waktu inkubasi, yaitu waktu timbul gejala sakit sampai waktu pengambilan sampel darah), waktu yang tepat adalah minggu pertama-kedua dari timbulnya gejala sakit; 2) volume darah, untuk orang dewasa minimum 5 ml, sedangkan untuk anak-anak 3 ml; 3) konsumsi antibiotik, apabila pasien telah menerima terapi antibiotik akan memengaruhi keberhasilan kultur darah.

Isolasi bakteri *S. typhi* dari kultur darah dilakukan dengan **tahapan kultur darah** pada media penyubur, yaitu Oxgall, kemudian diinkubasi 24–48 jam, lalu dilakukan subkultur, yaitu ditanam pada media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) atau Mac-Conkey (MC). Apabila pasien telah mengonsumsi antibiotik, keberhasilan kultur darah sangat kecil. Oleh karena itu, bisa dilakukan kultur pada media yang dapat menetralkan antibiotik, seperti BacT/Alert FAN *blood culture bottles* (Bio Merieux Inc.) (Gambar 1).



**Gambar 1.** Media kultur BacT/Alert FAN: (A) kultur positif, (B) kultur negatif

Medium ini mengandung 22 ml media campuran (kasein 2%; BHI padat 0,1%; natrium polianetolesulfonat 0,05%; piridoksin HCl 0,001%; menadion 0,0000725%; hemin 0,000725%; L-sistein 0,03%; kompleks asam amino dan karbohidrat) dalam akuades serta 8 ml suspensi *charcoal* (BioMerieux). Medium ini dapat memacu pertumbuhan bakteri yang terdapat pada darah dan dapat meningkatkan kemampuan deteksi bakteremia, terutama pada pasien yang telah menerima terapi antimikrobia. Suspensi *charcoal* akan mengikat dan menetralkan macam-macam antimikrobia, baik antibakteri maupun antijamur (McDonald dkk., 1996; Jorgensen dkk., 1997; McDonald dkk., 2001; Bourbeau dan Pohlman, 2001; Towns dkk., 2010).

**Tahap isolasi/subculture.** Setelah dilakukan kultur pada medium SSA atau MC, kemudian dilakukan pengamatan morfologi koloni pada setiap lima koloni terpilih yang meliputi warna koloni,

bentuk, diameter, tepi, elevasi, konsistensi, dan sifat berdasarkan kemampuannya untuk memfermentasikan laktosa (Gambar 2).



**Gambar 2.** Morfologi koloni *Salmonella typhi* pada media MC

Ciri-ciri morfologi koloni *S. typhi* pada media MC adalah: 1) warna koloni transparan karena bakteri tidak menghasilkan enzim beta-galaktosidase yang mampu menghidrolisis laktosa pada bagian ikatan beta-galaktosidase menjadi glukosa dan galaktosa sehingga *S. typhi* termasuk bakteri yang tidak memfermentasikan laktosa menjadi asam yang sering disebut bersifat *non-lactose fermenter* (NLF); 2) bentuknya bulat; 3) diameter 2 mm; 4) tepi rata; 5) elevasi cembung; dan 6) konsistensi halus.

*S. typhi* pada media SSA sering membentuk koloni bulat dengan endapan hitam di tengah yang kemudian disebut sebagai koloni *black center*. Endapan hitam tersebut merupakan senyawa FeS yang terbentuk karena bakteri menghidrolisis asam amino yang mengandung gugus S (sistein dan metionin).

Koloni bakteri terpilih kemudian diisolasi secara bertingkat beberapa kali sampai diperoleh kultur murni. Koloni bakteri dicat dengan metode pengecatan Gram dan ditanam pada medium BHI

agar miring serta BHI agar tegak untuk disimpan pada suhu 4°C sebagai stok.

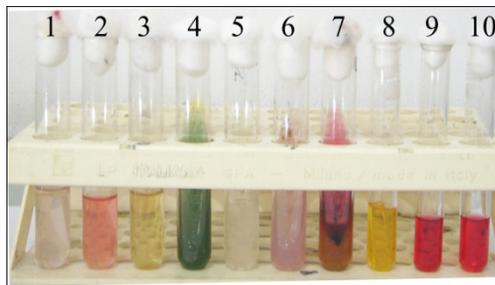
Pengecatan Gram adalah salah satu pengecatan diferensial karena hasilnya dapat membedakan antara sel bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Metode pengecatan Gram menggunakan dua macam cat, yaitu kristal violet sebagai cat utama, dan iodine ditambahkan sebagai mordant sehingga membentuk kompleks kristal violet-iodine, kemudian dialiri alkohol absolut, aseton, alkohol aseton, atau alkohol asam sebagai peluntur. Kompleks kristal violet-iodine pada sel bakteri Gram-negatif akan luntur sehingga sel bakteri tidak berwarna (transparan), sedangkan kompleks kristal violet-iodine pada sel bakteri Gram-positif yang memberikan warna violet tidak luntur. Kemudian digenangi dengan safranin sebagai cat penutup, bakteri Gram-negatif yang semula transparan karena terlunturkan oleh peluntur akan terwarnai oleh safranin sehingga berwarna *pink*. Bakteri Gram-positif ketika digenangi safranin tetap memberikan warna violet. Jadi, bakteri Gram-positif berwarna violet dan Gram-negatif berwarna *pink*.

## **B. IDENTIFIKASI *Salmonella typhi***

Isolat bakteri terpilih dengan morfologi sel bakteri bentuk batang, Gram-negatif dikultur pada media SSA dan MC. Media MC agar adalah media selektif untuk bakteri batang Gram-negatif enterik (bakteri yang terdapat pada saluran pencernaan manusia ataupun hewan), dan dapat digunakan untuk membedakan spesies anggota

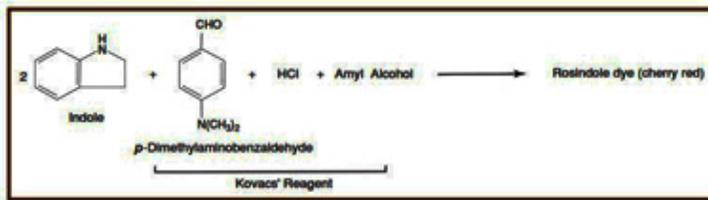
familia *Enterobacteriaceae* berdasarkan kemampuannya untuk memfermentasikan laktosa. Media tersebut mengandung kristal violet dan garam empedu (natrium dioksikolat) yang berfungsi untuk menghambat pertumbuhan bakteri Gram-positif sehingga media tersebut termasuk media selektif untuk bakteri batang Gram-negatif enterik karena bakteri batang Gram-negatif tahan terhadap kedua senyawa tersebut.

Koloni yang terpisah kemudian dilakukan uji biokimia (indol, *methyl red*, *Voges Proskauer*/VP, sitrat, motilitas, urease, *Triple Sugar Iron Agar*/TSIA, ONPG, dan uji gula: glukosa, laktosa, dan sukrosa), diinkubasi 37°C selama 18–24 jam (Gambar 3). Selain itu, dilakukan uji katalase dengan hasil positif (reaksinya ditunjukkan pada Gambar 4) dan uji oksidase dengan hasil negatif karena *S. typhi* termasuk dalam anggota familia *Enterobacteriaceae* yang bersifat fakultatif anaerob.



**Gambar 3.** Hasil uji IMViCMU, TSIA, glukosa, laktosa, dan sukrosa: 1) indol negatif, 2) MR positif, 3) VP negatif, 4) sitrat negatif, 5) motilitas positif, 6) urease negatif, 7) TSIA K/A, H<sub>2</sub>S positif, gas negatif, 8) glukosa positif, 9) laktosa negatif, 10) sukrosa negatif

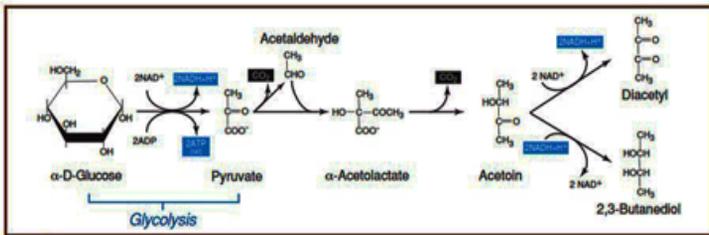




**Gambar 6.** Reaksi indol dengan Kovac's sehingga terbentuk kompleks warna merah (Leboffe dan Pierce, 2011)

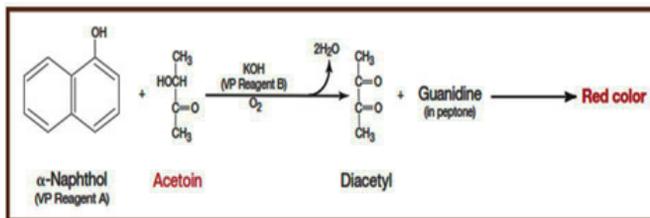
Hasil uji MR positif. Uji MR adalah uji yang digunakan untuk deteksi fermentasi glukosa menjadi macam-macam asam (asam laktat, asam format, asam asetat, dan asam suksinat). Media yang digunakan adalah media MR-VP. Media ini harus mengandung glukosa dan *buffer* yang digunakan untuk melindungi bakteri terhadap perubahan keasaman. Reagen yang digunakan untuk deteksi adanya macam-macam asam tersebut adalah indikator *methyl red* (MR). Indikator MR pada pH 6,2 berwarna kuning, pH 4,4 berwarna merah, dan  $4,4 < \text{pH} < 6,2$  berwarna oranye. Hasil uji MR positif menunjukkan terbentuknya macam-macam asam sehingga pH media menjadi 4,4. Indikator MR yang ditambahkan pada suasana asam berwarna merah.

Hasil uji VP negatif. Uji VP adalah uji untuk deteksi adanya asetoin sebagai hasil antara hidrolisis glukosa menjadi butanediol dan diasetil (Gambar 7).



**Gambar 7.** Hidrolisis glukosa menjadi butanediol dan diasetil dengan hasil antara asetoin (Leboffe dan Pierce, 2011)

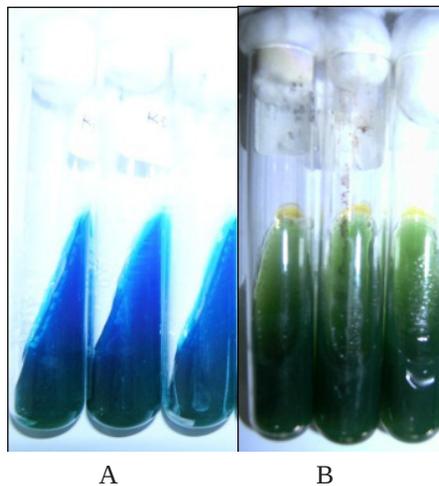
Media yang digunakan MR-VP. Setelah kultur pada media MR-VP selama satu malam, kemudian ditambah reagen A (*alpha naphthol* 5%) dan reagen B (KOH 40%) sambil dikocok untuk membantu menyediakan oksigen sehingga mempercepat terbentuknya warna merah. Uji positif terbentuk warna merah, reaksinya ditunjukkan pada Gambar 8.



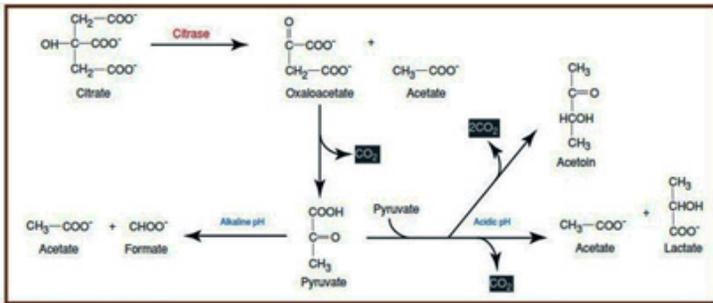
**Gambar 8.** Reaksi antara asetoin dengan  $\alpha$ -naphthol dan KOH sehingga terbentuk diasetil; dengan adanya guanidin akan menyebabkan terjadinya warna merah (Leboffe dan Pierce, 2011)

Hasil uji sitrat negatif. Uji sitrat digunakan untuk deteksi apakah bakteri yang diuji menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon. Media yang digunakan, yaitu media *Simmons*

*Citrate Agar*, mengandung *sodium citrate* sebagai satu-satunya sumber karbon dan amonium fosfat sebagai satu-satunya sumber nitrogen. Apabila bakteri menghasilkan enzim *citrate permease*, akan menyebabkan sitrat mudah masuk ke dalam sel yang kemudian dikonversikan menjadi piruvat, selanjutnya piruvat dikonversikan menjadi macam-macam produk sesuai dengan pH lingkungan. Bakteri yang tumbuh pada media ini karena menggunakan sitrat dan juga mengonversikan amonium fosfat menjadi amonia ( $\text{NH}_3$ ) dan amonium hidroksida ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), kedua senyawa tersebut menyebabkan pH media menjadi alkali. Indikator pada media tersebut adalah *Bromothymol blue* (BTB), pada pH 6,9 berwarna hijau, sedangkan pada pH 7,6 berwarna biru (Gambar 9). Reaksi ditunjukkan pada Gambar 10.



**Gambar 9.** Uji sitrat positif (A) dan negatif (B)



**Gambar 10.** Enzim *citrate permease* menyebabkan sitrat masuk ke dalam sel, kemudian dikonversikan ke dalam macam-macam produk, tergantung pH lingkungan (Leboffe dan Pierce, 2011)

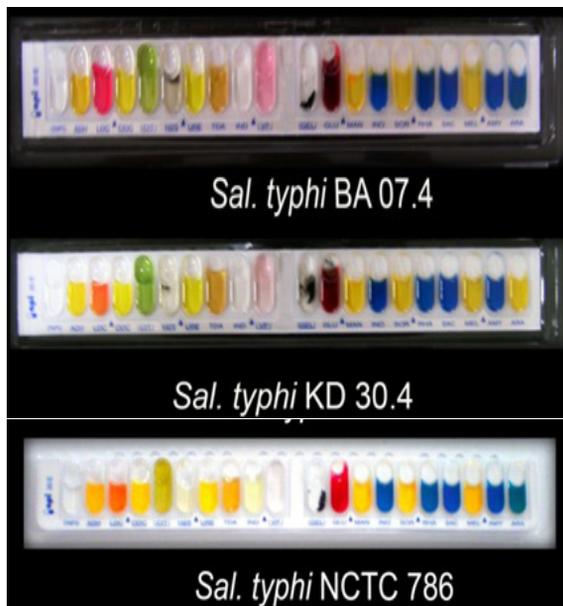
Hasil uji *S. typhi* pada media TSIA menunjukkan K/A, gas negatif, dan  $\text{H}_2\text{S}$  positif (Gambar 11).



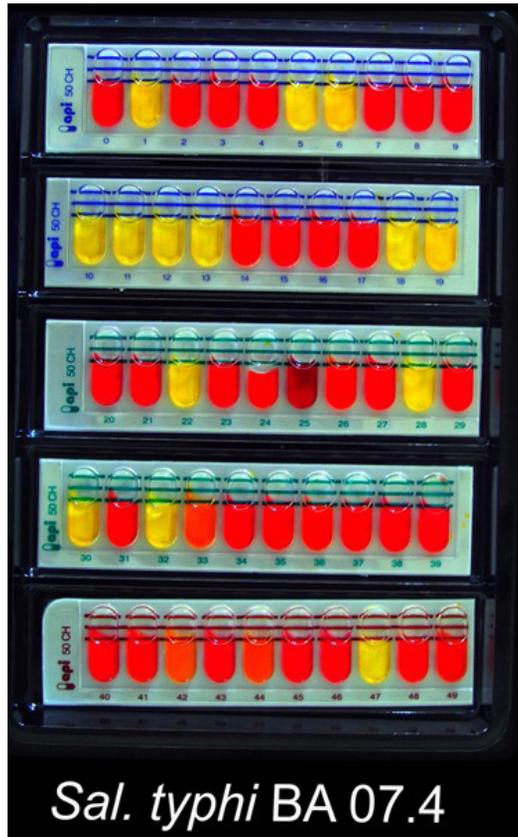
**Gambar 11.** Hasil uji *S. typhi* pada media TSIA

Hasil uji pada media TSIA menunjukkan bakteri tidak memfermentasikan laktosa maupun sukrosa yang terdapat pada

lereng media, tetapi memfermentasikan glukosa yang terdapat pada dasar media, tidak menghasilkan gas, menghasilkan H<sub>2</sub>S yang tampak adanya endapan hitam pada media, yaitu senyawa FeS. Selain itu, identifikasi *S. typhi* dapat menggunakan media API 20E (Gambar 12) untuk uji biokimia dan API 50CHB/E (Gambar 13) untuk uji fermentasi macam-macam karbohidrat. Macam-macam uji menggunakan media API 20E, yaitu enzim β-galaktosidase, arginin dehidrolase, lisin dekarboksilase, ornitin dekarboksilase, penggunaan sitrat, produksi H<sub>2</sub>S, urease, triptofan deaminase, produksi indol, produksi asetil metil karbinol, gelatinase, fermentasi glukosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sukrosa, melibiosa, amigladin, arabinosa, dan produksi NO<sub>2</sub>.



Gambar 12. Uji API 20E *S. typhi*



**Gambar 13.** Uji fermentasi karbohidrat menggunakan media API 50CHB/E

Fermentasi karbohidrat menggunakan media API 50CHB/E. Macam-macam karbohidrat yang diuji ditunjukkan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Macam-macam karbohidrat pada media API 50CHB/E

Macam-Macam Karbohidrat				
Gliserol	D-Glukosa	Metil- $\alpha$ -D-Glukopiranosida	D-Sakarosa	D-Lixosa
Eritriol	D-Fruktosa	N-Asetil Glukosamin	D-Trehalosa	D-Tagatosa
D-Arabinosa	D-Manosa	Amigladin	Inulin	D-Fukosa
L-Arabinosa	L-Sorbosa	Arbutin	D-Melezitosa	L-Fukosa
D-Ribosa	L-Ramnosa	Eskulin	D-Rafinosa	D-Arabitol
D-Xilosa	Dulsitol	Salisin	Amidon	L-Arabitol
L-Xilosa	Inositol	D-Selobiosa	Glikogen	Potasium Glukonat
D-Adonitol	D-Manitol	D-Maltosa	Xilitol	Potasium 2-Ketoglukonat
Metil- $\beta$ -D-Xilopiranosida	D-Sorbitol	D-Laktosa	Gentiobiosa	Potasium 5-Ketoglukonat
D-Galaktosa	Metil- $\alpha$ -D-Mannopiranosida	D-Melibiosa	D-Turanosa	

### C. SISTEMATIKA FENOTIPIK

Karakterisasi fenotipik meliputi morfologi sel, morfologi koloni, sifat fisiologi termasuk karakteristik pertumbuhan, sifat biokimia, resistansi terhadap antibiotik, penggunaan senyawa sebagai sumber karbon dan serologi (Vandamme dkk., 1996; Priest dan Austin, 1993). Karakterisasi fenotipik dari empat *strain S. typhi* dengan 76 karakter ditunjukkan pada Tabel 2. Hasil karakterisasi selanjutnya dianalisis similaritasnya atas dasar  $S_{SM}$  dan diklasifikasikan menggunakan algoritma UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Average*) yang ditunjukkan pada Tabel 3. Hasil

analisis dipresentasikan dalam bentuk dendogram menggunakan *PaintShop Pro* dan diedit dengan program *Adobe Photoshop* (Darmawati dkk., 2013). Dendogram dipresentasikan berdasarkan hasil analisis hubungan similaritas empat *strain S. typhi* dengan satu *strain* acuan *S. typhi* NCTC 786, yang ditunjukkan pada Gambar 14.

**Tabel 2.** Data unit karakter (t = 76) terhadap enam *strain Salmonella typhi* (n = 5) pada kultur darah Widal positif asal Kota Semarang untuk penyusunan dendogram hubungan similaritas *strain-strain* bakteri berdasarkan sifat fenotipik

No.	Karakter	Kode Kart	A	B	C	D	E
1	Bentuk koloni bulat	Aa	+	+	+	+	+
2	Warna koloni pada media MC (transparan)	Ba	+	+	+	+	+
3	Warna koloni pada media BAP (transparan)	Ca	+	+	+	+	+
4	Bentuk sel batang	Da	+	+	+	+	+
5	Gram-negatif	Ea	+	+	+	+	+
6	Tipe hemolisis gama	Fa	+	+	+	+	+
7	Motilitas	Ga	+	+	+	+	+
8	Katalase	Ha	+	+	+	+	+
9	Oksidase	Ia	-	-	-	-	-
10	Resistan kloramfenikol (C30)	Ja	-	-	+	-	-
11	Resistan gentamisin (CN10)	Ka	+	-	-	-	-
12	Resistan ampisilin (SAM 20)	La	+	-	-	-	-
13	Resistan siprofloksasin (CIP 5)	Ma	+	-	-	-	-
14	Resistan sefotaksim (CTX30)	Na	+	-	-	-	-
15	Resistan trimetoprim sulfametoksazol (SXT)	Oa	+	-	-	+	-
16	$\beta$ -galaktosidase	Pa	-	-	-	-	-

**Tabel 2.** Data unit karakter (lanjutan)

No.	Karakter	Kode Kart	A	B	C	D	E
17	Arginin dihidrolase	Qa	-	-	-	-	-
18	Lisin dekarboksilase	Ra	+	+	+	+	+
19	Penggunaan sitrat	Ta	-	-	-	-	-
20	Produksi H <sub>2</sub> S	Ua	+	+	+	+	-
21	Urease	Va	-	-	-	-	-
22	Triptofan deaminase	Wa	-	-	-	-	-
23	Produksi indol	Xa	-	-	-	-	-
24	Produksi asetil metil karbinol	Ya	+	+	+	+	+
25	Gelatinase	Za	-	+	-	+	-
26	Nitrat reduktase	Ab	+	+	+	+	+
27	Gliserol	Bb	+	+	+	+	-
28	Eritriol	Cb	-	-	-	-	-
29	D-Arabinosa	Db	-	-	-	-	-
30	L-Arabinosa	Eb	-	-	-	-	-
31	D-Ribosa	Fb	+	+	+	+	+
32	D-Xilosa	Gb	+	+	+	+	+
33	L-Xilosa	Hb	-	-	-	-	-
34	D-Adonitol	Ib	-	-	-	-	-
35	Metil- -D-Xilopiranosida	Jb	-	-	-	-	-
36	D-Galaktosa	Kb	+	+	+	+	+
37	D-Glukosa	Lb	+	+	+	+	+
38	D-Fruktosa	Mb	+	+	+	+	+
39	D-Manosa	Nb	+	+	+	+	+
40	L-Sorbosa	Ob	-	-	-	-	-
41	L-Ramnosa	Pb	-	-	-	-	-
42	Dulsitol	Qb	-	-	-	-	-

**Tabel 2.** Data unit karakter (lanjutan)

No.	Karakter	Kode Kart	A	B	C	D	E
43	Inositol	Rb	-	-	-	-	-
44	D-Manitol	Sb	+	+	+	+	+
45	D-Sorbitol	Tb	+	+	+	+	+
46	Metil- $\alpha$ -D-Mannopiranosida	Ub	-	-	-	-	-
47	Metil- $\alpha$ -D-Glukopiranosida	Vb	-	-	-	-	-
48	N-Asetil Glukosamin	Wb	+	+	+	+	+
49	Amigladin	Xb	-	-	-	-	-
50	Arbutin	Yb	-	-	-	-	-
51	Eskulin	Zb	-	-	-	-	-
52	Salisin	Ac	-	-	-	-	-
53	D-Selobiosa	Bc	-	-	-	-	-
54	D-Maltosa	Cc	+	+	+	+	+
55	D-Laktosa	Dc	-	-	-	-	-
56	D-Melibiosa	Ec	+	+	+	+	+
57	D-Sakarosa	Fc	-	-	-	-	-
58	D-Trehalosa	Gc	+	+	+	+	+
59	Inulin	Hc	-	-	-	-	-
60	D-Melezitosa	Ic	-	-	-	-	-
61	D-Rafinosa	Jc	-	-	-	-	-
62	Amidon	Kc	-	-	-	-	-
63	Glikogen	Lc	-	-	-	-	-
64	Xilitol	Mc	-	-	-	-	-
65	Gentiobiosa	Nc	-	-	-	-	-
66	D-Turanosa	Oc	-	-	-	-	-
67	D-Lixosa	Pc	-	-	-	-	-
68	D-Tagatosa	Qc	-	-	-	-	-

**Tabel 2.** Data unit karakter (lanjutan)

No.	Karakter	Kode Kart	A	B	C	D	E
69	D-Fukosa	Rc	-	-	-	-	-
70	L-Fukosa	Sc	-	-	-	-	-
71	D-Arabitol	Tc	-	-	-	-	-
72	L-Arabitol	Uc	-	-	-	-	-
73	Potassium glukonat	Vc	+	+	+	+	+
74	Potassium 2-ketoglukonat	Wc	-	-	-	-	-
75	Potassium 5-ketoglukonat	Xc	-	-	-	-	-

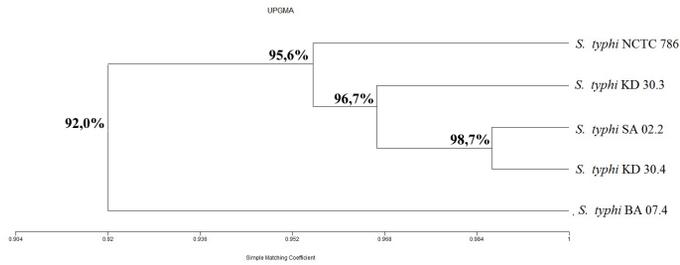
**Keterangan:** A = *S. typhi* BA 07.4 asal Puskesmas Bangetayu; B = KD 30.4 *S. Typhi* asal Puskesmas Kedungmundu; C = KD 30.3 *S. typhi* asal Puskesmas Kedungmundu; D = SA 02.2 *S. typhi* asal RSI Sultan Agung; E= *S. Typhi* NCTC 786

**Tabel 3.** Analisis kluster 4 strain *S. typhi* dengan satu strain acuan *S. typhi* NCTC 786 didasarkan atas analisis *Sample Matching Coefficient* ( $S_{SM}$ ) dan algoritma UPGMA

Nodus	Grup 1	Grup 2	Similaritas (%)	Jml. Objek yang Bergabung
1	KD 30.4	SA 02.2	97,4	2
2	KD 30.3	<i>S. typhi</i> NCTC 786	96,1	2
3	Nodus 1	Nodus 2	95,4	4
4	Nodus 3	BA 07.4	91,8	5

Pada Gambar 14, dendrogram tersebut menunjukkan adanya 3 nodus. Nodus 1 beranggotakan 2 strain *S. typhi* (KD 30.4 dan SA 02.2), dengan nilai similaritas 97,4%. Nodus 2 beranggotakan 2 strain (KD 30.3 dan strain acuan *S. typhi* NCTC 786) dengan nilai similaritas 96,1%. Nodus 3 merupakan gabungan antara nodus 1 dan nodus 2, yang masing-masing nodus beranggotakan 2 strain, dengan nilai similaritas 95,4%. Nodus 5 merupakan gabungan antara nodus

3 dan strain *S. typhi* BA 07.4 sehingga nodus 5 beranggotakan 5 strain, dengan nilai similaritas 91,8%.



**Gambar 14.** Dendogram yang menunjukkan kemiripan antara 4 strain *S. typhi* dari hasil isolasi sampel darah Widal positif, dengan satu strain acuan *S. typhi* NCTC 786 yang didasarkan atas analisis  $S_{SM}$  dan algoritma UPGMA berdasarkan karakter fenotipik

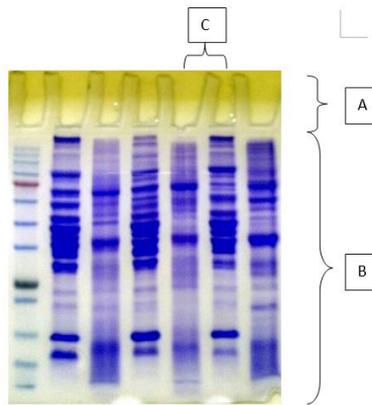
# 3

## BAB

# SDS-PAGE ELEKTROFORESIS DAN SISTEMATIKA KIMIAWI *Salmonella typhi*

## A. METODE SDS-PAGE ELEKTROFORESIS

Metode *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gell Electrophoresis* (SDS-PAGE) adalah metode yang dapat digunakan untuk memisahkan subunit protein berdasarkan berat molekul, melalui matriks poliakrilamid yang dialiri medan listrik. Sistem ini terdiri atas dua macam gel, yaitu *running gel* dan *stacking gel*. *Stacking gel* terletak di bagian atas yang fungsinya sebagai gel untuk penempatan sampel yang siap dipisahkan, sedangkan *running gel* terletak di bagian bawah yang fungsinya untuk memisahkan subunit protein berdasarkan berat molekulnya (Gambar 15).



**Gambar 15.** Gel poliakrilamid untuk SDS-PAGE: (A) *stacking gel*, (B) *running gel*, (C) sumuran (*well*)

Protein mempunyai muatan positif dan negatif, tetapi dengan adanya SDS pada gel poliakrilamid akan memberikan muatan negatif pada protein karena SDS adalah detergen anionik. Muatan listrik yang dialirkan menyebabkan protein akan bergerak melalui gel dari kutub negatif ke kutub positif. Gel poliakrilamid akan memisahkan molekul berdasarkan ukuran dan bentuk molekul. Molekul yang berukuran kecil akan bergerak lebih cepat daripada yang ukurannya besar.

Gel poliakrilamid merupakan polimerisasi antara akrilamid dan bisakrilamid (*N,N'*-*Methylenebisacrylamide*). Polimerisasi terjadi karena adanya radikal oksigen bebas yang berasal dari amonium persulfat (APS) sebagai katalis pertama dan *N,N,N',N'*-*Tetramethylethylenediamine* (TEMED) sebagai katalis kedua sehingga terjadi polimerisasi tersebut.

## B. CARA ISOLASI TOTAL PROTEIN TERLARUT SEL BAKTERI

Total protein sel bakteri adalah total komponen protein pada sel bakteri, baik protein struktural maupun protein fungsional. Protein struktural sel bakteri adalah komponen protein yang menyusun sel bakteri, seperti protein transmembran yang terdapat pada membran sitoplasma dan *peripheral membrane protein* yang tersusun dalam bentuk lipoprotein. Kedua macam protein tersebut saling berinteraksi dalam proses transportasi komponen yang dibutuhkan oleh sel maupun yang dikeluarkan dari dalam sel. Selain itu juga berfungsi dalam metabolisme energi (Brock dkk., ed. 13).

Protein fungsional adalah protein yang menyusun enzim maupun toksin (eksotoksin), serta protein-protein yang berperan dalam merusak antibiotik. Protein struktural proses sintesis dikode oleh DNA kromosom, sedangkan protein fungsional dikode oleh DNA plasmid. Plasmid adalah DNA ekstrakromosom yang berbentuk sirkuler atau melingkar dan berfungsi dalam proses sintesis protein fungsional, dapat berpindah dari satu sel bakteri ke sel bakteri yang lain, baik yang sejenis maupun yang tidak sejenis, melalui *pilli/fimbriae* yang disebut konjugasi.

Total protein sel bakteri diperoleh dengan cara menumbuhkan satu koloni bakteri pada 100 ml medium BHI cair, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18 jam. Apabila menginginkan pertumbuhan bakteri lebih pesat maka dapat dilakukan dengan agitasi. Kultur bakteri selanjutnya disentrifugasi pada suhu 4°C, dengan kecepatan 3.000 rpm selama 20 menit. Pelet dicuci dengan cara diresuspensikan menggunakan 0,1 M PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7,4. Pencucian dilakukan tiga kali dengan cara yang

sama, yaitu setelah dicuci kemudian pelet diresuspensikan dalam 1,5 ml PBS pH 7,4 menggunakan pipet Pasteur ataupun menggunakan mikropipet dengan cara dipipet berulang-ulang hingga homogen. Suspensi bakteri kemudian disonikasi 6 kali, setiap kali sonikasi 30 detik dengan waktu tenggang antara sonikasi satu dengan sonikasi berikutnya 30 detik, dilakukan pada suhu 4°C supaya protein tidak rusak, yaitu dengan cara pada waktu sonikasi *tube* tempat sampel dimasukkan ke dalam es karena protein akan rusak dalam keadaan panas. Amplitudo *repeating duty cycle* yang digunakan adalah 0,7. Hasil sonikasi suspensi bakteri disentrifugasi pada suhu 4°C, dengan kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh adalah total protein sel yang konsentrasi proteinnya siap diukur.

### **C. MENGUKUR KONSENTRASI PROTEIN DAN PENYIMPANANNYA**

Konsentrasi protein diukur dengan cara, yaitu menyiapkan larutan blanko (800 µl akuades steril), ditambah 200 µl *Protein Assay CBB Solution* (5×) (Nacalai Tesque Inc.: Code 29440-44, Kyoto, Japan) atau menggunakan *Bio-Rad Assay*, dihomogenkan dengan cara *tube*-nya dibolak-balik menggunakan dua jari (telunjuk dan ibu jari) sampai warnanya homogen. Persiapan untuk pengukuran konsentrasi protein sampel, yaitu menyiapkan 798 µl akuades, ditambah 2 µl sampel yang akan diukur, ditambah 200 µl *Protein Assay CBB Solution* (5×) atau *Bio-Rad Assay*, dihomogenkan dengan cara yang sama. Selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer *visible* pada panjang gelombang 595 nanometer ( $\lambda$  595 nm). Semakin biru warna suspensi, semakin tinggi OD dan semakin tinggi pula konsentrasi protein. Konsentrasi protein sampel

dapat ditentukan dengan menggunakan rumus persamaan garis sebagai berikut.

$$Y = aX + b$$

Y = nilai absorbansi

X = konsentrasi protein  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Persamaan garis untuk menentukan konsentrasi protein diperoleh dengan cara menimbang *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai larutan stock BSA (1 mg/ml atau 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), kemudian menyiapkan larutan standar seperti pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Larutan untuk membuat kurva standar konsentrasi protein

Larutan BSA ( $\mu\text{l}$ )	H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{l}$ )	<i>Biorad Assay</i> ( $\mu\text{l}$ )
0	800	200
0,5	799,5	200
1,0	799,0	200
2,0	798,0	200
3,0	797,0	200
4,0	796,0	200
5,0	795,0	200
6,0	794,0	200
7,0	793,0	200
8,0	792,0	200
9,0	791,0	200
10,0	790,0	200

### ***Cara Menyimpan Protein***

Protein yang telah diketahui konsentrasinya kemudian dialiokot (dibagi pada beberapa tabung dengan volume 200 µl setiap tabung), diberi label lengkap (nama protein, konsentrasi, dan tanggal). Sampel protein disimpan di *freezer* atau pada suhu minus 80°C. Alikuot dilakukan untuk menghindari kerusakan protein karena apabila sering dilakukan *thawing*, protein akan mudah rusak. Protein siap digunakan untuk penelitian lebih lanjut.

## **D. ELEKTROFORESIS PROTEIN MENGGUNAKAN METODE SDS-PAGE**

Separasi total protein bakteri dilakukan dengan SDS-PAGE (Darmawati dkk., 2013). Caranya, yaitu menyiapkan *plat glass* (dua macam ukuran: satu lebih tinggi dari pelat yang satunya, yang dilengkapi dengan *spaser* dengan ketebalan 3 mm pada bagian kanan dan kiri kaca) yang dibersihkan dengan alkohol 70%, karet panjang yang digunakan sebagai *spaser* bagian bawah yang menghubungkan antara *spaser* kanan dan kiri untuk pencetak gel, sisir pencetak sumuran yang digunakan untuk tempat sampel yang akan dipisahkan. Setelah menyiapkan alat pencetak gel, masukkan 7,5 ml larutan (10%) atau sesuai kebutuhan (12%, 10%, atau 8%) sebagai gel pemisah (*running gel*) seperti terlihat pada Tabel 5.

*Running gel* yang sudah siap, kemudian segera dimasukkan ke dalam pencetak gel, lalu ditambahkan akuades atau butanol untuk menutup permukaan larutan supaya rata. Tunggu 30–60 menit sampai terjadi polimerisasi.

**Tabel 5.** *Running gel* (15 ml) dapat digunakan untuk dua muka

Nama Reagen	12% (ml)	10% (ml)	8% (ml)
<i>Acrylamid</i> 30%	6,0	5,0	4
1,5 M Tris pH 8,8	3,8	3,8	3,8
10% SDS	0,15	0,15	0,15
dH <sub>2</sub> O	4,9	5,9	6,9
TEMED	0,006	0,006	0,006
10% APS	0,15	0,15	0,15

Permukaan gel kemudian dibersihkan. Apabila yang digunakan sebagai penutup adalah akuades maka tidak perlu dicuci, cukup dibuang saja akuadesnya. Tetapi, apabila yang digunakan sebagai penutup adalah butanol maka setelah butanol dibuang harus dicuci dengan akuades. Selanjutnya, masukkan gel pemampat 5% yang telah disiapkan sebanyak 5 ml seperti yang disebutkan pada Tabel 6, kemudian sisir dimasukkan pula secara pelan-pelan dari arah samping untuk menghindari adanya gelembung. Polimerisasi gel ditunggu selama 30 menit. Sisir diambil pelan-pelan dengan arah lurus ke atas. Gel siap digunakan.

**Tabel 6.** *Stacking gel* untuk dua muka

Nama Reagen	Volume (ml)
dH <sub>2</sub> O	2,70
<i>Acrylamid</i> 30%	0,67
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,50
10% SDS	0,04

Nama Reagen	Volume (ml)
10% APS	0,04
TEMED	0,004l

Gel yang telah mengalami polimerisasi dipasang pada ATTA *Atto Corporation* Tokyo Japan (AE-6530M/AE-6530P), kemudian ditambahkan ke dalamnya larutan *electroda buffer* 1X pH 8,3, hindari adanya gelembung udara.

### ***Penyiapan Sampel***

Sampel protein yang telah diketahui konsentrasinya disiapkan. Sebaiknya protein yang dimasukkan ke dalam setiap sumuran ditentukan konsentrasinya. Misalnya, sampel protein yang tersedia 3 µg/µl, sedangkan yang akan dimasukkan ke dalam setiap sumuran sebanyak 10 µg, maka sampel yang harus diambil sebanyak  $10/3$  µl (3,33 µl). Selanjutnya ditambah 12,67 µl PBS 1× sehingga volumenya 16 µl, kemudian ditambah 4 µl sampel *buffer* 5×. Campuran tersebut kemudian dihomogenkan dan dipanaskan selama 2 menit di dalam air yang telah mendidih, yang kemudian langsung dimasukkan ke dalam es. Sampel siap dimasukkan ke dalam gel pada setiap sumuran, setelah itu diberi aliran listrik dengan tegangan 100 volt hingga *bromophenol blue* keluar dari bagian gel pemampat (*stacking gel*), dan ketika mulai masuk pada *separating gel*, tegangan dinaikkan menjadi 200 volt hingga *bromo phenol blue* keluar dari bawah gel. Gel diambil, diwarnai dengan 0,25% *Comassie*

*Brilliant Blue R-250* (Tabel 7) selama 30 menit sambil digoyang pada *shaker* hingga pita-pita protein terwarnai. Selanjutnya, untuk menghilangkan warna pada gel yang tidak mengandung protein diberi larutan *destaining* (Tabel 8), diganti 3–4 kali hingga gel tampak bersih dan pita-pita protein tampak jelas. Gel hasil SDS-PAGE siap untuk dianalisis profil proteinnya, dan siap dibuat pula kurva standar untuk penentuan berat molekul protein berdasarkan *marker* proteinnya.

**Tabel 7.** Komposisi larutan *staining* CBB 0,25% dan 0,1%

Bahan	0,25%	0,1%
<i>Coomassie blue</i>	0,25 gr	0,1 gr
Metanol	50 ml	40 ml
<i>Asam acetat glacial</i>	10 ml	10 ml
Akuades	40 ml	50 ml
Total volume	100 ml	100 ml

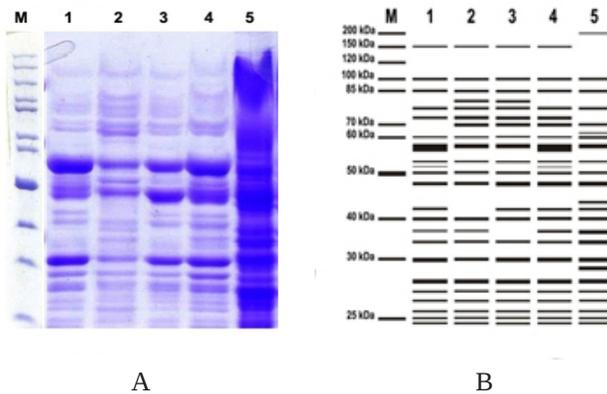
**Tabel 8.** Larutan *destaining* 50% atau 40%

Bahan	50%	40%
Metanol	50 ml	40 ml
<i>Asam acetat glacial</i> 10%	10 ml	10 ml
Akuades	40 ml	50 ml

## E. SISTEMATIKA KIMIAWI *Salmonella typhi*

Sistematika kimiawi empat *strain S. typhi* dan satu *strain* acuan *S. typhi* NCTC 786 disusun berdasarkan total protein terlarut sel

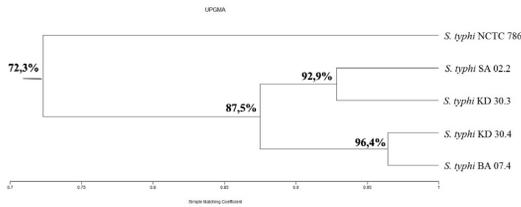
bakteri yang kemudian disepari dengan SDS-PAGE yang dapat dilihat pada Gambar 16A. Hasil SDS-PAGE tersebut selanjutnya dilakukan visualisasi representasi diagramatik seperti pada Gambar 16B. Data diedit dan dianalisis dengan program MVSP 3.1A, selanjutnya analisis hubungan similaritas antar-*strain* menggunakan  $S_{SM}$  dan diklasifikasikan menggunakan algoritma UPGMA. Hasil analisisnya dipresentasikan dalam bentuk dendogram dengan program *Adobe Photoshop* seperti pada Gambar 17.



**Gambar 16.** Visualisasi profil total protein terlarut pada SDS-PAGE (A) dan (B); visualisasi representasi diagramatik profil total protein terlarut lima isolat bakteri *S. typhi* dan *strain* acuan *S. typhi* NCTC 786 M *marker protein*, 1) BA 07.4, 2) KD 30.3, 3) SA 02.2, 4) KD 30.4, 5) *S. typhi* NCTC 786

Dendogram pada Gambar 17 menunjukkan adanya pengelompokan *strain S. typhi* BA 07.4 dengan *strain S. typhi* KD 30.4 menjadi satu nodus (Nodus 1) dengan nilai similaritas 93,1%. Nodus 2, nodus 3, dan nodus 4 masing-masing beranggotakan satu

*strain*, berturut-turut *S. typhi* KD 30.3, *S. typhi* SA 02.2, dan *S. typhi* NCTC 786. Nodus 1, 2, dan 3 menjadi satu nodus, yaitu Nodus 5 dengan nilai similaritas 89,7%. Nodus 4 dan 5 menjadi satu nodus, yaitu Nodus 6 dengan nilai similaritas 75,3%.



**Gambar 17.** Dendrogram yang menunjukkan hubungan similaritas antara empat *strain S. typhi* (*S. typhi* SA 02.2; *S. typhi* KD 30.3; *S. typhi* BA 07.4; *S. typhi* KD 30.4) dengan *strain* acuan *S. typhi* NCTC 786 berdasarkan profil total protein dan didasarkan atas analisis *Simple Matching Coefficient* dan algoritma UPGMA

Dendrogram yang disusun berdasarkan profil total protein terlarut sel bakteri menunjukkan topologi yang mirip dengan dendrogram yang disusun berdasarkan karakter fenotipik, yang karakterisasinya berdasarkan morfologi sel, morfologi koloni, dan sifat biokimia yang dikarakterisasi menggunakan media API 20E dan API 50CHB/E (Amarantini, 2011; Darmawati dkk., 2012; Yanti, 2011).

Keselarasan yang terjadi tersebut disebabkan oleh sifat-sifat biokimiawi yang merupakan refleksi dari aktivitas enzim-enzim yang dimiliki oleh setiap *strain*. Enzim tersusun dari protein, dan protein merupakan ekspresi dari genom sehingga sistematika berdasarkan sifat biokimiawi dan profil total protein akan

menghasilkan klasifikasi yang kongruen dan akurat (Darmawati dkk., 2013; Sembiring, 2004; Viridi dan Sachdeva, 2005).

# 4

## BAB

# ISOLASI DNA GENOM BAKTERI

## A. PRINSIP ISOLASI DNA

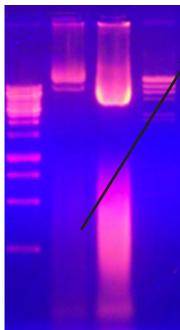
Asam nukleat ada dua macam, yaitu DNA dan RNA. Sel prokaryotik seperti bakteri tidak dijumpai nukleus, tetapi nukleoid yang merupakan DNA kromosom yang terletak di dalam sitoplasma yang tampak lebih kental dibandingkan substansi yang ada di sekitarnya, dan DNA plasmid (DNA ekstrakromosom, bentuk melingkar, menyandi protein fungsional). Untuk mengisolasi DNA, harus dilakukan pelisisan sel, baik isolasi DNA sel eukaryotik maupun prokaryotik (bakteri). Sel dilisiskan menggunakan *buffer* lisis. Bakteri merupakan sel tunggal yang sederhana. Untuk melisis dinding sel bakteri yang mengandung peptidoglikan dapat ditambahkan enzim lysosim atau dengan ditambah EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetate*), kemudian dimurnikan dengan ditambah fenol, selanjutnya diendapkan dengan ditambah etanol absolut dingin.

## B. CARA ISOLASI DNA GENOM BAKTERI GRAM-NEGATIF

Satu koloni bakteri pada media MC diinokulasikan ke dalam 15 ml media BHI (*Brain Heart Infusion*, OXOID) atau media Luria Bertani (LB), kemudian diinkubasikan selama satu malam pada suhu 37°C dengan agitasi. Kultur bakteri disentrifugasi 3.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C, supernatan dibuang, kemudian *pellet* ditambah 750 µl *buffer* lisis (100 mM Tris HCl pH 8, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, 2% SDS), divortex, ditambahkan 10 µl (10 mg/ml) proteinase K, digojog kuat-kuat selama 15 menit, diinkubasi pada suhu 55°C selama 30 menit, disentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipindahkan pada tabung 1,5 ml, ditambahkan fenol 700 µl, digojog pelan-pelan selama 30 menit, disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Hasil sentrifugasi akan tampak dua lapisan, yaitu lapisan bawah adalah fenol beserta protein, dan lapisan atas adalah fase air yang mengandung DNA dan RNA. Larutan fenol digunakan untuk melarutkan dan menghilangkan semua protein yang menyertai DNA. Untuk menghilangkan RNA yang mengontaminasi DNA dapat ditambahkan enzim RNase yang fungsinya mendegradasi RNA yang mengontaminasi DNA berupa fragmen RNA yang kecil-kecil, kemudian diinkubasikan pada suhu yang mana enzim RNase aktif. Selanjutnya, lapisan atas (fase air) dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml, ditambahkan etanol 96% dingin 1:1 atau 1:2 (v/v), dicampur pelan-pelan hingga timbul benang-benang halus. Etanol fungsinya mempresipitasikan makromolekul, termasuk DNA, sedangkan fragmen RNA tetap terlarut di dalam etanol. Untuk memperoleh DNA, kemudian disentrifugasi. *Pellet* adalah makromolekul DNA.

Selanjutnya, benang-benang halus DNA dicuci dengan etanol 70%, supernatan dibuang, *pellet* dikeringkan dan ditambahkan TE (Tris EDTA 10 mM, Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA) sebanyak 200  $\mu$ l untuk melarutkan DNA.

Kemurnian DNA hasil isolasi ditentukan dengan absorbansi UV pada  $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ . Cincin aromatik pada basa nitrogen (purin dan pirimidin) yang terdapat pada DNA dan RNA akan terserap oleh sinar ultraviolet (UV) pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan cincin aromatik pada asam amino *tryptopan* yang merupakan asam amino pada protein akan terserap oleh sinar UV pada panjang gelombang 280 nm. Kemurnian DNA tinggi jika nisbah absorbansinya ( $\lambda$  260/ $\lambda$  280) adalah 1,8. Apabila nisbah absorbansinya kurang dari 1,8, berarti DNA masih terkontaminasi oleh protein. Jika lebih besar dari 1,8 maka masih terkontaminasi oleh RNA (Gambar 18). Solusinya, apabila DNA masih terkontaminasi RNA maka ditambahkan enzim RNase untuk mendegradasi RNA. Tetapi, jika masih terkontaminasi oleh protein maka ditambahkan proteinase. Kualitas DNA yang tinggi dapat dilihat pada hasil elektroforesis agarose 1% berdasarkan pita tunggal di atas 12 kb.



Kontaminasi RNA

**Gambar 18.** Elektroforesis DNA plasmid yang terkontaminasi RNA

### C. CARA KERJA MENGUKUR KONSENTRASI DNA

Sebanyak 2  $\mu\text{l}$  DNA ditambah 60  $\mu\text{l}$  TE. Absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 260 nm ( $\lambda_{260}$ ). Kemudian dihitung konsentrasi DNA dengan rumus sebagai berikut (Sambrook dkk., 1989).

$$[\text{DNA}] \mu\text{g/ml} = \text{absorbansi } \lambda_{260} \times \text{faktor pengenceran DNA} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

### D. CARA KERJA ELEKTROFORESIS GEL AGAROSE

Agarose 1% dibuat dengan cara: menimbang 0,4 gram agarose, dimasukkan ke dalam Erlenmeyer ukuran 100 ml, ditambah 40 ml TAE. Mulut Erlenmeyer ditutup dengan plastik *wrap* dan dilubangi di bagian tengahnya, kemudian campuran agarose dan TAE dilarutkan dengan cara dipanaskan di dalam *microwave*. Jangan sampai mendidih karena konsentrasinya akan meningkat. Setelah agarose larut sempurna, diamkan sesaat sampai suhunya lebih-kurang 55°C, kemudian dituang ke dalam cetakan yang telah dipasang sisir. Agarose dibiarkan memadat. Setelah agarose memadat, sisir diambil dengan cara diangkat arah tegak lurus sehingga tidak merusak sumuran.

Gel agarose yang sudah padat dipasang pada alat untuk elektroforesis DNA. Larutan TAE 1X dimasukkan ke dalam alat sampai agarosanya terendam. Sampel ditambah 5X *loading buffer*, dihomogenkan, kemudian dimasukkan ke dalam setiap sumuran yang terbentuk oleh sisir. DNA akan bergerak dari kutub negatif ke

arah kutub positif. Voltase untuk *running* diatur sebesar 100 volt. Setelah *loading buffer* sampai  $\frac{2}{3}$  bagian dari gel agarose, aliran listrik dihentikan. Setelah itu gel agarose digenangi dengan *ethidium bromide* lebih-kurang 10 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi dengan UV eluminator.



# 5

## BAB

# ***POLYMERASE CHAIN REACTION, KLONING, DAN SEKUENSING GEN 16 SrRNA***

## **A. PRINSIP DASAR PCR**

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah teknik memperbanyak fragmen DNA tertentu secara eksponensial menggunakan enzim secara *in vitro*, yang dapat dilakukan secara cepat. Metode yang mengadopsi teknik replikasi DNA di dalam sel setiap organisme hidup (*in vivo*) ini ditemukan pertama kali pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis (Retnoningsih, 2014). Semula metode ini hanya digunakan untuk mengamplifikasi fragmen DNA tertentu, tetapi sekarang berkembang sehingga dapat digunakan pula untuk mengamplifikasi dan melakukan kuantitasi molekul mRNA (Yuwono, 2006). Kelebihan metode ini selain dapat digunakan untuk melipatgandakan fragmen DNA secara cepat, ternyata dapat juga untuk melipatgandakan DNA yang jumlahnya hanya sedikit, karena pada proses PCR dibutuhkan DNA cetakan cukup 5 µg. Selain itu, reaksi PCR biasa dilakukan pada volume kecil (25–50 µl).

## B. KOMPONEN PCR DAN PROGRAM AMPLIFIKASI GEN 16S RRNA

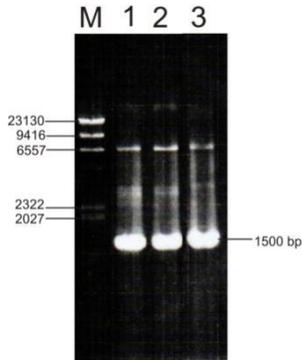
Amplifikasi gen 16S rRNA dari bakteri *S. typhi* menggunakan metode PCR. Komponen PCR yang dibutuhkan adalah: 1) DNA *template* yang digunakan sebagai target sekuen yang akan diamplifikasi, yaitu DNA bakteri *S. typhi* yang telah diisolasi dan diketahui kemurnian serta konsentrasinya; 2) dua macam primer, yaitu 8F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' dan U1492R 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' (Delong, 1992 *cit.* Darmawati dkk., 2014), yang digunakan untuk inisiasi amplifikasi sekuen target, yaitu gen 16S rRNA; 3) enzim DNA *polymerase* yang tahan terhadap suhu tinggi, yaitu *Taq polymerase* yang berasal dari bakteri *Thermus aquaticus*; 4) dNTP (dGTP, dCTP, dATP, dan dTTP) yang digunakan untuk memproduksi *copy* DNA yang diinginkan. Adapun komponen bahan untuk kebutuhan PCR ditunjukkan pada Tabel 9.

Program PCR yang digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA meliputi: 1) denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik; 2) *annealing* primer pada suhu 55°C selama 30 detik; 3) ekstensi pada suhu 72°C selama 1,5 menit; 4) final ekstensi pada suhu 72°C selama 10 menit pada sebanyak 30 siklus (Darmawati dkk., 2014)

**Tabel 9.** Komponen bahan untuk amplifikasi gen 16S rRNA

No.	Bahan	Volume
1.	Aquabides steril	37,75 $\mu$ l
2.	10 $\times$ <i>Ex Taq Buffer</i>	5 $\mu$ l
3.	Campuran dNTP (2,5 mM masing-masing)	4 $\mu$ l
4.	DNA cetakan	2 $\mu$ l
5.	Primer 1 (8F), 1 $\mu$ M (konsentrasi akhir) Stock: 100 $\mu$ M/ $\mu$ l = 100 pmol/ $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
6.	Primer 2 (1.492), 1 $\mu$ M (konsentrasi akhir) Stock: 100 $\mu$ M/ $\mu$ l = 100 pmol/ $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
7.	<i>TAKARA Ex Taq</i> (5 unit/ $\mu$ l)	0,25 $\mu$ l
	Total	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

Denaturasi adalah proses lepasnya ikatan hidrogen yang menghubungkan antara dua *strand* yang berpasangan sehingga dua *strand* yang terpisah dan masing-masing *strand* menjadi cetakan. Proses denaturasi membutuhkan suhu yang tinggi, kemudian diikuti *annealing*, yaitu proses menempelkan primer pada sekuens pasangannya yang terdapat pada DNA *template*. Karena proses *annealing* tidak dapat terjadi pada suhu yang tinggi maka suhunya diturunkan. Selanjutnya proses ekstensi, yaitu proses sintesis DNA oleh enzim *Taq polymerase*. Enzim tersebut hanya dapat melakukan sintesis DNA, tetapi tidak dapat mengawali sintesis DNA. Sintesis DNA hanya bisa diawali oleh primer. Hasil amplifikasi gen 16S rRNA divisualisasi dengan elektroforesis pada 1% gel agarose, dengan indikasi munculnya pita tunggal yang berukuran lebih-kurang 1.500 bp (Gambar 19).



**Gambar 19.** Hasil amplifikasi gen 16S rRNA 5 strain *S. typhi* (M) Marker DNA *Hind* III: 1) *S. typhi* SA 02.2; 2) *S. typhi* BA 07.4; 3) *S. typhi* KD 30.4 (Darmawati dkk., 2014)

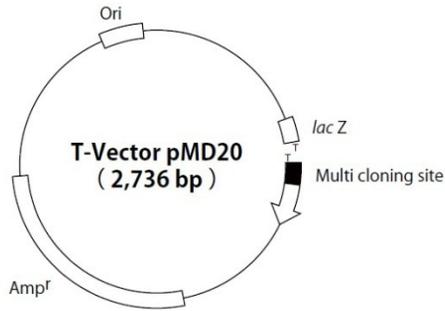
### C. KLONING GEN 16S RRNA

Kloning gen 16S rRNA dilakukan dengan beberapa tahapan sebagai berikut.

#### 1) Isolasi DNA Hasil Amplifikasi Gel Agarose

DNA hasil amplifikasi gen 16S rRNA sebanyak 45  $\mu$ l dielektroforesis berukuran lebih kurang 1.500 bp, kemudian diisolasi dengan metode *Glass Powder* (Volstein dan Gillespie, 1979). Hasil amplifikasi gen 16S rRNA yang telah diisolasi dari agarose kemudian diukur konsentrasinya dengan *spot test* DNA. DNA hasil

isolasi siap digunakan, yaitu diligasikan pada plasmid vektor pMD20 (Gambar 20), pada lokasi *multi-cloning site*.



**Gambar 20.** T-Vektor pMD20, TAKARA BIO INC

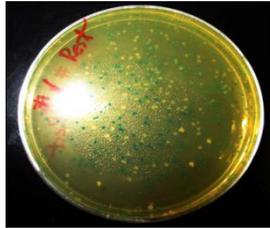
## 2) Ligasi DNA pada Plasmid Vektor pMD20

Ligasi gen 16S rRNA hasil amplifikasi yang berukuran 1.500 bp dilakukan pada T-Vektor pMD20 yang berukuran 2.736 bp. Plasmid dengan DNA *insert* siap ditransformasikan pada bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  kompeten.

## 3) Transformasi Plasmid dengan DNA *Insert* pada Sel Bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$ Kompeten

Plasmid dengan DNA *insert* ditransformasikan pada bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  kompeten. Kultur bakteri hasil transformasi diinkubasikan selama 60 menit pada suhu 37°C dengan agitasi, selanjutnya sebanyak 100  $\mu$ l suspensi bakteri dikultur pada media LB Agar yang mengandung ampisilin dan 40  $\mu$ l 2% X-Gal inokulum

diratakan pada permukaan media, diinkubasikan di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni putih adalah klon yang membawa DNA rekombinan, koloni biru tidak membawa DNA rekombinan (Gambar 21).



**Gambar 21.** Kultur bakteri hasil transformasi pada media LB Agar (koloni putih: klon membawa DNA rekombinan; koloni biru: klon tanpa DNA rekombinan) (dokumentasi pribadi)

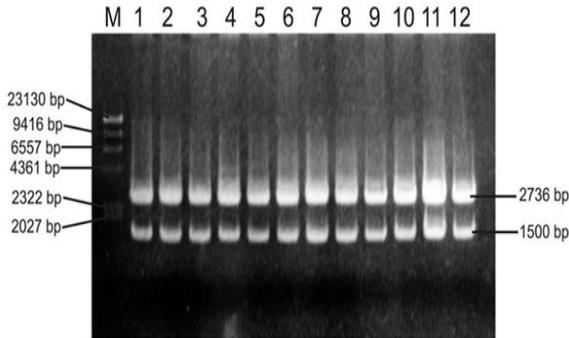
#### 4) Isolasi Plasmid dengan DNA Rekombinan dari Sel Bakteri *E. coli*

Satu koloni berwarna putih diinokulasikan dalam 4 ml media LB cair yang mengandung 4 µl ampisilin, diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam dengan agitasi. Selanjutnya, plasmid siap diisolasi.

Kultur bakteri sebanyak 1,5 ml disentrifugasi 15.000 rpm, 30 detik pada suhu ruang, supernatan diambil dengan aspirasi, pelet ditambah 150 µl larutan I, dihomogenkan dengan *vortex mixer* selama 30 detik, ditambah 180 µl larutan II, dihomogenkan dengan *vortex mixer* sampai larutan tampak jernih, ditambahkan 150 µl larutan III, dihomogenkan kembali dengan *mixer* sampai larutan tampak jernih. Suspensi bakteri selanjutnya disentrifugasi 15.000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang.

Supernatan dipindahkan pada tabung baru, ditambah 400  $\mu\text{l}$  larutan fenol  $\text{CHCl}_3$  (1:1), dilakukan *vortex mixer* tiga kali masing-masing 10 detik, disentrifugasi 15.000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang. Fase air yang ada pada bagian atas dipindahkan pada tabung baru. Fase air yang mengandung plasmid ditambah 1.000  $\mu\text{l}$  etanol absolut (96%), disentrifugasi 15.000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang. Supernatan diambil dengan aspirasi, kemudian *pellet* dicuci dengan 1.000  $\mu\text{l}$  70% etanol, dilakukan *vortex mixer* sampai *pellet* lepas.

*Pellet* ditambah 20  $\mu\text{l}$  TE steril dan 0,1  $\mu\text{l}$  RNase *stock*, diinkubasikan 20 menit 37°C atau 1–6 jam pada suhu ruang/semalam. Untuk melihat DNA rekombinannya dicek dengan dipotong menggunakan enzim *BamHI* dan *Hind III* (1  $\mu\text{l}$  10 $\times$  medium *buffer*; 2  $\mu\text{l}$  DNA sampel; 6,4  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ ; 0,3  $\mu\text{l}$  *BamHI*, dan 0,3  $\mu\text{l}$  *Hind III*) diinkubasikan 37°C dalam *waterbath* selama 1 jam. Hasil pemotongan DNA rekombinan dicek dengan elektroforesis 1% gel agarose, ditunjukkan pada Gambar 22.



**Gambar 22.** Hasil pemotongan DNA rekombinan menggunakan enzim *Bam*HI dan *Hind* III (T-Vektor pMD20, TAKARA BIO INC berukuran 2.736 bp, dan DNA sisipan berukuran 1.500 bp)

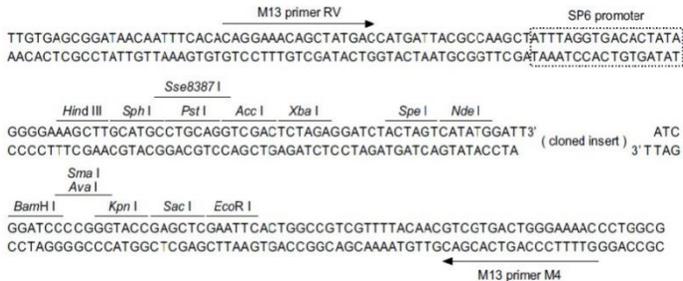
## D. SEKUENSING GEN 16S RRNA

### 1) PCR untuk Sekuensing

PCR menggunakan program sekuens ABI (0,3 µg DNA sampel; 3,2 pmol/µl primer; 2,0 µl 1/8× *Big Dye* ver. 3.1; dH<sub>2</sub>O sehingga total campuran 5 µl). Susunan primer yang digunakan untuk PCR dan sekuensing dapat dilihat pada Tabel 10. Posisi primer M13-RV dan M13-40 pada T-Vektor pMD20 ditunjukkan pada Gambar 23.

**Tabel 10.** Susunan primer untuk sekuensing gen 16S rRNA bakteri

No.	Primer	Sekuens
1.	M13-RV	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
2.	U515F	5'-GTG CCA GCA GCC GCG GTA A-3'
3.	M13-40	5'- GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'



**Gambar 23.** Sekuens T-Vektor pMD20 TAKARA BIO INC

## 2) Pemurnian Hasil PCR untuk Sekuensing

Pemurnian hasil PCR untuk sekuensing, sebanyak 5 µl produk PCR ditambah 4 µl dH<sub>2</sub>O dan 1 µl 3M Na *Acetat* (pH 5,3), ditambah 25 µl etanol *absolute*, diinkubasi 15 menit pada suhu ruang, disentrifugasi 15.000 rpm selama 20 menit pada suhu ruang. Supernatan diambil menggunakan pipet, *pellet* ditambah 200 µl 70% etanol, disentrifugasi 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang. Supernatan diambil menggunakan pipet, *pellet* dikeringkan pada keadaan vakum selama 5–10 menit. Sampel DNA siap disekuensing, atau disimpan pada suhu minus 20°C.

## 3) Sekuensing

Sampel DNA setelah dimurnikan ditambah 12 µl Hi-Di Formamide (*applied Biosystems* USA), didenaturasi dengan cara dipanaskan pada suhu 95°C selama 2 menit, kemudian langsung dimasukkan ke dalam es selama 5 menit. Selanjutnya DNA yang

telah didenaturasi dipindahkan pada 96-wel *plate* untuk sekuensing. Sekuensing DNA dilakukan pada alat sekuenser *ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer*. Hasil sekuensing berupa *file electropheno Gram* (Lampiran 1) dan urutan basa DNA (Lampiran 2).

#### **4) Alignment Sekuens Gen 16S rRNA**

Data sekuens gen 16S rRNA yang telah disimpan dalam format FASTA kemudian diisikan ke dalam program CLUSTAL X untuk dilakukan penyejajaran. Penyejajaran (*alignment*) dilakukan untuk menata sekuens 16S rRNA dari setiap isolat sehingga sekuens antara isolat satu dan isolat yang lainnya diletakkan sesuai dengan posisi homologi antarsekuens. Berdasarkan hasil penyejajaran dapat dibandingkan antara sekuens 16S rRNA dari masing-masing isolat yang akan diklasifikasikan. Semua sekuens yang telah disejajarkan ditata dalam satu *file* yang dibuat dalam format PHYLIP (*file name. phy*) disimpan dalam direktori CLUSTAL X (misalnya C:\CLUSTALX\filename.phy) sehingga dapat dibaca oleh program PHYLIP yang akan digunakan untuk mengonstruksi *phylogeny tree*.

# 6

## BAB

# KEANEKARAGAMAN GENETIK

## *Salmonella typhi*

**B**akteri *S. typhi* merupakan bakteri batang Gram-negatif yang komponen selnya serupa dengan bakteri batang Gram-negatif yang lain, seperti *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*. Komponen penyusun dinding sel bakteri yang utama adalah peptidoglikan, baik bakteri Gram-negatif maupun Gram-positif. Peptidoglikan adalah molekul yang tersusun atas kombinasi antara peptida dan karbohidrat. Molekul ini mempunyai kemampuan untuk menimbulkan terjadinya respons imun sehingga dapat menstimulasi terbentuknya antibodi. Berdasarkan struktur membran dan dinding sel bakteri tersebut sangat dimungkinkan adanya epitop yang serupa (*epitope sharing*), yang berakibat pada terjadinya reaksi silang pada antibodi yang terbentuk (Willke dkk., 2002; Novianti, 2006; Wain dan Hosoglu, 2008).

Karakter yang dapat mengelompokkan kelima isolat *S. typhi* menjadi satu kluster (kluster I) adalah ketidakmampuannya dalam memfermentasikan laktosa karena tidak memiliki enzim  $\beta$ -galaktosidase, tidak memiliki enzim arginin dehidrolase, dan

enzim ornithin dekarboksilase. Sebagian besar (80%) dari anggota kluster mampu menghasilkan H<sub>2</sub>S, kecuali *S. typhi* NCTC 786 (Amarantini, 2011).

**Tabel 11.** Karakteristik kluster hasil klasifikasi 14 isolat bakteri batang Gram-negatif dengan satu *strain* acuan *S. typhi* NCTC 786 anggota familia *Enterobacteriaceae* didasarkan atas analisis *Simple Matching Coefficient* (S<sub>SM</sub>) dan algoritma UPGMA dan berdasarkan persentase respons positif

Karakteristik	Kluster			
	I	II	III	IV
β-galaktosidase	0	66,7	100	80
Arginin dihidrolase	0	33,3	50	80
Ornithin dekarb.	0	66,7	100	80
H <sub>2</sub> S	80	33,3	0	0
Ferm/Oks.D-arabinosa	0	0	0	100
Ferm/Oks.L-sorbosa	0	100	0	0
Ferm/Oks.Dulsitol	0	100	0	0
Ferm/Oks.Inositol	0	0	100	0
Ferm/Oks.Metil-α-D-glukopiranosida	0	0	0	100
Ferm/Oks.D-selobiosa	0	0	0	100
Ferm/Oks.D-rafinosa	0	0	0	100
Ferm/Oks.Xilitol	0	0	100	0
Ferm/Oks.Gentiobiosa	0	0	0	80
Ferm/Oks.D-turanosa	0	0	0	20
Ferm/Oks.L-lixosa	0	0	100	0
Ferm/Oks.D-tagatosa	0	100	0	0
Ferm/Oks.D-fukosa	0	100	0	0

**Tabel 11.** Karakteristik kluster hasil klasifikasi (lanjutan)

Karakteristik	Kluster			
	I	II	III	IV
Ferm/Oks.D-arabitol	0	0	0	100
Ferm/Oks.Pot. 5-ketoglukonat	0	100	0	0

Kluster I beranggotakan dua isolat *S. typhi* (KD 30.3 dan KD 30.4) yang berasal dari sampel yang sama dengan nilai similaritas 95,4%. Perbedaan karakter antara kedua isolat tersebut pada kemampuannya dalam menghidrolisis gelatin, memfermentasikan arabinosa, dan resistansi terhadap kloramfenikol. Kejadian ini menunjukkan bahwa seseorang bisa terinfeksi oleh jenis bakteri yang sama, tetapi memiliki beberapa perbedaan karakter termasuk resistansi terhadap jenis antibiotik yang sama pula.

Berdasarkan kemampuannya memfermentasi xilosa dan arabinosa, ada empat biotipe. **Biotipe I** adalah kelompok *strain* yang mampu memfermentasikan xilosa, tetapi tidak memfermentasikan arabinosa (xilosa positif, arabinosa negatif), **biotipe II** (xilosa negatif, arabinosa negatif), **biotipe III** (xilosa positif, arabinosa positif), dan **biotipe IV** (xilosa negatif, arabinosa positif) (Quintaes dkk., 2002). Semua isolat *S. typhi* yang masuk dalam kluster I termasuk biotipe I. Hal ini berbeda dengan yang dilaporkan Darmawati dkk. (2011) bahwa enam isolat *S. typhi* yang berasal dari Magelang, Salatiga, Surakarta, dan Yogyakarta termasuk biotipe III, yaitu bakteri *S. typhi* yang mampu memfermentasikan xilosa dan arabinosa.

Klaster II beranggotakan tiga isolat yang tersusun atas nodus dua beranggotakan dua isolat (BA 30.1 dan BA 30.2) dan BA 30.5 yang tergabung dalam nodus 9 pada nilai similaritas 88,2%. Karakter yang mampu mengelompokkan ketiga isolat anggotanya karena kemampuannya dalam memfermentasikan L-arabinosa, L-sorbitol, dulsitol, D-tagatosa, dan potasium 5 ketoglukonat. Nodus 2 beranggotakan dua isolat *E. coli* yang berasal dari sampel yang sama (*E. coli* BA 30.1 dan BA 30.2), nilai similaritas kedua isolat tersebut adalah 97,4%, sedangkan perbedaan karakter dari keduanya pada arginin dehidrolase, kemampuan dalam memfermentasi D-melibiosa dan tipe hemolisisnya (*E. coli* BA 30.1  $\beta$  hemolisis, *E. coli* BA 30.2  $\gamma$  hemolisis).

Nodus 9 beranggotakan dua isolat dari nodus 2 dan satu isolat *Salmonella* sp. BA 30.5. Tiga isolat anggota klaster II berasal dari sampel yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa dari sampel darah pasien yang sama dapat diisolasi lebih dari satu jenis bakteri dan setiap bakteri dari jenis yang sama dapat memiliki perbedaan karakter fenotipik.

Klaster III beranggotakan dua isolat *Ser. marcescens* KD 08.4 dan KD 08.5 yang tersusun pada nodus 5 dengan nilai similaritas 94,7%. Karakter yang dapat memisahkan menjadi klaster tersendiri adalah kemampuannya untuk memfermentasi inositol, xilitol, L-lixosa, dan L-arabitol, sedangkan ketiga klaster yang lain tidak memiliki kemampuan tersebut. Perbedaan karakter kedua isolat tersebut pada hasil uji arginin dihidrolase, fermentasi arabinosa, D-xilosa, D-galaktosa, dan resistansi pada antibiotik sefotaksim. Perbedaan resistansi dari dua isolat *Ser. marcescens* yang berasal

dari sampel yang sama terhadap sefotaksim tidak berbeda dengan perbedaan resistansi dua isolat *S. typhi* dari sampel yang sama pula terhadap kloramfenikol yang terdapat pada klaster I. Pola resistansi terhadap antibiotik tersebut menunjukkan bahwa pola resistansi pada isolat yang berbeda dari anggota spesies yang sama dapat memiliki pola resistansi terhadap antibiotik yang berbeda. Hal ini terjadi kemungkinan karena seseorang dapat terinfeksi oleh isolat yang berbeda dari spesies yang sama.

Klaster IV beranggotakan lima isolat yang bersifat memfermentasikan laktosa secara cepat karena memiliki enzim  $\beta$ -galaktosidase dan enzim  $\beta$ -galaktoside permiase. Lima isolat bakteri terdiri atas empat isolat *Enterobacter cloacae*, yaitu BA 45.4.1, TG 03.5, KT 16, dan SA 02.1 serta 1 isolat *Klebsiella pneumoniae* KD 58.4. Karakter yang menyebabkan menjadi klaster tersendiri selain kemampuannya dalam memfermentasikan laktosa, yaitu karena kemampuannya memfermentasikan D-arabinosa, metil  $\alpha$ -D-glukopiranosida, D-selobiosa, D-rafinosa, dan D-arabitol. *Strain* anggota klaster IV terbagi menjadi empat nodus, yaitu nodus 6, 8, 10, dan 11. Nodus 6 beranggotakan dua isolat *Enterobacter cloacae* (TG 03.5 dan BA 45.4.1) dengan nilai similaritas 93,4%. Nodus 8 beranggotakan dua isolat dari nodus 6 dan satu isolat *Enterobacter cloacae* KT 16 dengan nilai similaritas 91,4%, sedangkan nodus 10 beranggotakan nodus 8 dan satu isolat SA 02.1 dengan nilai similaritas 85,5%. Nodus 11 beranggotakan empat isolat dari nodus 10 dan satu isolat *Klebsiella pneumoniae* KD 58.4 dengan nilai similaritas 83,9%.

Klaster I dan II bergabung dalam nodus 12 dengan nilai similaritas 80,0%, kemudian nodus 12 dan nodus 5 (klaster III) bergabung dalam nodus 13 dengan nilai similaritas 70,4%. Nodus 13 bergabung dengan klaster IV pada nodus 14 dengan nilai similaritas 67,5%.

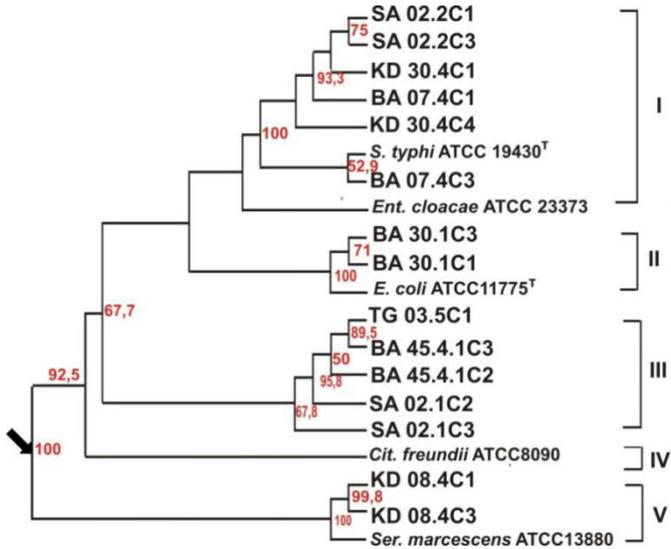
Klaster yang beranggotakan isolat *S. typhi* bergabung dengan klaster yang beranggotakan isolat *E. coli* pada nilai similaritas 80%. Kedua kelompok tersebut bergabung dengan klaster yang beranggotakan isolat *Ser. marcescens* pada nilai similaritas 70,4%, kemudian bergabung pada klaster yang beranggotakan isolat *Ent. cloacae* pada nilai similaritas 67,5%.

Dendogram dari 14 isolat bakteri batang Gram-negatif anggota familia *Enterobacteriaceae* disusun berdasarkan sistematika numerik fenetik, yaitu sistematika menurut Priest dan Austin (1993) yang prinsip dasarnya menggunakan banyak karakter biologi. Dendogram tersebut disusun berdasarkan 76 karakter yang mampu mengelompokkan menjadi empat klaster, yang mana klaster I tersusun atas isolat bakteri anggota *S. typhi*, klaster II tersusun atas isolat bakteri anggota *E. coli* dan *Salmonella* sp., klaster III tersusun atas isolat bakteri anggota *Ser. marcescens*. Ketiga klaster tersebut bergabung pada nilai similaritas 70,4%, kemudian bergabung dengan klaster IV yang beranggotakan isolat *Ent. cloacae* dan *Kleb. pneumoniae* pada nilai similaritas 67,5%. Sistematika numerik fenetik yang ditampilkan dalam bentuk dendogram tersebut mempunyai tingkat resolusi diskriminatif yang baik sehingga dapat memisahkan isolat-isolat yang sama dari anggota setiap spesies pada klaster yang berbeda sehingga dapat digunakan untuk klasifikasi

sampai tingkat spesies dan untuk menentukan karakter yang dapat memisahkan kluster. Hasil ini berbeda dengan yang disampaikan oleh Sembiring dan Goodfellow (2001) dan Vandamme dkk. (1996) bahwa sistematika klasifikasi numerik fenetik dapat digunakan untuk identifikasi sampai pada tingkat genus.

## **1. SISTEMATIKA MOLEKULER BAKTERI BATANG GRAM-NEGATIF ANGGOTA FAMILIA *ENTEROBACTERIACEAE* BERDASARKAN SEKUENS GEN 16SRRNA**

Hasil analisis hubungan filogenetik berdasarkan sekuens gen 16S rRNA ditunjukkan pada Gambar 24. Sebanyak 15 sekuens, masing-masing isolat dua sekuens gen 16S rRNA yang berasal dari dua klon, kecuali isolat TG 03.5, dan 5 sekuens sebagai pembandingan berasal dari sekuens 16S rRNA bakteri batang Gram-negatif familia *Enterobacteriaceae* (Gen Bank, NCBI) yang terdiri atas tipe *strain* *S. typhi* ATCC 19430<sup>T</sup> (Accession No. Z47544), *E. coli* 11775<sup>T</sup> (×80725.1), *Ent. cloacae* ATCC 23373 (HQ651841.1), *Citrobacter freundii* ATCC 8090 (AJ233408.1), dan *Ser. marcescens* ATCC 13880 (AB594756.1). Dua *strain* sebagai kelompok luar (*out group*) yang digunakan adalah *Vibrio cholera* ATCC 14547 (NR\_044050.1) dari familia *Vibrionaceae* (katalase negatif dan oksidase positif) dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23993 (FJ652615.1) dari familia *Pseudomonadaceae* (katalase dan oksidase positif).



**Gambar 24.** Pohon filogeni yang dikonstruksi berdasarkan *Algorithm Neighbour Joining* (Saitou dan Nei, 1987) yang menunjukkan hubungan kekerabatan antara delapan isolat (15 klon) bakteri batang Gram-negatif anggota familia *Enterobacteriaceae*, dengan lima *strain* bakteri anggota *Enterobacteriaceae* sebagai acuan atas dasar sekuen gen 16S rRNA; penentuan lokasi *root* menggunakan *out group strain Vibrio cholera* ATCC 14547 anggota familia *Vibrionaceae* dan *strain Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23943 anggota familia *Pseudomonadaceae*

Sekuen gen 16S rRNA setelah disejajarkan (*dialing*) menggunakan program CLUSTAL X, pohon filogenetik disusun menggunakan program PHYLIP, matriks similaritas dan perbedaan jumlah nukleotida 16S rRNA antarisolat dan antarklon dikonstruksi menggunakan program PHYDIT.

Analisis hubungan filogenetik 15 klon gen 16S rRNA dari delapan isolat (Gambar 27) terbagi menjadi lima *clade*. *Clade* pertama terdiri atas enam klon gen 16S rRNA yang berasal dari tiga isolat (SA 02.2, KD 30.4, dan BA 07.4) dan dua *strain* acuan, yaitu *S. typhi* ATCC 19430<sup>T</sup> serta *Ent. cloacae* ATCC 23373. Nilai similaritas keenam klon tersebut dengan *S. typhi* ATCC 19430<sup>T</sup> sebesar 99,4–100% dengan perbedaan 0–9 nukleotida, ditunjukkan pada Tabel 12.

**Tabel 12.** Matriks similaritas dan perbedaan nukleotida sekuen gen 16S rRNA bakteri batang Gram-negatif anggota familia *Enterobacteriaceae* pada *clade* pertama dengan *strain* acuan *S. typhi* ATCC 19430<sup>T</sup>

Kode Isolat	SA022C3	SA022C1	BA074C1	KD304C1	KD304C3	BA074C3	<i>S. typhi</i> ATCC 19430 <sup>T</sup>	<i>Ent. cloacae</i> ATCC 23373
SA022C3	---	4/1502	2/1503	2/1503	9/1500	5/1500	9/1503	27/1498
SA022C1	99.73	---	2/1502	2/1502	9/1499	5/1499	9/1502	27/1497
BA074C1	99.87	99.87	---	0/1503	7/1500	3/1500	7/1503	25/1498
KD304C1	99.87	99.87	100	---	7/1500	3/1500	7/1503	25/1498
KD304C3	99.4	99.4	99.53	99.53	---	6/1499	9/1500	28/1495
BA074C3	99.67	99.67	99.8	99.8	99.6	---	3/1500	22/1495
<i>S. typhi</i> ATCC 19430 <sup>T</sup>	99.4	99.4	99.53	99.53	99.4	99.8	---	27/1504
<i>Ent. cloacae</i> ATCC23373	98.2	98.2	98.33	98.33	98.13	98.53	98.2	---

Berdasarkan nilai similaritas nukleotida maka dapat disimpulkan bahwa isolat SA 02.2, KD 30.4, dan BA 07.4 diidentifikasi sebagai

anggota *S. typhi*. Dua klon 16S rRNA yang berbeda, berasal dari satu isolat juga menunjukkan adanya perbedaan nukleotida.

*Clade* kedua beranggotakan 2 klon gen 16S rRNA yang berasal dari satu isolat BA 30.1, dengan *strain* acuan *E. coli* ATCC 19430<sup>T</sup> pada nilai similaritas 99,38–99,67% dengan perbedaan 5–9 nukleotida (Tabel 13). Isolat BA 30.1, berdasarkan kedekatannya dengan *strain* acuan, diidentifikasi sebagai anggota *E. coli*.

**Tabel 13.** Matriks similaritas dan perbedaan nukleotida sekuen gen 16S rRNA bakteri batang Gram-negatif anggota familia *Enterobacteriaceae* pada *clade* kedua dan *strain* acuan *E. coli* ATCC 19430<sup>T</sup>

Kode Isolat	BA301C1	BA301C3	<i>E. coli</i> ATCC11775T
BA301C1	---	5/1503	8/1447
BA301C3	99.67	---	9/1447
<i>E. coli</i> ATCC11775T	99.45	99.38	---

*Clade* ketiga beranggotakan lima klon gen 16S rRNA yang berasal dari tiga isolat (BA 45.4.1, SA 02.1, dan TG 03.5). Kedekatan tiga isolat bakteri yang berasal dari Puskesmas Bangetayu, RSUD Tugurejo, dan RSI Sultan Agung ditunjukkan pada nilai similaritas 99,0–99,87% dengan perbedaan 2–15 nukleotida (Tabel 14).

**Tabel 14.** Matriks similaritas dan perbedaan nukleotida sekuen gen 16S rRNA bakteri batang Gram-negatif anggota familia *Enterobacteriaceae* pada *clade* ketiga dan *strain* acuan *Ent. cloacae* ATCC23373

Kode Isolat	BA4541C3	TG035C1	SA021C2	BA4541C2	SA021C3	<i>Ent. cloacae</i> ATCC23373
BA4541C3	---	2/1500	7/1500	6/1499	12/1499	32/1495
TG035C1	99.87	---	5/1502	4/1501	10/1502	30/1498
SA021C2	99.53	99.67	---	9/1501	15/1501	31/1497
BA4541C2	99.6	99.73	99.4	---	12/1500	32/1496
SA021C3	99.2	99.33	99	99.2	---	23/1497
<i>Ent. cloacae</i> ATCC23373	97.86	98	97.93	97.86	98.46	---

Jumlah *copy* gen 16S rRNA pada bakteri bervariasi (1–15 *copy*) dalam setiap genom, setiap *copy* berukuran lebih kurang 1.500 bp. Marchandin dkk. (2003) menyatakan bahwa sekuen gen 16S rRNA pada setiap *copy* dalam setiap organisme adalah identik, perbedaan nukleotida antar-*copy* gen 16S rRNA disebut mikroheterogenitas. Sekuen gen 16S rRNA pada dua klon gen 16S rRNA yang berbeda dari isolat yang sama menunjukkan adanya kesamaan/kemiripan nukleotida, pada nilai similaritas 99–100%. Hasil penelitian ini senada dengan yang disampaikan oleh Marchandin dkk. (2003), bahwa empat *copy* gen 16S rRNA pada satu *strain* bakteri *Veillonilla* sp. ADV 360.1 menunjukkan dua *copy* gen identik (nilai similaritas 100%) dan dua *copy* gen bervariasi (nilai similaritas 98,5–99,8%).

*Clade* keempat beranggotakan satu *strain* acuan *Citrobacter freundii* ATCC 8090. *Clade* kelima beranggotakan dua klon yang berasal dari isolat KD 08.4 (similaritas 99,53–99,8%) dan satu *strain* acuan *Ser. marcescens* ATCC 13880 dengan perbedaan jumlah nukleotida sebanyak 3–7 nukleotida, ditunjukkan pada Tabel 15.

**Tabel 15.** Matriks similaritas dan perbedaan nukleotida sekuen gen 16S rRNA bakteri batang Gram-negatif anggota familia *Enterobacteriaceae* pada *clade* kelima dan *strain* acuan *Ser. marcescens* ATCC13880

Kode Isolat	KD084C3	KD084C1	<i>Ser. marcescens</i> ATCC13880
KD084C3	---	3/1502	7/1488
KD084C1	99.8	---	6/1489
<i>Ser. marcescens</i> ATCC13880	99.53	99.6	---

Berdasarkan nilai similaritas nukleotida tersebut dapat disimpulkan bahwa isolat KD 08.4 teridentifikasi sebagai isolat *Ser. marcescens* KD 08.4 yang termasuk anggota *Ser. marcescens*.

Pohon filogeni yang dikonstruksi berdasarkan *Algorithm Neighbour Joining* (Saitou dan Nei, 1987) menunjukkan hubungan kekerabatan antara delapan isolat bakteri batang Gram-negatif asal darah pasien Widal positif, yang termasuk familia *Enterobacteriaceae*, masing-masing isolat terdiri atas dua klon gen 16S rRNA, kecuali isolat TG 03.5, dengan lima *strain* acuan (*Ser. marcescens* ATCC 13880, *Cit. freundii* ATCC 8090, *Ent. cloacae*

ATCC 23373, *E. coli* ATCC 11775<sup>T</sup>, dan *S. typhi* ATCC 19430<sup>T</sup>) berdasarkan sekuen gen 16S rRNA. Berdasarkan hasil konstruksi tersebut tampak bahwa isolat-isolat yang terdapat pada darah Widal positif adalah *Ser. marcescens* KD 08.4, *E. coli* BA 30.1, *S. typhi* BA 07.4, *S. typhi* KD 30.4, dan *S. typhi* SA 02.2, serta isolat *Ent. cloacae* SA 02.1, *Ent. cloacae* BA 45.4.1, *Ent. cloacae* TG 03.5 yang memiliki hubungan kekerabatan paling dekat dengan *Ent. cloacae* ATCC 23373. Nilai similaritas kedelapan isolat (15 klon gen 16S rRNA) tersebut berkisar antara 97,86–100%, senada dengan yang dilaporkan oleh Chang dkk. (1997).

Identifikasi bakteri selain menggunakan sistematika numerik berdasarkan karakter fenotipik dan sistematika kimiawi, dapat pula menggunakan sistematika molekuler berdasarkan karakter asam nukleat, seperti berdasarkan gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA adalah gen yang bersifat *conserved*, yang terdapat pada semua bakteri, selain itu dapat untuk mengklasifikasikan bakteri berdasarkan hubungan kekerabatan. Analisis tingkat genomik memiliki kemampuan lebih baik dibandingkan dengan analisis protein karena analisis genomik tidak mengandalkan ekspresi gen-gen tertentu yang menyandi protein dan dapat mengakibatkan terjadinya variasi fenotipe (Priest dan Austin, 1993; Vandamme dkk., 1996; Giammanco dkk., 1999).

## **2. PROFIL SENSITIVITAS BAKTERI BATANG GRAM-NEGATIF ANGGOTA FAMILIA *ENTEROBACTERIACEAE* TERHADAP ANTIBIOTIK**

Sensitivitas bakteri batang Gram-negatif anggota familia *Enterobacteriaceae* terhadap enam jenis antibiotik ditunjukkan pada

Tabel 16. Hasil uji sensitivitas 14 isolat bakteri menunjukkan bahwa 93,3% sensitif terhadap kloramfenikol, 86,7% sensitif terhadap siprofloksasin, 66,7% sensitif terhadap gentamisin, berturut-turut sensitif terhadap sefotaksim (60%), trimetoprim-sulfametoksazol (60%), dan ampisilin (53,3%). Hal ini seperti yang dilaporkan Tjaniadi dkk. (2003) bahwa bakteri enterik patogen di Indonesia, seperti *Shigella* spp., *Vibrio cholera*, *V. parahaemolyticus*, *S. typhi*, dan *S. paratyphi* A mengalami penurunan sensitivitas terhadap 8 jenis antibiotik (ampisilin, trimetoprim-sulfametoksazol, kloramfenikol, siprofloksasin, tetrasiklin, sepalotin, seftriason, dan norfloksasin). Demikian pula kejadian di Sulawesi Selatan, bahwa resistansi *S. typhi* terhadap kloramfenikol meningkat setiap tahunnya dari 1,04% pada tahun 2001 menjadi 7,84% pada tahun 2007 (Hatta dan Ratnawati, 2008).

Resistansi terhadap antibiotik lini pertama (ampisilin, trimetoprim-sulfametoksazol, kloramfenikol, dan gentamisin) dikarenakan bakteri memiliki R-plasmid (*resistance plasmid*) yang membawa satu atau lebih gen yang mengode protein yang dapat merusak antibiotik, misalnya dengan terjadinya asetilasi kloramfenikol dan golongan aminoglisida yang lain (Tjaniadi dkk., 2003; Willey dkk., 2009), sedangkan resistansi terhadap antibiotik lini ketiga, yaitu golongan kuinolon seperti siprofloksasin karena terjadinya mutasi pada gen *gyr A* atau *gyr B* yang berada pada kromosom (Anonim, 2001; Thong dkk., 2000; Hirose dkk., 2003; Mandal dkk., 2004).

**Tabel 16.** Hasil uji sensitivitas bakteri batang Gram-negatif anggota familia *Enterobacteriaceae* pada kultur darah Widal positif terhadap enam jenis antibiotik

No.	Kode Isolat	Nama Isolat	Jenis Antibiotik						
			Kloramfenikol (C30)	Gentamisin (CN 10)	Ampisilin (SAM 20)	Siprofloksasin (CIP 5)	Sefotaksim (CTX 30)	T. Sulfamet (SXT)	
1	BA 07.4	<i>S. typhi</i>	S	-	R	-	R	-	R
2	KD 30.4	<i>S. typhi</i>	S	-	S	-	S	-	S
3	KD 30.3	<i>S. typhi</i>	-	R	S	-	S	-	S
4	SA 02.2	<i>S. typhi</i>	S	-	S	-	S	-	R
5	BA 30.5	<i>Salmonella</i> sp.	S	-	R	-	S	-	R
6	NCTC 786	<i>S. typhi</i>	S	-	S	-	S	-	S
7	KD 08.4	<i>Ser. marcescens</i>	S	-	S	-	R	S	-
8	KD 08.5	<i>Ser. marcescens</i>	S	-	S	-	R	S	-
9	BA45.4.1	<i>Ent. cloacae</i>	S	-	R	-	R	S	-
10	TG 03.5	<i>Ent. cloacae</i>	S	-	S	-	S	-	R
11	SA02.1	<i>Ent. cloacae</i>	S	-	R	S	-	R	-

**Tabel 16.** Hasil uji sensitivitas bakteri batang Gram-negatif anggota familia *Enterobacteriaceae* pada kultur darah Widal positif terhadap enam jenis antibiotik (lanjutan)

No.	Kode Isolat	Nama Isolat	Jenis Antibiotik								
			Kloramfenikol (C30)	Gentamisin (CN 10)	Ampisilin (SAM 20)	Siprofloksasin (CIP 5)	Sefotaksim (CTX 30)	T. Sulfamet (SXT)			
12	KT16	<i>Ent. cloacae</i>	S	-	S	S	-	R	S	-	
13	BA 30.1	<i>E. coli</i>	S	S	-	R	S	-	R	R	
14	BA 30.2	<i>E. coli</i>	S	S	-	R	S	-	R	R	
15	KD 58.4	<i>Kleb. pneumoniae</i>	S	S	S	-	S	-	S	R	
			14	10	8	7	13	2	9	6	6
			93,3%	66,7%	53,3%	46,7%	86,7%	13,3%	60%	40%	40%

Seseorang dapat terinfeksi oleh dua isolat *S. typhi* yang memiliki resistansi berbeda terhadap kloramfenikol, seperti isolat KD 30.4 sensitif terhadap kloramfenikol, sedangkan KD 30.3 resistan karena R-plasmid dapat ditransfer melalui mekanisme konjugasi, transduksi, dan transformasi, baik pada jenis spesies bakteri yang sama maupun yang berbeda pada lingkungan tempat bakteri tersebut berada (Willey dkk., 2009).

Demikian pula dua isolat yang berbeda berasal dari pasien yang sama, tetapi memiliki sensitivitas yang berbeda, seperti *S. typhi* SA 02.2 sensitif terhadap gentamisin, siprofloksasin, dan sefotaksim, sedangkan *Ent. cloacae* SA 02.1 resistan terhadap jenis antibiotik yang sama. Pola sensitivitas ini menunjukkan bahwa pemberian antibiotik pada pasien harus didahului dengan uji sensitivitas terhadap jenis-jenis antibiotik untuk dapat memilih antibiotik yang tepat sehingga efisien dan tidak menimbulkan terjadinya peningkatan resistansi terhadap antibiotik. Demikian pula uji sensitivitas pada satu jenis bakteri terhadap antibiotik yang sama harus dilakukan pada beberapa *strain* dari jenis yang sama pula. Pemberian antibiotik harus berdasarkan hasil uji identifikasi jenis bakteri yang menyebabkan terjadinya infeksi dan uji sensitivitas terhadap antibiotik. Tindakan ini perlu dilakukan karena pemberian antibiotik yang tidak tepat pada pasien akan membunuh bakteri yang sensitif dan meningkatkan pertumbuhan bakteri yang resistan dan akan mengakibatkan meningkatnya resistansi bakteri terhadap antibiotik yang sering disebut dengan MDR (Anonim, 2003a; Kariuki dkk., 2006).



## PENUTUP

**D**eteksi keanekaragaman genetik *Salmonella typhi* dapat menggunakan metode Sistematika Polifasik. Metode Sistematika Polifasik adalah metode yang mengintegrasikan data fenotipik dan genotipik yang terdiri dari (1) sistematika numerik-fenetik (2) sistematika kimiawi, dan (3) sistematika molekular yang dapat untuk mengidentifikasi mikroorganisme secara akurat.

Buku ini diharapkan dapat memotivasi mahasiswa, dosen, peneliti khususnya di bidang bakteriologi klinik, untuk melakukan penelitian yang berhubungan dengan keanekaragaman genetik dari strain-strain bakteri menggunakan metode Sistematika Polifasik. Sehingga hasilnya dapat digunakan untuk mengembangkan metode diagnosa laboratorium penyakit infeksi oleh bakteri.



## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2001. “*Salmonella typhi* – Material Safety Data Sheet- Infectious Substances”. Public Health Agency of Canada.
- Anonim. 2003a. *Background Document: The Diagnosis, Treatment and Prevention of Typhoid Fever*. Communicable Disease Surveillance and Response Vaccines and Biologicals. World Health Organization.
- Amarantini, C., L. Sembiring, H. Kushadiwijaya, dan W. Asmara. 2011. “Identification and Characterization of *Salmonella typhi* Isolates from Southwest Sumba District, East Nusa Tenggara Based on 16S rRNA Gene Sequences”. *Biodiversitas*. 12 (1): 1–6.
- Atlas, R.M. 1977. *Principles of Microbiology*. 2<sup>nd</sup> Edition. Iowa: WMC. Brown Publisher.
- Bourbeau, P.P. dan J.K. Pohlman. 2001. “Three Days of Incubation May Be Sufficient for Routine Blood Cultures with BacT/Alert FAN Blood Culture Bottles”. *Journal of Clinical Microbiology*. 39 (6): 2079–2082

- Brock, T.D. dan M.T. Madigan. 1991. *Biology of Microorganisms*. Hlm. 58–59. America: Printice Hall.
- Darmawati, S., Anwar, S. 2008. “Karakterisasi Protein Hemaglutinin Sub-Unit Pilli *Salmonella typhi* Isolat Jawa”. *Seminar PIT PERMI Purwokerto*, hlm. 1–9.
- Darmawati, S. dkk. 2014. “Phylogenetic Relationship of Gram Negative Bacteria of *Enterobacteriaceae* Family in the Positive Widal Blood Cultures Based on 16S rRNA Gene Sequences”. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 19 (I), hlm. 64–70.
- Darmawati, S., Sembiring, L., dan Asmara, W. 2013. “Chemosystematic of *Enterobacteriaceae* Familia Obtained from Blood Cultures Based on Total Protein Profiles”. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 18 (I), hlm. 46–51.
- Darmawati, S., Sembiring, L., dan Asmara, W. 2011. “Klasifikasi Numerik-fenetik *Salmonella typhi* Asal Jawa Tengah dan Daerah Istimewa Yogyakarta Berdasarkan Hasil Karakterisasi Fenotipik Pendahuluan Metode Penelitian”. *BIOTA Atmajaya Yogyakarta*, 16 (1), hlm. 128–132. Tersedia di <http://jurnal.uaj.ac.id/biota>.
- Fadeel, M.A., B.L. House, M.M. Wasfy, J.D. Klena, E.E. Habashy, M.M. Said, M.A. Maksoud, B.A. Rahman, dan G. Pimentel. 2011. “Evaluation of A Newly Developed ELISA Against Widal, TUBEX-TF and Typhidot for Typhoid Fever Surveillance”. *Journal of Infection in Developing Countries*. 5 (3): 169–175.

- Giammanco, G., S. Pignato, dan G.M. Giammanco. 1999. "Recent Trends in Salmonellosis Epidemiology". *Journal of Prevention Medicine and Hygiene*. 40: 19–24.
- Hatta, M. dan Ratnawati. 2008. "Enteric Fever in Endemic Areas of Indonesia: An Increasing Problem of Resistance". *Journal of Infection in Developing Countries*. 2 (4): 279–282
- Jorgensen, J.H., S. Mirrett, L.C. McDonald, P. Murray, M. P. Weinstein, J. Fune, C.W. Trippy, M. Masterson, dan I. Barthreller. 1997. "Controlled Clinical Comparison of BACTEC Plus Aerobic/F Resin Medium with Bact/Alert Aerobic FAN Medium for Detection of Bacteremia and Fungemia". *Journal of Clinical Microbiology*. 35 (1): 53–58.
- JoVE Science Education Database. 2018. "*Basic Methods in Cellular and Molecular Biology*". *Plasmid Purification*. JoVE, Cambridge, MA.
- Mandal, S., M.D. Mandal, dan N. Kumar Pal. 2004. "Plasmid-encoded Multidrug Resistance of *Salmonella typhi* and Some Enteric Bacteria in and Around Kolkata, India: A Preliminary Study". Published Quartely, Mangalore, South India. ISSN 0972-5997. 3 (4).
- McDonald, L.C., J. Fune, L.B. Gaido, M.P. Weinstein, L.G. Reimer, T.M. Flynn, M.L. Wilson, S. Mirrett, dan L.B. Reller. 1996. "Clinical Importance of Increased Sensitivity of BacT/Alert FAN Aerobic and Anaerobic Blood Culture Bottles". *Journal of Clinical Microbiology*. 34 (9): 2180–2184.

- McDonald, L.C., M.P. Weinstein, J. Fune, S. Mirrett, L.G. Reimer, dan L.B. Reller. 2001. "Controlled Comparison of BacT/ALERT FAN Aerobic Medium and BACTEC Fungal Blood Culture Medium for Detection of Fungemia". *Journal of Clinical Microbiology*. 39 (2): 622–624.
- Novianti, T. 2006. "Pemeriksaan Anti *Salmonella typhi* IgM untuk Diagnosis Demam Tifoid". Informasi Laboratorium. ISSN 0854-7165. No. 5/2006.
- Priest, F. dan B. Austin. 1993. *Modern Bacterial Taxonomy*. Second edition. London: Chapman and Hall.
- Quintaes, B.R., Leal, N.C., Reis, E.M.F., Fonseca, E.L., Hofer, E. 2002. "Conventional and Molecular Typing of *Salmonella typhi* Strains from Brazil". *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 44 (6): 315–319.
- Retnoningsih, Amin. 2014. *DNA Mikrosatelit untuk Identifikasi Grup Genom Pisang. Monograf*. Semarang: UNNES Press.
- Sembiring, L. 2004. "Peranan Biosistemika dalam Menunjang Pemanfaatan Keanekaragaman Hayati". Seminar Nasional Biologi. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Thong, K.L., M. Altwegg, dan T. Pang. 2000. "Comparative Analysis of *Salmonella typhi* by rRNA Gene Restriction and Phage Typhing". *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 3 (5): 738–739.

- Tjaniadi, P. dkk. 2003. "Antimicrobial Resistance of Bacterial Pathogens Associated with Diarrheal Patients in Indonesia". *J. Trop. Med. Hyg.* 68 (6): 666–670.
- Towns, M.L., W.M. Robert Jarvis, dan P-R. Hsueh. 2010. "Guidelines on Blood Cultures". *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 43 (4): 347–349.
- Vandamme, P., B.P.M. Gillis, P. de Vos, K. Kerstres, dan J. Swings. 1996. "Polyphasic Taxonomy, A Consensus Approach to Bacterial Systematic". *Microbiology Reviews.* 60 (2): 407–438.
- Virdi, J.S. dan P. Sachdeva. 2005. "Genetic Diversity of Pathogenic Microorganisms: Basic Insights, Public Health Implications and the Indian Initiatives". *Current Science.* 89 (1): 113–123.
- Wain, J. dan S. Hosoglu. 2008. "The Laboratory Diagnosis of Enteric Fever". *Review Article. Journal Infect Developing Countries.* 2 (6): 421–425.
- Willke, A., O. Ergonul, dan B. Bayar. 2002. "Widal Test in Diagnosis of Typhoid Fever in Turkey". *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 9 (4): 938–941.
- Willey, J.M., L.M. Sherwood, dan C.J. Woolverton. 2009. *Prescott's Principles of Microbiology.* Americans, New York: McGraw-Hill Higher Education.



## GLOSARIUM

16S rRNA (ribosomal RNA)	: Subunit penyusun ribosom dengan ukuran pengendapan 16S (Svedberg merupakan satuan kecepatan pengendapan molekul ketika disentrifugasi). Molekul 16S rRNA memiliki sekuens yang digunakan untuk mempelajari filogenetik dan taksonomi bakteri karena merupakan <i>marker housekeeping gene</i> .
Absorbansi	: Serapan sinar oleh benda pada panjang gelombang tertentu.
Agitasi	: Proses pencampuran menggunakan panas dan gerakan.
Aglutinasi	: Reaksi ikatan antigen dan antibodi sehingga membentuk gumpalan halus dan kecil.
Antigen	: Benda asing yang masuk ke dalam tubuh dan dapat menimbulkan respons imun.

Bakteremia	: Pertumbuhan bakteri yang terdapat pada darah dan dapat dideteksi untuk menentukan diagnosis.
Bakteri enterik	: Kelompok bakteri yang umumnya hidup dalam saluran pencernaan.
Biotipe	: <i>Strain</i> bakteri yang memiliki kemampuan tertentu dalam menguraikan media pertumbuhan.
Clade	: Suatu kelompok taksonomi yang berasal dari satu leluhur yang sama.
Debris	: Bagian sel/membran sel sisa isolasi DNA dan RNA.
Dendogram	: Diagram berbentuk percabangan menyerupai pohon yang menunjukkan derajat kesamaan antara satu kelompok takson dengan kelompok takson lain.
Ekstraksi	: Proses pengambilan materi organik/kimia dalam organisme.
Epitop	: Sisi pengenalan pada bakteri, biasanya terletak pada permukaan bakteri sehingga bisa dikenali oleh sistem imun tubuh.
Eukaryot	: Organisme yang memiliki membran inti sehingga membentuk komponen sel yang disebut nukleus.

Faktor virulen	: Faktor-faktor penyebab sakit karena bagian dari struktur virus yang terdapat pada tubuh makhluk hidup.
Fenotipik	: Informasi pada organisme yang berisi ciri-ciri atau penampakan luar organisme tersebut.
Fermentasi	: Proses penguraian substrat menggunakan bakteri untuk memperoleh produk tertentu secara anaerob.
Filogenetik	: Hubungan kekerabatan.
Flagel	: Bagian dari alat gerak pada bakteri yang tersusun dari protein flagelin.
Gastroenteritis	: Infeksi pada organ atau saluran pencernaan.
Genom	: Keseluruhan materi genetik yang terdapat pada organisme.
Genotipik	: Informasi pada organisme yang berisi tentang materi genetik/asam nukleat.
Gram-negatif	: Jenis bakteri yang memiliki peptidoglikan tipis dan <i>double membrane cell</i> dan berwarna merah ketika pewarnaan Gram oleh safranin.
Gram-positif	: Jenis bakteri yang memiliki peptidoglikan tebal dan membran sel tunggal, berwarna ungu ketika pewarnaan Gram oleh kristal violet.

Hidrolisis	: Reaksi yang di dalamnya terdapat pemecahan molekul air.
Homogen	: Memiliki kesamaan atau dapat menyatu.
Infeksi sistemik	: Serangan mikroorganisme yang sudah menyebar ke bagian lain pada tubuh.
Isolasi	: Memisahkan dari sesuatu yang lain.
Klaster	: Kelompok berdasarkan kategori tertentu.
Kloning gen	: Perbanyak gen, dapat dilakukan secara <i>in vivo</i> atau <i>in vitro</i> .
Konjugasi	: Perpindahan materi genetik dari satu sel ke sel lain yang terjadi pada bakteri atau mikroorganisme lain.
MVSP ( <i>Multi-Varate Statistical Package</i> )	: Program statistik untuk melakukan analisis numerik dari data-data yang didapatkan.
Numerik fenetik	: Kuantifikasi unit taksonomi berdasarkan banyaknya sifat-sifat tertentu yang sama.
Patogen	: Agen biologis penyebab suatu penyakit.
Pellet	: Bagian endapan hasil sentrifugasi pada sampel.
Perforasi	: Terjadinya pelubangan pada suatu sel.

Polifasik	: Kisaran atau cakupan informasi tertentu untuk taksonomi.
Prokaryot	: Sel yang tidak memiliki membran inti.
Purifikasi	: Pemurnian
Rekombinan	: Suatu hasil gabungan, misalnya penggabungan suatu DNA dengan DNA lain.
Resistan	: Tahan
Rentrifugasi	: Proses pemisahan molekul menggunakan gaya putar atau sentrifugasi.
Serotipe	: Suatu kelompok mikroorganisme berdasarkan komponen permukaan sel yang dapat menimbulkan respons imun.
Similaritas	: Derajat kesamaan
Sirkuler	: Melingkar
Soliter	: Secara sendiri-sendiri
Sonikasi	: Teknik memecah sel menggunakan prinsip gelombang suara.
Spin down	: Sentrifugasi singkat untuk mengendapkan molekul besar dalam sampel.
$S_{SM}$ ( <i>Simple Matching Coefficient</i> )	: Metode statistik untuk membandingkan kesamaan unit-unit taksonomi atau sifat-sifat yang sama pada sampel-sampel organisme.

Strain	: Kelompok atau koloni bakteri yang berasal dari satu sel tunggal sehingga sel-sel dalam koloni tersebut sama atau identik.
Supernatan	: Bagian atas yang berupa cairan hasil sentrifugasi pada sampel.
Thawing	: Perubahan dari kondisi membeku atau dingin kemudian dilelehkan atau dipanaskan.
Topologi	: Kajian kondisi bentukan struktur atau morfologi.
Transformasi	: Proses memasukkan materi genetik pada suatu sel.
UPGMA ( <i>Unweighted Pair Group Method with Average</i> )	: Algoritma atau sistem penentuan hitungan jarak antarkelompok data atau takson berdasarkan nilai rata-rata.

# INDEKS

## A

16S rRNA, 15, 16, 17, 53, 54,  
55, 57, 59, 61, 67, 68, 69, 70,  
71, 72, 74  
*alignment sequences*, 61  
antigen, 12, 13, 14  
asam nukleat, 50, 73

## B

Biotipe I, 12, 63  
Biotipe II, 12, 63  
Biotipe III, 63  
Biotipe IV, 63

## D

demam tifoid, 2, 11, 12, 13, 14  
dendogram, 66, 67

## E

eksotoksin, 39  
elektroforesis agarose, 15, 51, 53  
*Enterobacteriaceae*, 11, 23, 24,  
63, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73  
epitop, 14, 62

## G

gel poliakrilamid, 37, 38  
genom, 13, 15, 17, 49, 50, 57, 71

## I

isolasi bakteri, 18

## K

karakterisasi fenotipik, 15, 17,  
32

keanekaragaman *S. typhi*, 2, 11, 15

keanekaragaman genetik, 13, 15, 16, 17, 62

klasifikasi molekuler, 15

kloning gen, 15, 16, 17, 53, 55

koloni *black center*, 21

konjugasi, 39, 76

kultur darah, 18, 19, 33, 75

kurva standar konsentrasi protein, 42

**L**

ligasi DNA, 55

**M**

media API 20E, 29, 30, 48

media API50CHB/E, 31

media BacT/Alert FAN, 19

media MC, 20, 22, 33, 49

media Oxgall, 18

media SSA, 21, 22

morfologi koloni, 20, 32, 48

*multi-drug resistance* (MDR), 14, 78

MVSP, 47

**P**

patogenitas, 12

PCR, 15, 16, 17, 53, 59, 60

pengecatan gram, 21, 22

PHYDIT, 69

plasmid, 15, 39, 50, 55, 56, 57, 58, 59, 74, 75

protein fungsional, 39

protein struktural, 39

**S**

*Salmonella typhi*, 1, 2, 11, 12, 18, 33, 37, 63, 65, 67, 68, 76, 80

SDS-PAGE, 15, 16, 17, 37, 38, 43, 47, 48

sekuensing, 15, 17, 58, 60, 61

serotipe, 12, 15

sistematika polifasik, 2, 11, 13, 15, 16

spektrofotometer UV, 41, 52, 60

$S_{SM}$ , 32, 35, 48, 64

**T**

TEMED, 38, 44, 45

total protein sel, 15, 17, 39, 40

transformasi, 57

T-Vektor pMD20, 54, 60

## U

uji biokimia, 23, 29

uji indol, 24

uji katalase, 24

uji MR, 25

uji VP, 26

uji Widal, 13, 14

UPGMA, 32, 35, 48, 64

## TENTANG PENULIS



**Dr. Sri Darmawati, M.Si.**, dilahirkan di Mayong, Jepara, pada 15 Juli 1962. Lulus Sarjana Biologi di UGM, Yogyakarta, pada tahun 1986, kemudian melanjutkan program Magister pada Program Studi Bioteknologi UGM tahun 1996 dan lulus pada tahun 1998.

Lulus program Doktor pada Program Studi Bioteknologi UGM tahun 2013 dalam bidang Mikrobiologi. Pada 1991 sampai dengan 2003 menjadi dosen di Akademi Analis Kesehatan Muhammadiyah Semarang, kemudian pada tahun 2004 sampai dengan 2017 menjadi dosen pada program studi D-4 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, dan mulai 2018 sampai dengan sekarang mengajar Program Studi Magister Sains Laboratorium Medik di Universitas Muhammadiyah Semarang. Posisi sekarang menjabat sebagai Wakil Rektor I Bidang Akademik di Universitas Muhammadiyah Semarang. Buku yang telah disusun adalah *Biologi Sel* dan *Biologi Molekuler*.

Monograf

# SISTEMATIKA POLIFASIK

Untuk Deteksi Keanekaragaman  
Genetik *Salmonella typhi*

---

Karakter morfologi sel dan morfologi koloni pada media padat, yang tampak sama dari isolat *Salmonella typhi* yang berbeda asal, ternyata belum tentu memiliki karakter biokimiawi yang semuanya sama pula. Isolah *S. typhi* yang berasal dari individu yang sama pun kadang menunjukkan adanya perbedaan pola sensitivitas terhadap antibiotik. Hal tersebut telah menunjukkan adanya variasi genetik antar-isolat. Di Indonesia dijumpai *S. typhi* dengan flagella yang dikode oleh gen dengan ukuran 1512bp, namun dijumpai pula *S. typhi* yang berasal dari beragam daerah di Indonesia. Hal ini semakin menunjang adanya keanekaragaman genetik *S. typhi*.

Perbedaan karakter, baik yang tampak maupun yang tidak tampak langsung, menunjukkan adanya keanekaragaman genetik. Karakterisasi morfologi telah banyak dilakukan untuk identifikasi jenis bakteri, karena mudah, sederhana, dan biayanya murah. Perkembangan teknologi molekuler mendorong adanya perubahan dalam dunia indentifikasi bakteri, yang dapat dilakukan berdasarkan sistematika fenotipik, ataupun dengan sistematika molekuler, seperti dengan sekuens gen 16S rRNA, serta berdasarkan sistematika kimiawi (berdasarkan profil total protein terlarut bakteri).

Monograf "istematika Polifasik untuk Deteksi Keanekaragaman Genetik *Salmonella typhi*" ini berisi tentang teori, konsep, cara kerja praktis di laboratorium, dan hasil-hasil penelitian yang berhubungan dengan identifikasi *S. typhi* dari berbagai isolat baik identifikasi berdasarkan karakter morfologi, maupun secara molekuler (berdasarkan profil total protein terlarut ataupun berdasarkan sekuens gen 16S rRNA). Metode sistematika polifasik, yaitu metode yang mengintegrasikan antara sistematika berdasarkan fenotipik dan molekuler. Identifikasi secara molekuler di Indonesia belum banyak digunakan sehingga dengan monograf yang berisi tentang keanekaragaman karakter bakteri *S. typhi*, peran penting *S. typhi* dalam dunia kesehatan sebagai penyebab penyakit demam tifoid dan bagaimana metode deteksi keanekaragaman genetik *S. typhi* berdasarkan sistematika polifasik, maka kemudian dapat digunakan untuk menentukan jenis antibiotik yang tepat bagi pasien.



AR-RUZZ MEDIA  
Jl. Anggrek 126 Sambilegi, Maguwoharjo  
Depok, Sleman, Jogjakarta 55282  
Telp./Fax.: (0274) 488132  
e-mail: arruzzwacana@yahoo.com

ISBN 978-602-313-491-5



9 786023 134915