



# PURIFIKASI DAN ISOLASI ANTIGEN LOKAL

*Salmonella typhi*

HASJAR

H411 00 001



PERPUSTAKAAN PUSAT UNIV. HASANUDDIN	
Tgl. Terima	
Asal Dari	
Banyaknya	
Harga	
No. Inventaris	
No. Klas	

JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2005



# **PURIFIKASI DAN ISOLASI ANTIGEN LOKAL**

*Salmonella typhi*

**Oleh :  
HASJAR  
H41100001**

*Skripsi ini diajukan untuk melengkapi tugas dan memenuhi syarat untuk  
memperoleh gelar Sarjana Biologi*

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2005**



**HALAMAN PENGESAHAN**  
**PURIFIKASI DAN ISOLASI ANTIGEN LOKAL**  
*Salmonella typhi*

Oleh :  
**HASJAR**  
**H41100001**

Disetujui Oleh :  
Pembimbing Utama

Dra. ROSANA AGUS, MSi  
Nip. 131 959 055

Pembimbing Pertama

Dr. H. MOCHAMMAD HATTA, Ph.D.  
Nip. 131 468 462

Pembimbing Kedua

Dra. ZARASWATI DWYANA, MSi  
Nip. 131 922 895

## PRAKATA

Syukur Alhamdulillah, penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya yang telah dicurahkan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini dapat diselesaikan berkat bantuan dan partisipasi berbagai pihak, untuk itu pada kesempatan ini penulis menghaturkan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada Ibu Dra. Rosana Agus, MSi., selaku Penasehat Akademik sekaligus Pembimbing Utama, Bapak Dr. Mochammad Hatta, Ph.D., selaku Pembimbing Pertama dan Ibu Dra. Zaraswati Dwyana, MSi., selaku Pembimbing Kedua yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, pikiran dan nasihat kepada penulis. Bimbingan dan pengarahan yang beliau berikan, penulis rasakan sesuatu yang tak terhingga.

Pada kesempatan yang sama pula penulis menyampaikan penghargaan dan terima kasih setinggi-tingginya kepada :

- Bapak Prof. DR. H. M. Noor Djalaluddin, selaku Dekan F. MIPA Universitas Hasanuddin.
- Ibu DR. Hj. Dirayah R. Husain, DEA, selaku Ketua Jurusan Biologi F. MIPA Universitas Hasanuddin.
- Ibu Dra. Risco B. Gobel, MSi sebagai Ketua Sidang, Ibu Hj. Sri Suhadiyah, M.Agr sebagai sekretaris, Bapak Drs. Muhtadin S dan Ibu Dra. Silvana Tana, MSi sebagai anggota.

- Semua dosen yang telah banyak memberikan kepada penulis wawasan dan pemikiran kritis sesuai ilmu masing-masing serta para staf Jurusan Biologi.
- Ayahanda Ir. Jayusri dan Ibunda Hj. Hasniar tercinta juga kepada saudara-saudaraku Neni Marlina, M. Rummyani, M. Khaliq hakam, M. Azis Albar atas doa, dukungan dan kasih sayangnya serta motivasi dan pengorbanan yang telah diberikan kepada penulis.
- Rekan-rekan mahasiswa Biologi angkatan 2000 yang tidak bisa saya tulis namanya satu persatu atas persahabatan, kesabaran, perhatian dan dukungannya selama ini kepada penulis.
- Pak Markus, Kak Sapri, Kak Romi, Kak Wani, Kak Sukma, dr Yadi, dr. Zabir, Ibu Una dan Kak Opi atas bantuannya selama penelitian.
- Semua keluargaku atas dukungan, bantuan moril dan materil yang diberikan dengan tulus dan ikhlas.
- Semua pihak yang telah berjasa, yang tidak sempat di tulis namanya satu persatu. Terima kasih banyak atas bantuan dan dukungannya yang sangat berarti dan mudah-mudahan Allah SWT membalas segala budi baik kalian.

Makassar, Pebruari 2005

Penulis

## ABSTRAK

Penelitian mengenai Purifikasi dan Isolasi Antigen Lokal *Salmonella typhi* telah dilakukan pada bulan Oktober 2004 di Laboratorium Immunologi dan Biologi Molekular, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar. Penelitian ini bertujuan untuk mencari antigen lokal *Salmonella typhi* hasil purifikasi dan isolasi yang paling efektif sebagai antigen standar yang dapat digunakan dalam uji serologi. Uji serologi antigen lokal *Salmonella typhi* yang dilakukan adalah metode aglutinasi, antigen lokal *Salmonella typhi* yang digunakan ada 2 yaitu antigen O (antigen tubuh) dan antigen H (antigen Flagel).

Berdasarkan hasil penelitian, bahwa antigen lokal dari *Salmonella typhi* yang diisolasi dari penderita demam tifoid, melalui purifikasi (proses liofilisasi) dapat digunakan sebagai antigen standar dalam mendeteksi dini demam tifoid.

Kata Kunci : *Salmonella typhi*, Antigen Lokal, Aglutinasi

## ABSTRACT

The study about "Purification and isolation local antigen *Salmonella typhi*" have been done at October 2004 in Immunology and Molecular Biology of Microbiology Laboratory, Medical Faculty, Hasanuddin University, Makassar. This research aim to search the local antigen of *Salmonella typhi* where taken from purification and isolation as most effective standard antigen to be utilized in serological test. The serology test local antigen of *Salmonella typhi* made by agglutination method, using two local antigen of *Salmonella typhi*, they are antigen O (Somatic antigen), and antigen H (Flagella antigen).

According this study, that local antigen of *Salmonella typhi* which isolated from typhoid fever patients by purification (lyophilization process) can be used as standard antigen to detection typhoid fever earlier.

Keywords : *Salmonella typhi*, Local Antigen, Agglutination



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> -----	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> -----	ii
<b>KATA PENGANTAR</b> -----	iii
<b>ABSTRAK</b> -----	v
<b>ABSTRACT</b> -----	vi
<b>DAFTAR ISI</b> -----	vii
<b>DAFTAR TABEL</b> -----	ix
<b>DAFTAR GAMBAR</b> -----	x
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> -----	xi
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> -----	1
I.1 Latar Belakang-----	1
I.2 Tujuan Penelitian-----	3
I.3 Manfaat Penelitian-----	3
I.4 Waktu dan Tempat Penelitian-----	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> -----	4
II.1 Gejala Demam Tifoid-----	4
II.2 Diagnosa Demam Tifoid-----	5
II.3 <i>Salmonella typhi</i> -----	10
II.4 Antigen-----	13
II.5 Antibodi-----	15
II.6 Zat Warna Penol Merah-----	18



<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> -----	19
III.1.1 Alat -----	19
III.1.2 Bahan -----	19
III.2 Kriteria Sampel-----	20
III.3 Metode Kerja -----	20
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b> -----	26
IV.1 Kultur Bakteri <i>Salmonella typhi</i> -----	26
IV.2 Uji Biokimia -----	27
IV.3 Pengecetan Gram -----	30
IV.4 Purifikasi dan Isolasi Antigen <i>S.typhi</i> -----	31
IV.5 Uji Serologi -----	33
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b> -----	38
V.1 Kesimpulan -----	38
V.2 Saran-----	38
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> -----	39
<b>LAMPIRAN</b> -----	42

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Isolasi <i>S.typhi</i> Pada Medium SSA -----	26
2. Hasil Uji Biokimia <i>S.typhi</i> -----	27
3. Hasil Uji Serologi Meode Aglutinasi -----	34

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi dan Struktur Antigen <i>S.typhi</i> -----	12
2. Struktur Kimia "Phenol red" -----	18
3. Bentuk Morfologi Koloni <i>S.typhi</i> Pada Medium SSA-----	27
4. Bentuk Pertumbuhan <i>S.typhi</i> pada Uji Biokimia -----	29
5. Hasil Pengecatan Gram <i>S.typhi</i> -----	30
6. Antigen Lokal berupa Serbuk dari <i>S.typhi</i> -----	31
7. Antigen Lokal <i>S.typhi</i> dari Sedimen (O) dan Supernatan (H)-----	33
8. Hasil Uji Serologi Metode Aglutinasi untuk Antigen O dan H-----	35

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1.	Skema Alur Penelitian -----	42
2.	Komposisi Larutan Zat Warna, Pengencer dan Reagen -----	43

# BAB I

## PENDAHULUAN

### I.1 Latar Belakang

“Typhoid fever” atau demam tifoid merupakan penyakit sistemik yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* yang merupakan bakteri enterik gram negatif, dan patogen pada manusia. Demam tifoid merupakan penyakit infeksi tropik sistemik, bersifat endemis dan merupakan problema kesehatan masyarakat, utamanya di negara yang sedang berkembang, termasuk Indonesia oleh karena tingginya urbanisasi, kontaminasi suplai air, lambatnya diagnosa dan belum adanya vaksin yang benar-benar efektif.

Ada dua sumber penularan *Salmonella typhi*, yaitu pasien demam tifoid dan yang lebih sering karier yaitu orang yang sembuh dari demam tifoid dan masih terus mengekskresi *Salmonella typhi* dalam tinja dan air kemih selama lebih dari satu tahun. *Salmonella* yang masuk bersama makanan ke dalam tubuh manusia akan mencapai usus halus dan masuk ke kelenjar getah bening lalu di bawa ke aliran darah. Kuman kemudian dibawa oleh darah menuju berbagai organ, termasuk usus, di mana organisme berkembang biak dalam jaringan limfoid dan diekskresi dalam tinja.

Setelah masa inkubasi 10-14 hari, gejala yang timbul bervariasi. Dalam minggu pertama, keluhan dan gejala serupa dengan infeksi akut pada umumnya, yaitu demam, lemah, sakit kepala, nyeri otot, mual, muntah, diare, konstipasi,



bradikardia, limpa dan hati menjadi besar (Juwono, 1996; Jawetz dan Melnick, 1996).

Diagnosa dari demam tifoid semakin cepat maka akan semakin baik pula, karena memungkinkan bagi pasien untuk mendapatkan pengobatan dengan cepat sehingga resiko yang disebabkan oleh penyakit ini tidak fatal. Selain itu diagnosa dari penyakit ini memerlukan identifikasi yang akurat dari *Salmonella typhi* pada sampel klinis.

Pada umumnya uji diagnosis demam tifoid di laboratorium hanya dengan menggunakan kultur sederhana, karena metode serologi seperti tes Widal, Enzyme Linked Imunosorbent Assay (ELISA) membutuhkan antigen standar yang sulit diperoleh dan dalam pendeteksiannya memerlukan waktu yang cukup lama. Dalam mengatasi masalah ini, diperlukan alternatif lain yang dapat memudahkan penggunaan uji serologi dengan waktu pengujian yang singkat.

Menurut Chart (2000), salah satu alternatif yang dapat digunakan adalah mencari antigen lokal yang dapat dijadikan sebagai antigen standar. Antigen lokal yang di maksud adalah antigen berupa kuman *Salmonella typhi* hasil isolasi dari penderita demam tifoid yang belum pernah diberi antibiotika. Apabila antigen lokal yang dihasilkan ini direaksikan dengan antibodi penderita demam tifoid dan terjadi penggumpalan, maka antigen ini dapat digunakan sebagai antigen standar.

Antigen lokal yang dapat digunakan sebagai antigen standar adalah antigen yang dihasilkan dari purifikasi dan isolasi *Salmonella typhi*. Purifikasi merupakan salah satu cara yang digunakan untuk mencari antigen lokal yang dapat dijadikan sebagai antigen standar. Berdasarkan hal tersebut di atas maka

dilakukan penelitian mengenai purifikasi dan isolasi antigen lokal dari *Salmonella typhi*.

## **I.2 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mencari antigen lokal *Salmonella typhi* hasil purifikasi dan isolasi yang paling efektif sebagai antigen standar yang dapat digunakan dalam uji serologi.

## **I.3 Manfaat Penelitian**

Diharapkan antigen lokal yang dihasilkan dapat digunakan sebagai antigen standar yang dapat mendeteksi dini demam tifoid dalam waktu yang singkat.

## **I.4 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan September-Oktober 2004 di Laboratorium Immunologi dan Biologi Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1 Gejala Demam Tifoid

Demam tifoid merupakan penyakit sistemik serius yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* yang merupakan masalah kesehatan, terutama di negara yang sedang berkembang termasuk Indonesia oleh karena tingginya urbanisasi, kontaminasi suplai air, lambatnya diagnosa dan belum adanya vaksin yang sangat efektif. Di Indonesia penyakit ini dapat ditemukan sepanjang tahun, tetapi terutama pada musim panas. Demam tifoid dapat ditemukan pada semua umur, tetapi paling sering pada anak yang berumur 5-9 tahun (Song, 1993; Juwono, 1996; House *et al*, 2001; Hatta *et al* dan Munir, 2003).

*Salmonella typhi* masuk tubuh manusia melalui mulut dengan makanan dan air yang tercemar. *Salmonella typhi* yang termakan mencapai usus halus dan masuk ke saluran getah bening lalu ke aliran darah. Kemudian kuman di bawa oleh aliran darah menuju berbagai organ, termasuk usus. Organisme ini berkembang biak dalam jaringan limfoid dan di ekskresi dalam tinja (Capucino, 1992; Juwono, 1996; Jawetz *et al*, 2001).

Demam tifoid yang tidak diobati biasanya berlangsung selama 4 minggu. Serangan penyakit ini didahului oleh masa inkubasi 10 – 14 hari. Gambaran klinis pada minggu pertama, gejala yang muncul belum spesifik, biasanya menyerupai penyakit infeksi akut pada umumnya, seperti demam, nyeri kepala, pusing, konstipasi dan batuk non produktif, mual dan muntah. Minggu kedua, demam



semakin tinggi dan terus menerus, mulai menunjukkan gangguan kesadaran mulai yang ringan (letak tidur pasif, apatis) hingga berat (delirium, koma). Terjadi pembesaran hati dan limpa, perut kembung, lidah kotor. Ujung dan tepi lidah kemerahan. Bibir kering, pecah-pecah dan terkupas, serta napas berbau tak sedap (Juwono, 1996; Bakhri, 2002).

Pada minggu ketiga sering terjadi komplikasi, perut lebih distensi, penderita mengalami diare, dan ensefalopati toksik. Komplikasi yang paling sering muncul adalah pendarahan dan perforasi usus. Pada beberapa pasien muncul renjatan, bronkopneumoni dan kelainan di otak (ensefalopati meningitis).

Pada minggu ke empat bila penderita mampu bertahan, keadaan menjadi berangsur-angsur lebih baik. Namun demikian, pada anak di bawah usia 5 tahun sering ditemukan adanya keluhan rasa terbakar saat miksi. Kelainan neuropsikiatrik terjadi bervariasi di tiap negara. Di Indonesia, kelainan ini terjadi 10-40%, dapat berupa gangguan status mental, delirium, stupor dan koma, kejang, meningitis. Angka kematian penderita demam tifoid dengan kelainan delirium, stupor dan koma mencapai 40 % (Bakhri, 2002).

## **11.2 Diagnosa Demam Tifoid**

Diagnosa demam tifoid sukar untuk dapat ditegakkan hanya atas dasar gejala klinis saja, sebab gambaran klinis penyakit ini sangat bervariasi dan umumnya tidak khas untuk demam tifoid. Dengan demikian, pemeriksaan laboratorium diperlukan untuk menunjang diagnosis demam tifoid (Hartini, 2000; Hatta *et al*, 2003).

Berbagai uji serologi yang telah digunakan untuk mendeteksi keberadaan *Salmonella typhi* pada penderita demam tifoid. Serologi merupakan ilmu yang mempelajari reaksi-reaksi antara antigen dan antibodi secara *in vitro*. Reaksi serologi dapat dipakai untuk memperkirakan jumlah relatif dari zat-zat yang bekerja. Reaksi ini juga dapat digunakan untuk mengetahui secara kualitatif maupun kuantitatif respon tubuh terhadap agen infeksi dan juga untuk diagnostik penyakit infeksi karena reaksinya bersifat spesifik (Lay, 1994; Jawetz, 1996).

Uji serologi memerlukan waktu yang jauh lebih singkat dibandingkan uji diagnostik yang lazim dilakukan. Dalam bidang kedokteran uji serologi digunakan secara luas, karena adanya kekhususan dan sensitivitas dari reaksi antigen dan antibodi. Misalnya diagnosa suatu infeksi dengan diketemukannya titer antibodi meningkat terhadap penyebab (misalnya, *Salmonella*); identifikasi serum yang diketahui mengandung antibodi; adanya sel darah merah yang sesuai dengan serum penerima potensial; dan diketemukannya antigen yang beredar pada infeksi misalnya, antigen permukaan hepatitis B (HBs Ag) (Lay, 1994; Jawetz, 1996).

Serangkaian uji serologi yang telah dikembangkan untuk menemukan *Salmonella typhi*, hanya uji widal dan isolasi kuman dari biakan darah yang sering digunakan. Namun pada dasawarsa terakhir ini telah terjadi kemajuan yang cukup pesat dalam pengembangan sarana laboratorium dalam diagnosis demam tifoid. Berbeda dengan kultur darah dan sumsum tulang, tes widal dan dipstik mempunyai sensitivitas dan spesifisitas lebih rendah pada awal penyakit. Namun setelah beberapa hari, ketika respon imun penderita telah cukup, sensitivitasnya akan meningkat (Hatta *et al*, 2003).

Metode serologi yang biasa digunakan dalam diagnosa demam tifoid, antara lain :

### 1. Reaksi Presipitasi

Reaksi presipitasi merupakan reaksi yang terjadi antara antigen terlarut dan antibodi. Bila antigen terlarut ini direaksikan dalam jumlah setara dengan antibodi, akan terbentuk endapan. Endapan ini terbentuk bila antibodi bivalen berikatan dengan dua atau lebih molekul antigen sehingga terjadi ikatan silang. Ikatan silang yang kuat terhadap antigen terlarut dan antibodi menyebabkan ikatan kisi-kisi sehingga terbentuk endapan (Lay, 1994).

### 2. Reaksi Aglutinasi

Reaksi aglutinasi adalah teknik serologi yang sangat peka untuk deteksi dan penghitungan serum antibodi. Cara ini digunakan secara luas dalam laboratorium klinis untuk diagnosis sementara penyakit infeksi, untuk penggolongan darah dan untuk diagnosis penyakit non-infeksi seperti arthritis rematik (Volk, 1998; Pelczar, 2002).

Reaksi aglutinasi menggunakan antigen berupa sel utuh. Antigen tersebut (misalnya sel bakteri) mempunyai berbagai determinan antigen pada permukaannya dan bereaksi dengan antibodi sehingga membentuk gumpalan yang terlihat oleh mata telanjang. Gumpalan ini berupa partikel yang dipersatukan oleh antibodi (Lay, 1994).

Reaksi aglutinasi dapat dilakukan di dalam tabung-tabung reaksi kecil atau pada sebuah kaca objek. Kebanyakan reaksi aglutinasi bakteri dilakukan pengenceran antiserum secara serial di dalam tabung yang kedalamnya

ditambahkan antigen dalam jumlah konstan. Setelah di inkubasi pada suhu 37°C, adanya penggumpalan di amati dengan pemeriksaan secara visual, kemudian ditentukan titernya. Titer antiserum diberikan sebagai timbal balik pengenceran tertinggi yang menyebabkan penggumpalan. Misalnya suatu antiserum yang menyebabkan aglutinasi pada pengenceran 1 terhadap 128 (tetapi tidak pada 1 :256) mempunyai titer 128. Titer yang lebih tinggi menunjukkan adanya konsentrasi antibodi yang lebih tinggi pula (Jawetz, 1996; Volk, 1998; Pelczar, 2002).

Perbedaan utama antara reaksi aglutinasi dan reaksi presipitasi adalah bahwa pada reaksi aglutinasi antigen terdapat pada permukaan substansi partikulat (bakteri, sel darah merah, antigen yang terbungkus pada partikel lateks) (Volk, 1998).

### 3. Reaksi Widal

Reaksi widal adalah suatu reaksi aglutinasi antara antigen dan antibodi (aglutinin) atau suatu reaksi serum untuk mengetahui ada tidaknya antibodi terhadap *Salmonella typhi*, yaitu dengan mereaksikan serum seseorang dengan antigen O, H, dan Vi (Juwono, 1996; Indan, 2003). Reaksi widal dengan menggunakan antigen O dan H merupakan tes sederhana tetapi memiliki keterbatasan dengan adanya hasil positif dan negatif palsu (Hatta *et al*, 2003).

### 4. Tes Dipstik

Tes dipstik adalah tes yang dapat dipercaya untuk mendeteksi antibodi IgM spesifik terhadap antigen lipopolisakarida (LPS) dari *Salmonella typhi* dan *Salmonella paratyphi*, didasarkan atas ikatan antara IgM spesifik *Salmonella typhi*

dengan lipopolisakarida (LPS) tanpa membutuhkan peralatan dan keterampilan khusus (Hatta *et al*, 2003).

Tes dipstik terdiri dari dua pita tersusun secara horizontal, yaitu pita tes antigen (bawah) mengandung antigen reaktif yang spesifik dan pita internal kontrol (atas) yang mengandung anti-human IgM antibodi. Tes didasarkan atas ikatan antibodi IgM spesifik *Salmonella typhi* terhadap antigen *Salmonella typhi*. Ikatan antibodi IgM secara spesifik dideteksi dengan konjugat IgM anti human. Secara spesifik batas antibodi IgM dideteksi dengan mengkonjugasikan bahan celup IgM anti human (Hatta *et al*, 2003).

Tes dipstik merupakan tes sederhana, cepat, mudah dan metodenya dapat dipercaya untuk hasil diagnosa demam tifoid serta tidak memerlukan keterampilan khusus, memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang lebih tinggi daripada metode konvensional lainnya (seperti reaksi widal) (Ismail, 2002; Hatta *et al*, 2003).

#### 5. ELISA (Enzyme-Linked-Imunosorbent Assay)

Imunoassai enzim, yang secara khusus disebut “Uji kadar imunosorben terikat enzim” (Enzyme Linked Imunosorbent Assay) merupakan suatu tes yang digunakan untuk imunodiagnosis infeksi oleh virus dan antigen mikrobial lain. Selain itu metode ini juga dapat digunakan untuk mendeteksi anti lipopolisakarida (LPS : IgA, IgM, IgG) dan antiflagellum IgG pada penyakit demam tifoid (House, 2001; Pelczar, 2002).

Metode ELISA yang digunakan untuk diagnosis penyakit demam tifoid ini memakai fase padat yang dilapisi dengan sediaan protein membran luar *Salmonella typhi* sebagai antigen. Serum penderita yang di duga mengandung

antibodi *Salmonella typhi* dimasukkan ke dalam cekungan kemudian di inkubasi dan akan terbentuk ikatan yang kompleks antara antigen dan antibodi. Pemeriksaan ini mendeteksi antibodi lebih cepat daripada kultur darah, sehingga metode ELISA merupakan suatu metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi demam tifoid di daerah endemis (Muliawan, 1999).

### II.3 *Salmonella typhi*

Klasifikasi *Salmonella typhi* menurut Garrity (2000) dalam "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology":

Kingdom : Procaryotae  
Phylum : Proteobacteria  
Classis : Gammaproteobacteria  
Ordo : Enterobacteriales  
Familia : Enterobacteriaceae  
Genus : *Salmonella*  
Spesies : *Salmonella typhi*

*Salmonella typhi* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang dengan panjang 2 sampai 3  $\mu\text{m}$  dan diameter 0,4 – 0,6  $\mu\text{m}$ , anaerob fakultatif, bergerak dengan flagel peritrik dan tidak berkapsul. Bakteri ini mudah tumbuh pada medium sederhana dan tumbuh baik pada medium yang mengandung empedu, akan tetapi bakteri ini tidak pernah meragikan sukrosa atau laktosa, tetapi membentuk asam dan kadang gas dari glukosa dan manosa. Bakteri ini biasanya membentuk  $\text{H}_2\text{S}$ . Tahan hidup dalam air beku untuk jangka waktu yang cukup lama. Resistensi terhadap zat-zat kimia tertentu misalnya, natrium tetrasetat,



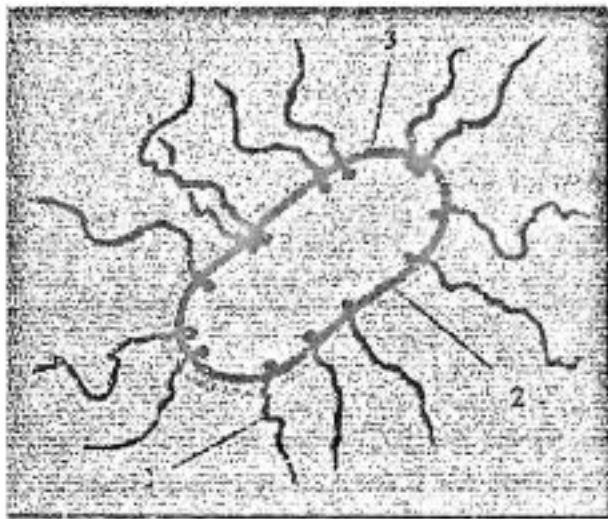
natrium deoksikolat dan hijau brilian yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri enterik lainnya; senyawa ini kemudian berguna untuk ditambahkan pada media untuk mengisolasi *Salmonella* dari tinja. Di alam bebas *Salmonella typhi* dapat tahan hidup lama dalam air, tanah atau pada bahan makanan. Dalam feces di luar tubuh manusia tahan hidup 1 – 2 bulan, dalam air susu dapat berkembang biak dan hidup lebih lama (Jawetz *et al*, 2001; Pelczar, 2002; Indan, 2003).

*Salmonella typhi* membutuhkan nutrisi sederhana untuk dapat tumbuh dengan cepat. Pertumbuhannya sangat baik pada medium di bawah kondisi aerob dengan suhu optimum 37 °C. Meskipun pada pemanasan 55°C bakteri ini akan mati, tetapi dapat bertahan pada kondisi dingin dan makanan yang didinginkan. Bakteri ini dapat bertahan pada konsentrasi garam yang tinggi, namun tidak dapat bertahan pada kekeringan (Burrows, 1993; Myrvik *et al*, 1998).

*Salmonella typhi* bersifat patogen terhadap binatang dan merupakan sumber infeksi bagi manusia. Bakteri ini juga ditemukan pada air sungai, lumpur atau air selokan. Sumber infeksi adalah melalui air yang tidak memenuhi syarat kesehatan, daging, telur, susu yang berasal dari hewan sakit yang di masak kurang matang, makanan dan minuman berhubungan dengan binatang yang mengandung bakteri ini, seperti lalat, tikus, kucing dan ayam (Jawetz *et al*, 1996; Pelczar, 2002; Indan, 2003).

*Salmonella* memiliki antigen yang mempunyai serotipe banyak, tetapi pada umumnya dapat dikelompokkan dalam 17 golongan didasarkan atas antigen O (somatik) yang dimilikinya. Dari 17 golongan ini hanya 5 golongan yang

penting untuk infeksi pada manusia, yaitu golongan A, B, C, D dan E (Kresno, 1996).



Keterangan :

1. Antigen H yang terdapat pada flagella
2. Antigen O yang terdapat pada dinding sel
3. Antigen Vi yang terdapat pada kapsul

Gambar 2.1 Morfologi dan struktur antigen *Salmonella typhi* (Davis, 1990)

*Salmonella typhi* mempunyai 3 macam antigen yang penting, yaitu: (Davis, 1990; Fardiaz, 1993; Kresno, 1996; Cushing, 1997; Lay, 2000; Jawetz, 2001)

a. Antigen somatik (Antigen O)

Antigen somatik terdiri dari lipopolisakarida yang mengandung glukosamin dan terdapat pada badan atau dinding sel bakteri yang dinyatakan dengan simbol O. Huruf O berasal dari kata "ohne hauch" dalam bahasa Jerman yang berarti tanpa film. Antigen ini tahan terhadap panas dan alkohol dan biasanya di deteksi dengan aglutinasi bakteri. Antibodi terhadap antigen O terurama adalah IgM.

b. Antigen flagella (Antigen H)

Antigen H atau flagella adalah suatu protein yang disebut flagellin dan bersifat tidak tahan panas, fenol, atau alkohol tetapi tahan terhadap formalin.



Huruf H berasal dari kata "hauch" dalam bahasa Jerman yang berarti film, yaitu suatu ciri pertumbuhan bakteri yang mempunyai flagella.

#### c. Antigen kapsular (Antigen Vi)

Antigen Vi terdapat pada bagian paling luar dari tubuh bakteri dan merupakan polimer dari polisakarida yang bersifat asam. Antigen ini biasanya tidak dipakai untuk menentukan diagnosis infeksi, tetapi hanya dipakai untuk mendeteksi karier.

### II.4 Antigen

Antigen merupakan bahan yang dapat merangsang respon imun atau bahan yang dapat bereaksi dengan antibodi yang sudah ada. Antigen dapat berupa bakteri, virus atau toxinnya. Sifatnya makromolekul, dapat berupa polipeptida, polisakarida, atau glikoprotein, tidak mudah hancur atau terurai oleh cairan-cairan tubuh (darah, limfa, dsb) (Bratawidjaja, 2002; Indan, 2003).

Secara fungsional antigen dibagi menjadi imunogen dan haptan. Imunogen adalah suatu bahan yang dapat menimbulkan respon imun, humoral atau selular. Protein makromolekul pada umumnya merupakan imunogen poten. Haptan adalah molekul yang dapat bereaksi dengan antibodi yang sudah ada secara langsung, tetapi tidak dapat merangsang pembentukan antibodi secara langsung. Haptan merupakan determinan antigen dengan berat molekul yang kecil dan baru menjadi imunogen bila diikat dengan protein pembawa (carrier) besar (Bratawidjaja, 2002).

Secara umum antigen digolongkan dalam antigen eksogen dan antigen endogen. Antigen eksogen adalah antigen yang berasal dari luar tubuh seseorang

(misalnya berbagai jenis bakteri, virus, obat), sedang antigen endogen merupakan antigen yang terdapat dalam tubuh. Termasuk dalam golongan antigen endogen ini adalah antigen xenogenetik atau heterolog yang terdapat dalam spesies yang berlainan, antigen autolog atau idiopatik yang merupakan komponen tubuh sendiri, dan antigen allogeni atau homolog yang membedakan satu individu dengan individu yang lain dalam satu spesies yang sama (Kresno, 1996).

Karakteristik antigen yang sangat menentukan imunogenitas respon imun adalah : (Jawetz, 2001)

- a. Asing : Pada umumnya, molekul yang dikenal sebagai self tidak bersifat imunogenik; untuk menimbulkan respon imun, molekul harus dikenal sebagai non self.
- b. Ukuran molekul : imunogen yang paling poten biasanya merupakan protein berukuran besar. Secara umum, molekul dengan berat molekul kurang dari 10.000 kurang bersifat imunogenik dan yang sangat kecil (misalnya asam amino) tidak bersifat imunogenik. Molekul kecil tertentu (misalnya hapten) menjadi imunogenik hanya jika bergabung dengan protein pembawa (carrier).
- c. Kompleksitas kimiawi dan struktural : Jumlah tertentu kompleksitas kimiawi diperlukan. Contohnya, homopolimer asam amino kurang bersifat imunogenik dibandingkan dengan heteropolimer yang mengandung dua atau tiga asam amino yang berbeda.
- d. Determinan antigenik (epitop) : Unit terkecil dari suatu antigen kompleks yang dapat di ikat oleh antibodi, di sebut dengan determinan antigenik atau epitop.

Antigen dapat mempunyai satu atau lebih determinan. Pada umumnya, suatu determinan mempunyai ukuran lima asam amino atau gula.

e. Tataan genetik penjamu : Dua strain binatang dari spesies yang sama dapat merespon secara berbeda terhadap antigen yang sama karena perbedaan komposisi gen respon imun.

f. Dosis, cara dan waktu pemberian antigen : Derajat respon imun bergantung pada banyaknya antigen yang diberikan, sehingga respon imun dapat dioptimalkan dengan cara menentukan dosis antigen dengan cermat (termasuk jumlah dosis), cara pemberian dan waktu pemberian (termasuk interval di antara dosis yang diberikan).

## **II.5 Antibodi**

Antibodi adalah zat yang dihasilkan oleh tubuh, setelah dimasuki suatu antigen atau merupakan suatu bahan larut yang digolongkan dalam protein yang disebut immunoglobulin (Bratawidjaja, 2002; Indan, 2003).

Imunoglobulin merupakan substansi pertama yang diidentifikasi dalam serum sebagai molekul yang mampu menetralkan penyebab infeksi oleh sejumlah mikroorganisme (Kresno, 1996). Imunoglobulin di bentuk oleh sel plasma yang berasal dari poliferasi sel B akibat kontak dengan antigen. Antibodi yang terbentuk secara spesifik ini akan mengikat antigen baru lainnya yang sejenis (Bratawidjaja, 2002).

Imunoglobulin di bagi dalam 5 kelas utama yaitu IgM, IgG, IgA, IgD, dan IgE. Pengklasifikasian ini didasarkan atas perbedaan struktur kimia yang

mengakibatkan perbedaan sifat biologik dan sifat fisika dari imunoglobulin (Bratawidjaja, 2002).

#### A. Imunoglobulin G (IgG)

IgG merupakan komponen utama imunoglobulin yang dibentuk atas rangsangan antigen dengan berat molekul 160.000 dalton dalam serum kadarnya sekitar 13 mg/ml dan merupakan 75 % dari imunoglobulin total, dijumpai dalam bentuk monumer. IgG ditemukan dalam berbagai cairan antara lain cairan serebrospinal dan juga urine. IgG dapat menembus plasenta masuk ke fetus dan berperan dalam imunitas bayi umur 6 sampai 9 bulan, di samping itu IgG mampu menetralkan toksin dan virus (Kresno, 1996; Bratawidjaja, 2002).

#### B. Imunoglobulin A (IgA)

IgA ditemukan dengan jumlah sedikit dalam serum, tetapi kadarnya dalam cairan sekresi saluran napas, saluran cerna, saluran kemih, air mata, keringat, ludah, dan air susu ibu lebih tinggi dalam bentuk IgA sekretori. IgA dalam serum maupun dalam sekresi dapat menetralkan toksin atau virus dan mencegah terjadinya kontak antara toksin atau virus dengan sel alat sasaran, dapat mengaglutinasikan kuman, mengganggu motilitasnya sehingga memudahkan fagositosis (opsonisasi) oleh sel folimorfonuklear. Berat molekulnya adalah 165.000 dalton (Bellanti, 1993, Kresno, 1996; Bratawidjaja, 2002).

#### C. Imunoglobulin M (IgM)

IgM adalah kelas imunoglobulin yang pertama dibentuk atas rangsangan antigen, tetapi respon imun IgM umumnya pendek yaitu hanya beberapa hari untuk kemudian menurun (Bellanti, 1993; Kresno, 1996). IgM mempunyai berat

molekul 900.000 dalton, mempunyai rumus bangun pentamer dan merupakan imunoglobulin terbesar. IgM merupakan antibodi dalam respon imun primer terhadap kebanyakan antigen (Bratawidjaja, 2002).

IgM tidak dapat menembus plasenta, oleh karena itu dengan adanya antibodi kelas IgM dalam darah bayi baru lahir menunjukkan bahwa IgM dibentuk oleh bayi sebagai respon terhadap infeksi (Kresno, 1996).

#### D. Imunoglobulin D (IgD)

IgD ditemukan dalam sirkulasi dengan kadar yang sangat rendah. Kemungkinan ini disebabkan karena IgD dalam sel plasma tidak dilepas dan sangat rentan terhadap degradasi oleh proses proteolitik. IgD merupakan komponen permukaan utama dari sel B dan petanda dari diferensiasi sel B yang lebih matang. IgD merupakan 1 % dari total imunoglobulin dan ditemukan banyak pada membran sel B bersama IgM dan dapat berfungsi sebagai reseptor pada aktivasi sel B (Bratawidjaja, 2002). IgD lebih lentur di banding dengan imunoglobulin lain karena mempunyai bagian engsel yang lebih panjang sehingga dapat melakukan ikat silang dengan antigen polivalen secara efisien (Kresno, 1996).

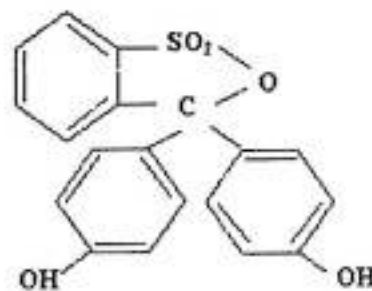
#### E. Imunoglobulin E (IgE)

IgE ditemukan dalam serum dengan kadar rendah yang meningkat pada penyakit alergi seperti asma, rinitis alergi dan dermatitis atopi. IgE mempunyai berat molekul 200.000 dalton. IgE disebut pula antibodi reagenik dan merupakan Ig dengan jumlah paling sedikit dalam serum, tetapi efeknya sangat efisien.

IgE dibentuk oleh sel plasma dalam selaput lendir saluran napas dan cerna. Kadar IgE yang tinggi selain ditemukan pada alergi, juga pada infeksi cacing, penyakit hidatid, skistosomiasis, trikinosis dan diduga berperan pada imunitas parasit (Bratawidjaja, 2002).

## II. 6 Zat warna Fenol Merah "Phenol Red"

Zat warna "Phenol red" mempunyai berat molekul 354, 37 mol/gram dengan konsentrasi C 64,39%; H 3,98%; O 22,57%; dan S 9,05%. Berbentuk kristal berwarna merah muda sampai merah tua. Kelarutan, 1 gram dalam 1300 ml air, dalam 350 ml alkohol, dan dalam 500 ml acetone. Namun "phenol red" sukar larut dalam Chloroform dan eter, tapi cepat larut dalam larutan alkali hydroxide dan karbonat berwarna merah dan pencampuran ini dapat dihentikan melalui pemanasan dengan bubuk seng. Selain berfungsi sebagai pewarnaan biologis juga sebagai indikator dalam 0,02-0,05 % larutan alkohol. Pada pH 6,8 "phenol red" berwarna kuning dan pada pH 8,4 akan berwarna merah (Gennaro, 1990).



Gambar 2. Struktur Kimia "Phenol red" (Gennaro, 1990).

Zat warna "Phenol red" mempunyai rumus kimia :  $C_{19}H_{14}O_5S$ , nama kimia : 4,4'-(3H-2,1-Benzoxathiol-3-yliden) bis phenol S,S-Dioksida, dan nama lain : Phenosulfonphthalein, Sulfonphthal. Berat molekul : 354, 37 mol/gram, dan berguna dalam pewarnaan biologis (Gennaro, 1990).



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **III.1 Alat dan Bahan**

##### **III.1.1 Alat-alat**

Adapun alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah : Cawan petri (Pyrex), Tabung reaksi (Pyrex), Pipet (Pyrex), Ose bulat, Ose lurus, Inkubator (Memmert), Otoklaf (Webeca), Bunsen, Botol Transport Steril, Obyek gelas (Sail brand), Rak tabung, Mikroskop (Nikon), Sentrifus 3000 rpm (Heraeus), Sentrifus 12000 rpm (Hermle Z 229), Freezer -20°C (Nova), Water bath 60 °C (Memmert), Vorteks (Ika-Werk), Mikropipet (Bench Mate), Tabung eppendorf 1,5 ml, Liofilisasi -43°C, 2 atm (Snidjers), Oven (Memmert), Erlenmeyer (Pyrex), Neraca elektrik (Mettler AE 160), Mikroplate U dan V (Sanko Junyaku), Tes reading mirror (Sanko Junyaku), Mikromixer (Sanko Junyaku), Flakon 50 ml, Tips (Art<sub>20p</sub>).

##### **III.1.2 Bahan-bahan**

Adapun bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah : Sampel darah, Aquadest steril, Medium pengaya Ox Bile Broth (Merck), Medium Salmonella Shigella agar/SSA (Merck), Medium Triple Sugar Iron Agar/TSIA (Merck), Medium Sulfit Indol Motility/SIM (Merck), Medium Simmon Citrat Agar/SCA (Merck), Medium Methil Red-Voges Proskauer/MRVP (Merck), Medium Gula-gula (Glukosa, Laktosa, Sukrosa, Manitol), Medium Urea, Larutan Alfa Naftol, Larutan KOH 40 %, Pereaksi Indol (Kovaks), Larutan Metil Merah,



Larutan Gram A (Crystal Violet), Larutan Gram B (Lugol), Larutan Gram C (Alkohol 96%), Larutan Gram D (Fuchsin alkalis), Minyak emersi, Medium Brain Heart Infusion Broth/BHIB (Merck), Phosphate Buffer Saline/PBS (Merck), Biakan *Salmonella typhi*, "Phenol red" 0,04 % (Merck), Antigen *Salmonella typhi*, Serum penderita (kontrol positif), Serum non penderita (kontrol negatif).

### **III.2 Kriteria Sampel**

Kriteria sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah penderita positif suspek demam tifoid yang belum mendapat pengobatan antibiotika.

### **III.3 Metode Kerja**

#### **III.3.1 Pengambilan Sampel**

Sampel darah diambil dari pasien penderita demam tifoid (suspek demam tifoid) sebanyak 15 ml sebagai kontrol positif dan bukan penderita sebagai kontrol negatif. Sampel darah dari penderita demam tifoid selanjutnya dibiakkan pada media selektif *Salmonella typhi*.

#### **III.3.2 Kultur bakteri *Salmonella typhi***

Darah diambil sebanyak 3 ml secara aseptik kemudian dimasukkan kedalam botol transport kecil yang berisi medium Ox Bile Broth 9 ml, dicampur perlahan-lahan hingga homogen dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Biakan ini kemudian di isolasi pada medium selektif (SSA) yang telah memadat, diinkubasi 37°C selama 18-24 jam. Kemudian dilakukan pengamatan terhadap koloni bakteri yang diduga *Salmonella typhi* berdasarkan ciri-ciri pertumbuhan koloninya.



### III.3.3 Uji Biokimia dan Uji Mikroskopis

Untuk lebih menyakinkan keberadaan dari *Salmonella typhi* maka dilanjutkan dengan uji biokimia, yaitu :

#### a. Uji Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Mengambil 1 ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium TSIA pada permukaan miring agar, kemudian ditusuk pada bagian dalam, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Reaksi yang terjadi adalah reaksi alkali (merah), reaksi asam (kuning), dan terbentuk H<sub>2</sub>S (hitam).

#### b. Uji Motilitas

Mengambil 1 ose isolat bakteri ditusukkan tegak lurus pada media Sulfite Indol Motility (SIM) hingga dasar tabung dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Bila terdapat pertumbuhan menyebar di sekitar daerah tusukan berarti motilitas positif, produksi H<sub>2</sub>S jika pada daerah tusukan berwarna hitam.

#### c. Uji Methyl Red

Mengambil 1 ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium MR-VP dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian ditambahkan 5 tetes larutan metal merah dan dikocok. Merah tua menunjukkan reaksi positif, sedang warna kuning menunjukkan reaksi negatif.

#### d. Uji Voges Proskauer

Mengambil 1 ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium MR-VP dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian ditambahkan 0,6 ml larutan alfa naftol dan 0,2 ml larutan KOH 40% dan didiamkan selama beberapa

menit. Warna merah menunjukkan reaksi positif dan jika tidak terjadi perubahan warna berarti reaksi negatif.

e. Uji sitrat

Mengambil 1 ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium Simmon Citrat Agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Warna biru menunjukkan reaksi positif dan hijau menunjukkan reaksi negatif.

f. Uji Urea

Mengambil 1 ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium urea agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Jika terjadi perubahan warna berarti reaksi positif dan jika tidak terjadi perubahan warna berarti reaksi negatif.

g. Uji Fermentasi Karbohidrat

Masing-masing 1 ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium Glukosa, Laktosa, Sukrosa dan Manitol. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Jika terjadi warna kuning menunjukkan reaksi positif.

Uji mikroskopis yaitu dengan melakukan pengecatan gram dengan cara mengambil sebanyak 1 ose kultur isolat di buat preparat olesan di atas gelas obyek kurang lebih 1 cm<sup>2</sup> dan diratakan dengan NaCl 0,85 % kemudian difiksasi pada nyala api bunsen. Selanjutnya ditetesi larutan gram A dan diamkan selama 1 menit. Kemudian dibilas dengan aquades dan dikering anginkan.

Selanjutnya ditetesi dengan larutan gram B dan didiamkan selama 1 menit lalu dibilas dengan aquades dan dikering anginkan. Kemudian ditetesi larutan gram C, dan didiamkan selama 30 detik lalu dibilas dengan aquades dan dikering anginkan. Selanjutnya ditetesi larutan gram D dan didiamkan selama 2 menit lalu

dibilas dengan aquades, kemudian dikering anginkan. Preparat lalu diamati dibawah mikroskop. Bila warna merah menunjukkan gram negatif dan warna ungu menunjukkan gram positif.

#### **III.3.4 Pembuatan serbuk *Salmonella typhi***

Sebanyak 6-8 ose biakan *Salmonella typhi* dimasukkan kedalam 1 L medium BHIB dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya dipanaskan pada suhu 60°C selama 30 menit. Biakan ini kemudian dipindahkan ke dalam tabung sentrifus. Selanjutnya disentrifus pada putaran 3000 rpm selama 10 menit. Sedimen di ambil dan supernatan dibuang. Sedimen ini kemudian disentrifus ulang pada putaran 12000 rpm selama 10 menit. Sedimen diambil dan dimasukkan ke dalam tabung liofilisasi dan diliofilisasi pada suhu -43°C, 2 atm selama 6 jam untuk mendapatkan serbuk *Salmonella typhi*.

#### **III.3.5 Isolasi antigen lokal *Salmonella typhi***

Serbuk *Salmonella typhi* yang diperoleh dari liofilisasi dimasukkan ke dalam flakon yang berisi 1 ml PBS dan di vorteks selama 15 menit, kemudian di simpan di freezer -20°C. Selanjutnya dimasukkan ke oven selama 30 menit pada suhu 50°C dan di vorteks kembali selama 15 menit. Perlakuan ini diulangi 3 kali untuk memecah sel bakteri. Kemudian di sentrifus selama 15 menit pada putaran 12000 rpm. Sedimen dipisahkan dengan supernatan dan masing-masing dimasukkan ke dalam flakon.

### **III.3.6 Isolasi antigen O**

Setelah di sentrifus sedimen yang terbentuk dimasukkan dalam flakon dan akan di uji antigen O (antigen somatik) *Salmonella typhi* dengan metode aglutinasi, kemudian ditambahkan 1 ml PBS, selanjutnya divorteks selama beberapa menit hingga homogen.

### **III.3.7 Isolasi antigen H**

Supernatan yang sudah dipisahkan dengan sedimen dimasukkan ke dalam flakon dan akan di uji antigen H (antigen flagella) *Salmonella typhi* dengan metode aglutinasi, kemudian ditambahkan 1 ml PBS, selanjutnya di vorteks hingga homogen.

## **III.4 Uji serologi**

### **III.4.1 Metode aglutinasi untuk antigen O**

Uji ini dilakukan dengan membuat pengenceran 25 µl serum penderita (+4, +3, +2, +1) dan serum non penderita (kontrol) 1:2 hingga 1 : 16 pada sumur-sumur mikrolat U yang berisi 25µl PBS. Kemudian ditambahkan masing-masing 25 µl Ag O dan 25 µl Phenol red 0,04 %, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam dengan menggunakan mikromixer. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan tes reading mirror.

### **III.4.2 Metode aglutinasi untuk antigen H**

Uji aglutinasi dilakukan dengan membuat pengenceran 25 µl serum penderita (+4, +3, +2, +1) dan serum non penderita (kontrol) 1:2 hingga 1:16 pada sumur mikrolate U yang berisi 25 µl PBS. Kemudian masing-masing ditambahkan 25 µl Ag H dan 25 µl Phenol red 0,04%, selanjutnya diinkubasi pada

suhu 37°C selama 2 jam dengan menggunakan mikromixer. Pengamatan kemudian dilakukan dengan menggunakan tes reading mirror.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian mengenai purifikasi dan isolasi antigen dari strain lokal *Salmonella typhi* ini dilakukan dengan menggunakan sampel darah yang diambil dari pasien penderita positif suspek demam tifoid yang belum mendapat pengobatan antibiotika yang bertujuan untuk mendapatkan antigen lokal yang dapat digunakan sebagai antigen standar.

#### IV.1 Kultur Bakteri *Salmonella typhi*

Hasil deteksi keberadaan *Salmonella typhi* pada medium Salmonella Shigella Agar (SSA) dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil isolasi *Salmonella typhi* pada medium SSA

Ciri pertumbuhan pada medium SS Agar			
Bentuk koloni	Tepi koloni	Warna koloni	Permukaan koloni
Bulat ( <i>Circular</i> )	Rata ( <i>Entire</i> )	Bening	Cembung ( <i>Convex</i> )

Berdasarkan hasil pengamatan pada tabel 1 secara makroskopis diperoleh bahwa ciri pertumbuhan pada medium SSA memperlihatkan bentuk koloni yang bulat (*Circular*), tepi koloni rata (*Entire*), permukaan koloni cembung (*Convex*) dengan warna koloni tampak bening dan dibagian tengahnya hitam karena memproduksi H<sub>2</sub>S, dan ini dapat digunakan untuk mengindikasikan kemungkinan keberadaan *Salmonella typhi*. Menurut Fardiaz (1993), Jawetz (1996), Lakare (2001) bahwa pertumbuhan *Salmonella typhi* tampak bening dengan warna hitam di bagian tengahnya pada medium SSA. Hal ini dapat dilihat gambar 4.1.



Gambar 4.1 Bentuk morfologi koloni *Salmonella typhi* pada medium SSA

#### IV.2 Uji Biokimia

Untuk lebih menyakinkan jenis isolat *Salmonella typhi* maka dilanjutkan dengan uji biokimia. Hasil uji biokimia dari *Salmonella typhi* dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji biokimia *Salmonella typhi*

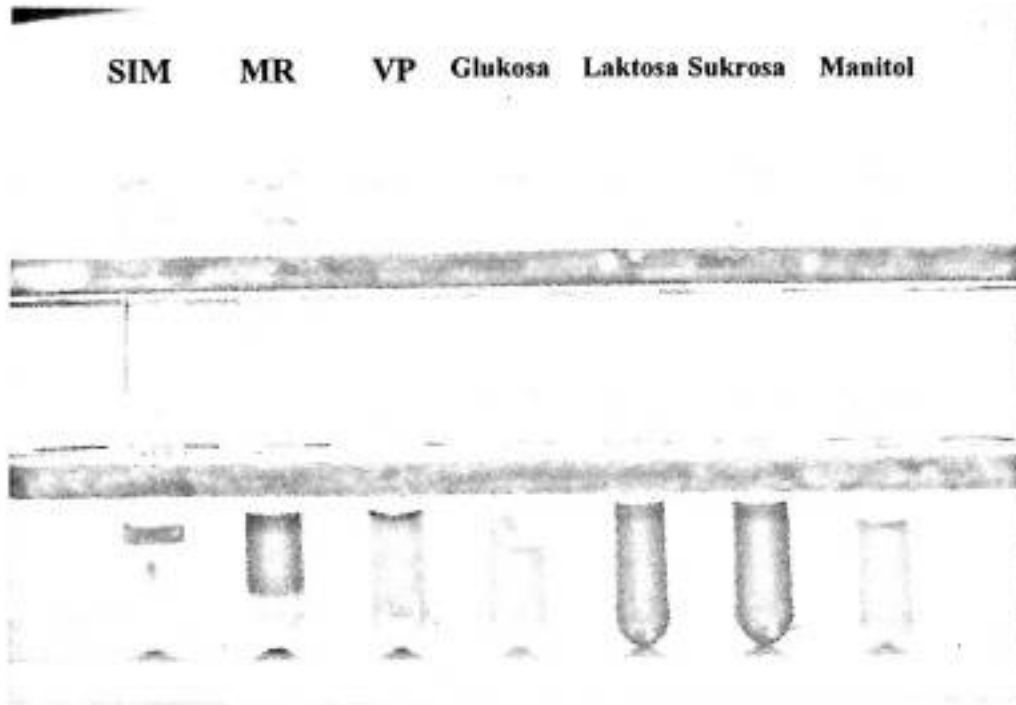
Reaksi Biokimia														
TSIA				SIM			MR	VP	Citrat	Urea	Karbohidrat			
Slant	Butt	H <sub>2</sub> S	Gas	Indol	H <sub>2</sub> S	Motility					G	L	S	M
Alk	As	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+

Keterangan : G (Glukosa), L (Laktosa), S (Sukrosa), M (Manitol), Alk (Alkali), As (Asam), MR (Methyl Red), VP (Voges Proskauer), Slant (miring), Butt (rata).

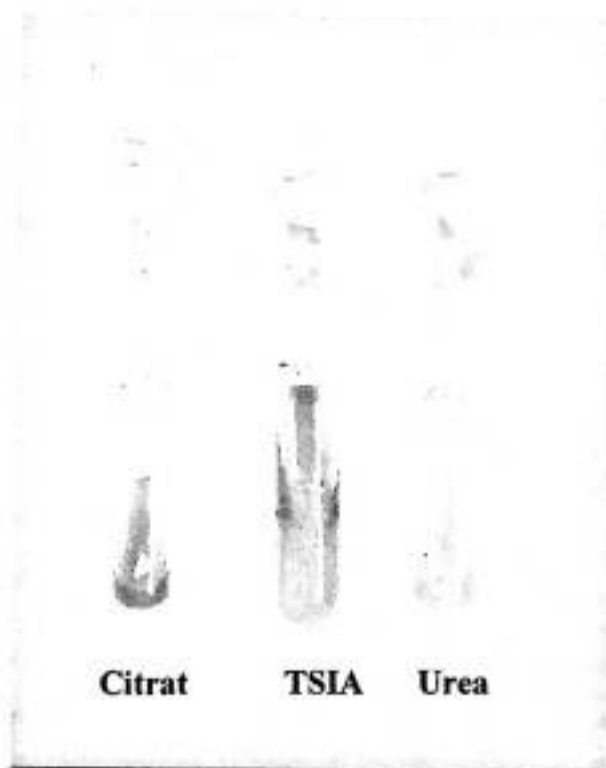
Pada uji biokimia, identifikasi *Salmonella typhi* secara spesifik pada medium Triple Sugar Iron Agar (TSIA) akan membentuk reaksi alkali (merah) pada permukaan agar, sedangkan di dasar tabung terjadi reaksi asam (kuning) serta menghasilkan H<sub>2</sub>S yang ditandai dengan terbentuknya warna hitam. Menurut Fardiaz (1993) dan lakare (2001) bahwa reaksi alkali pada permukaan menunjukkan bahwa laktosa dan sukrosa tidak difermentasikan oleh *Salmonella*

*typhi* sedangkan reaksi asam di dasar tabung menunjukkan terjadinya fermentasi glukosa. Pada medium Sulfid Indol Motility (SIM) menunjukkan bahwa indol tidak terbentuk yang ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna menjadi merah setelah penambahan pereaksi kovacs, pada uji motilitas menunjukkan adanya pertumbuhan yang menyebar oleh karena *Salmonella typhi* bersifat motil. Pada uji ini juga terbentuk H<sub>2</sub>S yang ditandai dengan adanya warna hitam pada daerah tusukan. Pada medium Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP) akan memberikan reaksi positif pada uji methyl red yang ditandai dengan terbentuknya warna merah setelah penambahan larutan methyl red, sedangkan untuk uji Voges Proskauer memberikan reaksi negatif yang ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna setelah penambahan larutan alfa naftol dan larutan KOH 40 %. Selanjutnya pada medium Simmon Citrat Agar (SCA) *Salmonella typhi* tidak dapat tumbuh sehingga akan memberikan reaksi negatif yang ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna medium menjadi biru. Begitupun pada uji biokimia yang menggunakan urea menunjukkan reaksi negatif oleh karena *Salmonella typhi* tidak dapat menghidrolisis urea. Bentuk pertumbuhan dapat dilihat dari hasil pengamatan pada gambar 4.2 dan gambar 4.3.





Gambar 4.2 Bentuk pertumbuhan *Salmonella typhi* pada uji biokimia (SIM, MRVP, Glukosa, Laktosa, Sukrosa, Manitol)

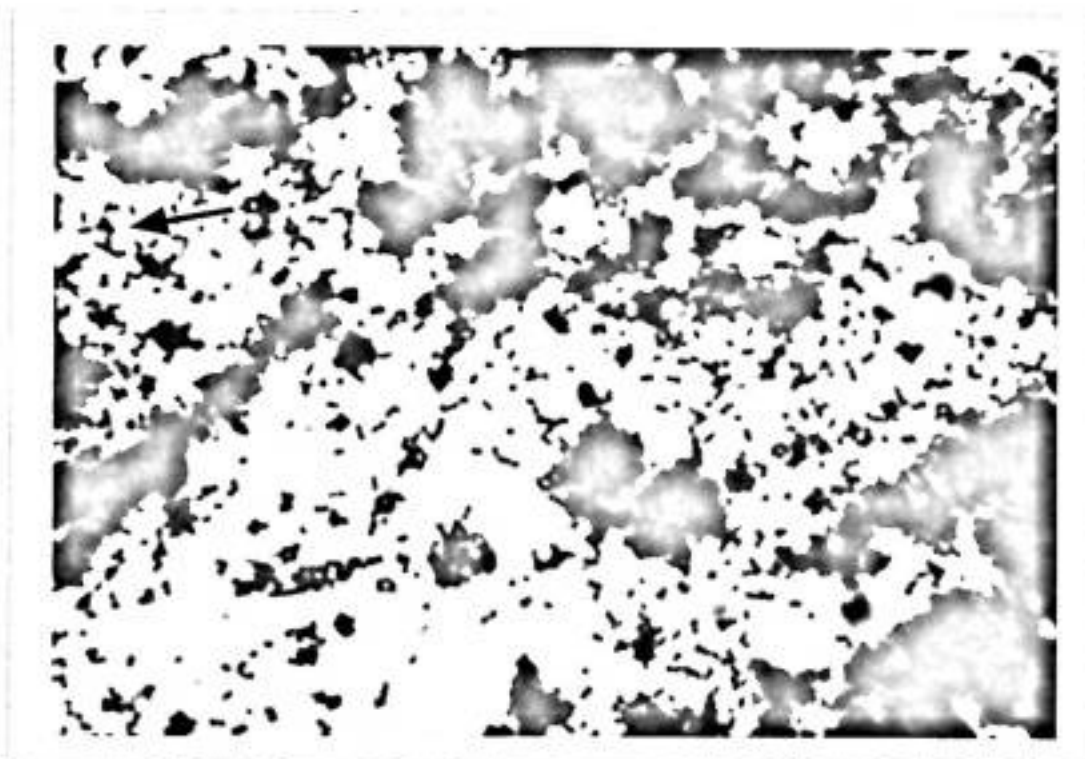


Gambar 4.3 Bentuk pertumbuhan *Salmonella typhi* pada uji biokimia (Citrat, TSIA, Urea)

Lakare (2001), mengemukakan bahwa *Salmonella typhi* menghasilkan H<sub>2</sub>S pada medium TSIA dan SIM karena medium ini mengandung Natrium thiosulfat dan garam Fe (Ammonium iron citrat). Dimana bakteri ini mampu mereduksi thiosulfat menjadi hydrogen sulfida (H<sub>2</sub>S) yang kemudian bereaksi dengan garam Fe dengan hasil ferrosulfida yang berwarna hitam yang biasanya terdapat pada perbatasan antara “slant” dan “butt” pada medium TSIA.

#### IV.3 Pengecatan Gram

Pada pengecatan gram, setelah dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop terlihat adanya bakteri dengan bentuk *basil* dengan sel bakteri berwarna merah yang merupakan bakteri gram negatif. Hal ini dapat dilihat pada gambar 4.4.

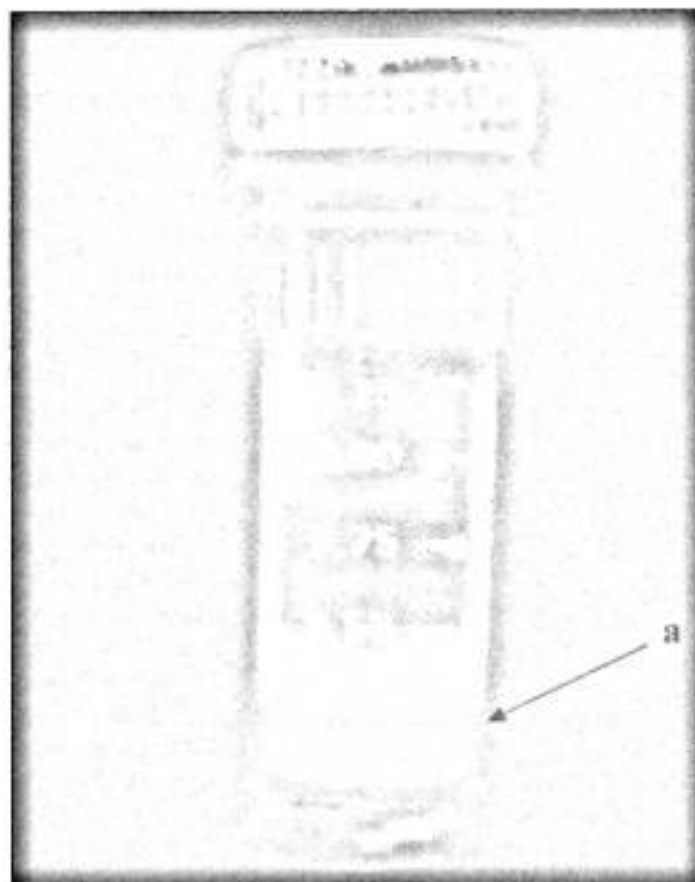


Gambar 4.4 Hasil pengecatan Gram dari *Salmonella typhi* (Pembesaran 1000x)  
(Koloni bakteri bentuk basil gram negatif)

Perleczar dan Chan (2002) mengemukakan bahwa *Salmonella typhi* adalah kelompok bakteri gram negatif dimana dinding sel bakteri Gram negatif memiliki kandungan lipid yang lebih tinggi (11% - 22%) daripada dinding sel bakteri Gram positif yang hanya (1% - 4%).

#### IV.4 Purifikasi dan Isolasi Antigen Lokal *Salmonella typhi*

Purifikasi yang dilakukan melalui proses liofilisasi adalah untuk mendapatkan antigen lokal dari *Salmonella typhi* berupa serbuk kering diharapkan dapat digunakan sebagai antigen standar dan tidak rusak pada penyimpanan lama. Serbuk yang terbentuk kemudian digunakan untuk isolasi antigen O dan antigen H. Hasil dari purifikasi dapat dilihat pada gambar 4.5.

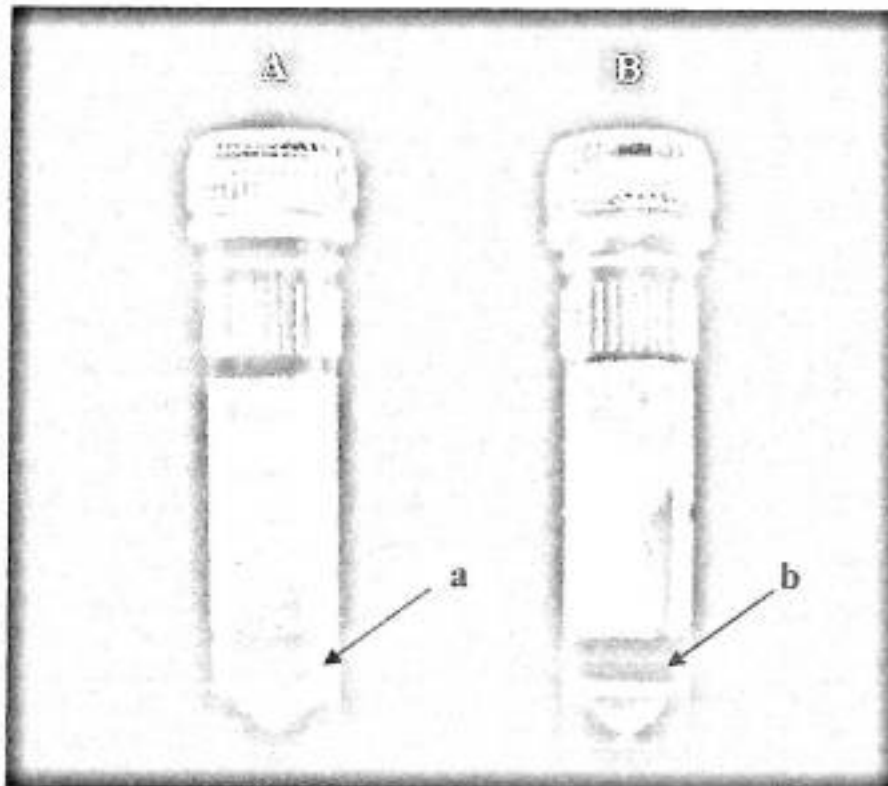


Gambar 4.5 Antigen lokal berupa serbuk dari *Salmonella typhi*  
Keterangan : a. Serbuk dari *Salmonella typhi*

Pada gambar 4.5 terlihat bahwa antigen lokal dari *Salmonella typhi* berupa serbuk kering yang dihasilkan dari purifikasi melalui proses liofilisasi berwarna putih. Antigen lokal dalam bentuk serbuk kering ini diharapkan dapat mengadakan reaksi aglutinasi dengan antibodi dalam serum penderita demam tifoid. Serbuk ini akan digunakan untuk isolasi antigen O dan antigen H yang akan digunakan dalam uji serologi dengan menggunakan metode aglutinasi.

Pada isolasi antigen O dan antigen H digunakan Phosphate Buffer Saline yang berfungsi untuk mempertahankan kondisi fisiologis dari antigen lokal *Salmonella typhi*.

Pada isolasi antigen O dan antigen H diperoleh hasil bahwa antigen O lebih keruh di banding dengan antigen H yang dapat dilihat pada bagian dasar tabung. Hal ini disebabkan karena antigen O di isolasi dari antigen lokal yang berasal dari sedimen sedangkan antigen H di isolasi dari antigen lokal yang berasal dari supernatan. Menurut Fardiaz (1993), Cushing (1997), dan Lay (2000), bahwa antigen lokal yang berasal dari sedimen dikenal sebagai antigen O dan antigen lokal yang berasal dari supernatan sebagai antigen H. Hal ini disebabkan karena antigen O terdiri dari lipopolisakarida yang mengandung glukosamin dan terdapat pada dinding sel gram negatif. Sedangkan antigen H atau flagella mengandung suatu protein yang disebut flagellin. Hasil isolasi antigen O dan antigen H dapat dilihat pada gambar 4.6.



Gambar 4.6 Antigen lokal *S. typhi* dari sedimen (A "Antigen O") supernatan (B "Antigen H")

Keterangan : a. Suspensi keruh dan b. Suspensi bening

#### IV.5 Uji serologi

Uji serologi dengan metode aglutinasi dilakukan untuk membuktikan bahwa antigen lokal yang dihasilkan melalui proses purifikasi dan isolasi dapat digunakan sebagai antigen standar. Chart (2000) mengemukakan bahwa dibutuhkan antigen lokal dari *Salmonella typhi* hasil isolasi dari penderita demam tifoid sebagai antigen standar. Antigen standar adalah antigen yang dapat digunakan dalam mendeteksi adanya produksi antibodi pada penderita demam tifoid. Apabila antigen lokal yang dihasilkan direaksikan dengan antibodi penderita demam tifoid dan terjadi penggumpalan, maka antigen ini dapat digunakan sebagai antigen standar. Hasil reaksi antara antibodi penderita demam tifoid dengan antigen lokal dari *Salmonella typhi* dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji serologi metode aglutinasi

Tipe serum penderit demam tifoid (25 µl)	Pengenceran (50 µl)							
	Antigen O				Antigen H			
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:2	1:4	1:8	1:16
+4	+++	++	+	+	+++	++	+	+
+3	++	++	+	+	++	+	+	+
+2	++	+	+	-	+	+	-	-
+1	+	+	-	-	+	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : Berdasarkan interpretasi uji aglutinasi (Garland Publishing, 1999)

+++ = Gumpalan kecil-kecil dan memenuhi mikroplate

++ = Gumpalan kecil-kecil, setengah dari mikroplate

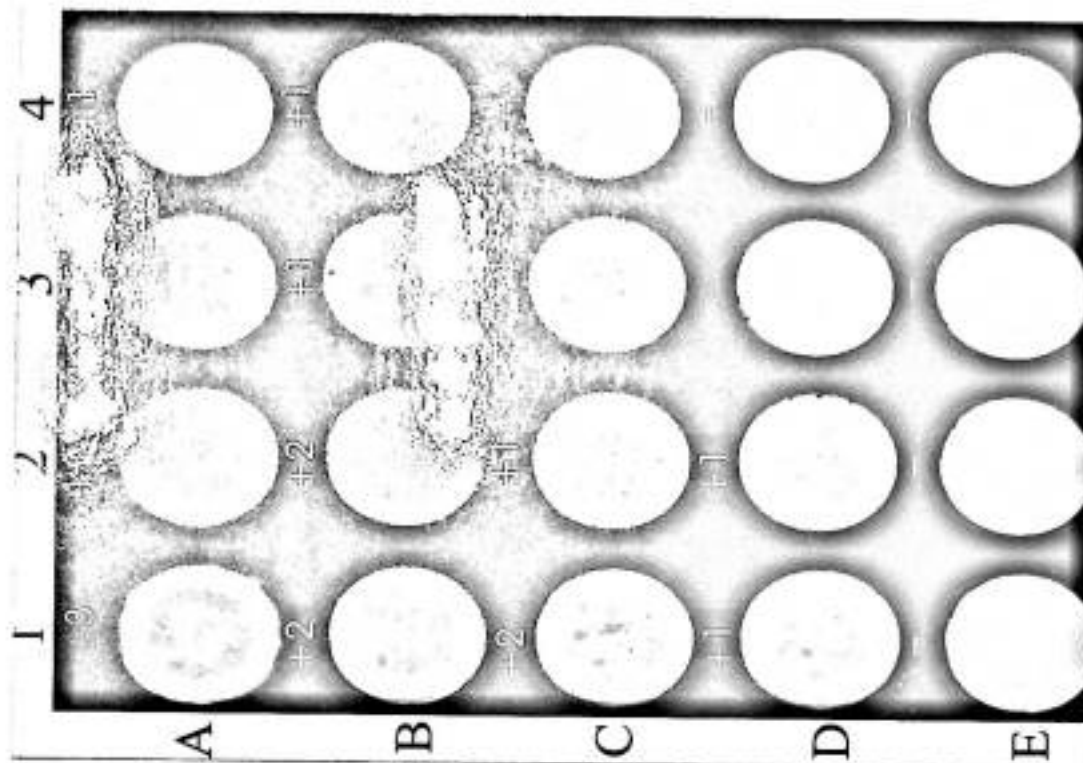
+ = Gumpalan kecil dan sedikit, kurang dari setengah mikroplate

- = Tidak terjadi reaksi aglutinasi

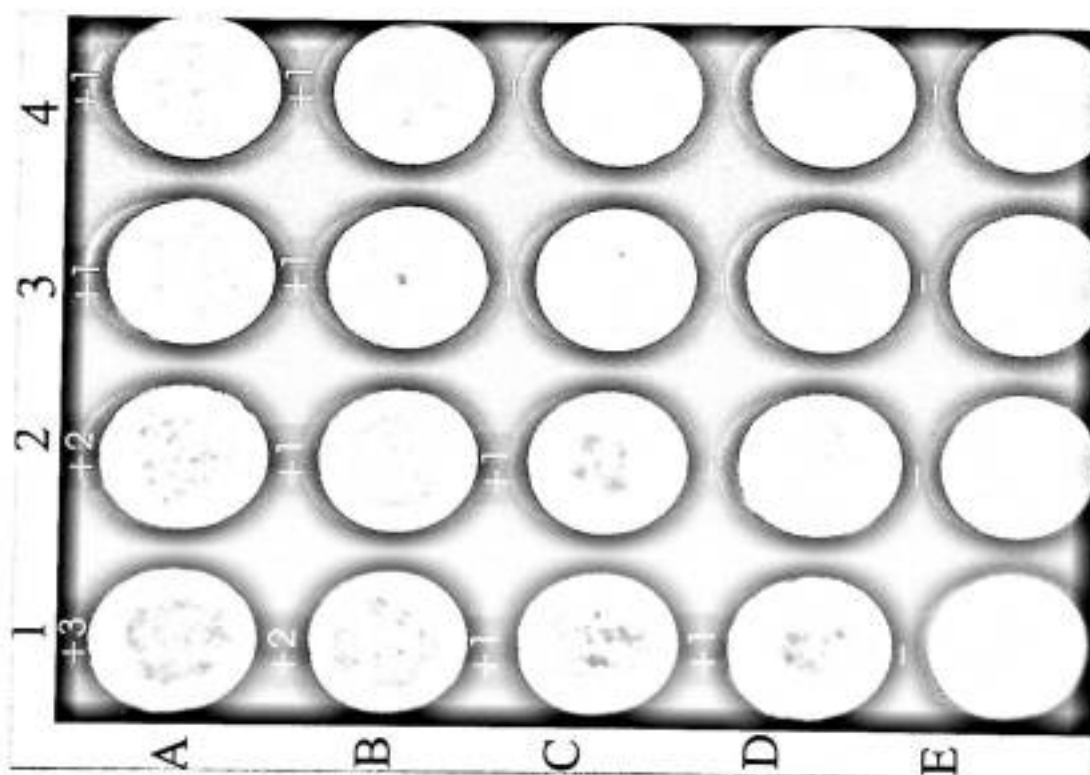
Pada uji serologi, antigen lokal dari *Salmonella typhi* yang digunakan adalah antigen O dan H. Antigen ini kemudian direaksikan dengan serum penderit demam tifoid yang mempunyai tingkatan yang berbeda-beda yaitu positif 4, 3, 2, 1 dan serum negatif yang telah diketahui tingkatannya melalui uji dipstik serta penambahan phenol red untuk memudahkan pengamatan.

Phenol red digunakan sebagai indikator yang berfungsi untuk memperjelas adanya reaksi aglutinasi antara antigen lokal *Salmonella typhi* dengan serum penderit demam tifoid.

Pada tabel 3 diatas menunjukkan bahwa antigen lokal *Salmonella typhi* baik antigen O maupun antigen H setelah direaksikan dengan serum penderit demam tifoid terjadi reaksi aglutinasi. Pada serum dengan tingkatan positif 4, 3, 2 reaksi aglutinasi yang terjadi masih terlihat dengan jelas. Sedangkan serum dengan tingkatan positif 1 untuk antigen O dan H terlihat adanya reaksi aglutinasi meskipun sangat sedikit. Hal ini juga dapat dilihat pada gambar 4.7 dan gambar 4.8.



Gambar 4.7 Hasil uji serologi metode aglutinasi untuk antigen O

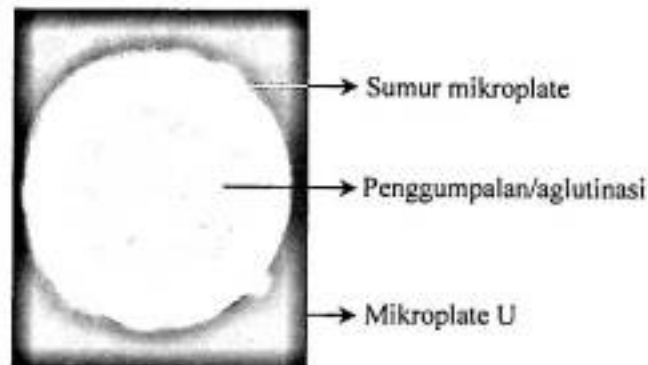


Gambar 4.8 Hasil uji serologi metode aglutinasi untuk antigen H



Keterangan : A. Serum penderita demam tifoid dengan tingkatan +4  
B. Serum penderita demam tifoid dengan tingkatan +3  
C. Serum penderita demam tifoid dengan tingkatan +2  
D. Serum penderita demam tifoid dengan tingkatan +1  
E. Serum non penderita  
1,2,3,4 adalah pengenceran serum dengan antigen masing-masing  
(1:2, 1:4, 1:8, 1:16)

Inset dari gambar diatas dapat dilihat pada gambar 4.9.



Gambar 4.9 Inset gambar

Pada gambar 4.7 dan 4.8 serta tabel 3 terlihat bahwa pada kontrol negatif (serum non penderita) tidak terjadi reaksi aglutinasi setelah antibodi direaksikan dengan antigen lokal *Salmonella typhi*. Hal ini disebabkan karena dalam serum non penderita tidak terdapat antibodi spesifik untuk demam tifoid yang menandakan bahwa orang tersebut belum pernah menderita demam tifoid.

Dari hasil penelitian membuktikan bahwa antigen terbaik yang dapat dijadikan sebagai antigen standar adalah antigen O. Hal ini disebabkan karena antigen O meliputi lipopolisakarida yang terdapat di seluruh permukaan tubuh bakteri, cukup kuat untuk membentuk gumpalan dengan antibodi dalam serum penderita demam tifoid dibandingkan dengan antigen H yang hanya terdiri dari flagel saja, yaitu terdiri dari komponen protein yang disebut flagellin yang bertanggung jawab terhadap aktivitas flagel. Sehingga, antigen H tidak cukup kuat



untuk membentuk aglutinasi ketika direaksikan dengan antibodi dari serum penderita demam tifoid.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap antigen lokal *Salmonella typhi* maka dapat ditarik kesimpulan, yaitu :

- Antigen lokal yang berasal dari sedimen (antigen O) *Salmonella typhi* yang diisolasi dari penderita demam tifoid merupakan antigen lokal yang paling baik sebagai antigen standar dibandingkan dengan antigen H.
- Antigen lokal *Salmonella typhi* yang diisolasi dari penderita demam tifoid melalui proses purifikasi (liofilisasi) dapat digunakan sebagai antigen standar untuk mendeteksi adanya produksi antibodi pada penderita demam tifoid.

#### V.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang lebih banyak untuk menentukan batasan dari antigen lokal yang dibuat sebagai antigen standar.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bakhri, S., 2002. **Demam Tifoid dan Mekanisme Terjadinya.** <http://www.fk.unpad.ac.id/jsp/berita-detil.jsp?id-berita=0020620036>. Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran, Bandung.
- Baratawidjaja, KG., 2002. **Imunologi Dasar Edisi V.** FKUI, Jakarta.25.
- Bellanti, JA., 1993. **Imunologi III.** Gajah Mada University Press, Jogjakarta.
- Burrows, W., 1993. **Text Book of microbiology 20<sup>th</sup> Edition.** W.B. Saunders Company, Mexico.
- Capucino, J.G., 1992. **Microbiology a Laboratory Manual 3<sup>rd</sup> Edition.** Rockland Community College New York, USA.
- Chart H, Cheesbrough JS., Wanghorn DJ., 2000. **The Serodiansis of Infection with *S.typhi*.** Jurnal Clinic Pathology.
- Cushing, JE., Campbell., 1997. **Principles of Immunology.** McGraw-Hill Book company, New York.
- Davis, BD., *et al.* 1990. **Microbiology Third Edition.** Harper International Edition, USA.
- Fardiaz, S., 1993. **Analisis Mikrobiologi Pangan.** Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Garrity, G., 2000. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology 2<sup>nd</sup> Edition.** <http://www.cme.msu.edu/Bergeys/outline.prn.pdf>.
- Gennaro, A.R., 1990. **Remington's Pharmaceutical Sciences 18<sup>th</sup> Edition.** Mack Publishing Company Easton, Pennsylvania.
- Hartini, R., 2000. **Perbandingan Tiga Cara Biakan *Salmonella typhosa*, *Salmonella paratyphosa* A, dan *Salmonella paratyphosa* B sebagai penunjang Diagnosis Demam Tifoid.** Nexus : Jurnal Ilmiah dan Penelitian Medis, Fakultas Kedokteran Sebelas Maret, Surakarta.
- Hatta, M., Sabir, M., Yadi., Firdaus., 2003. **Perbandingan Tes Serologi Dipstik dengan Widal untuk Diagnosis Demam Tifoid.** Jurnal Kedokteran Trisakti. Vol : 22 No. 3



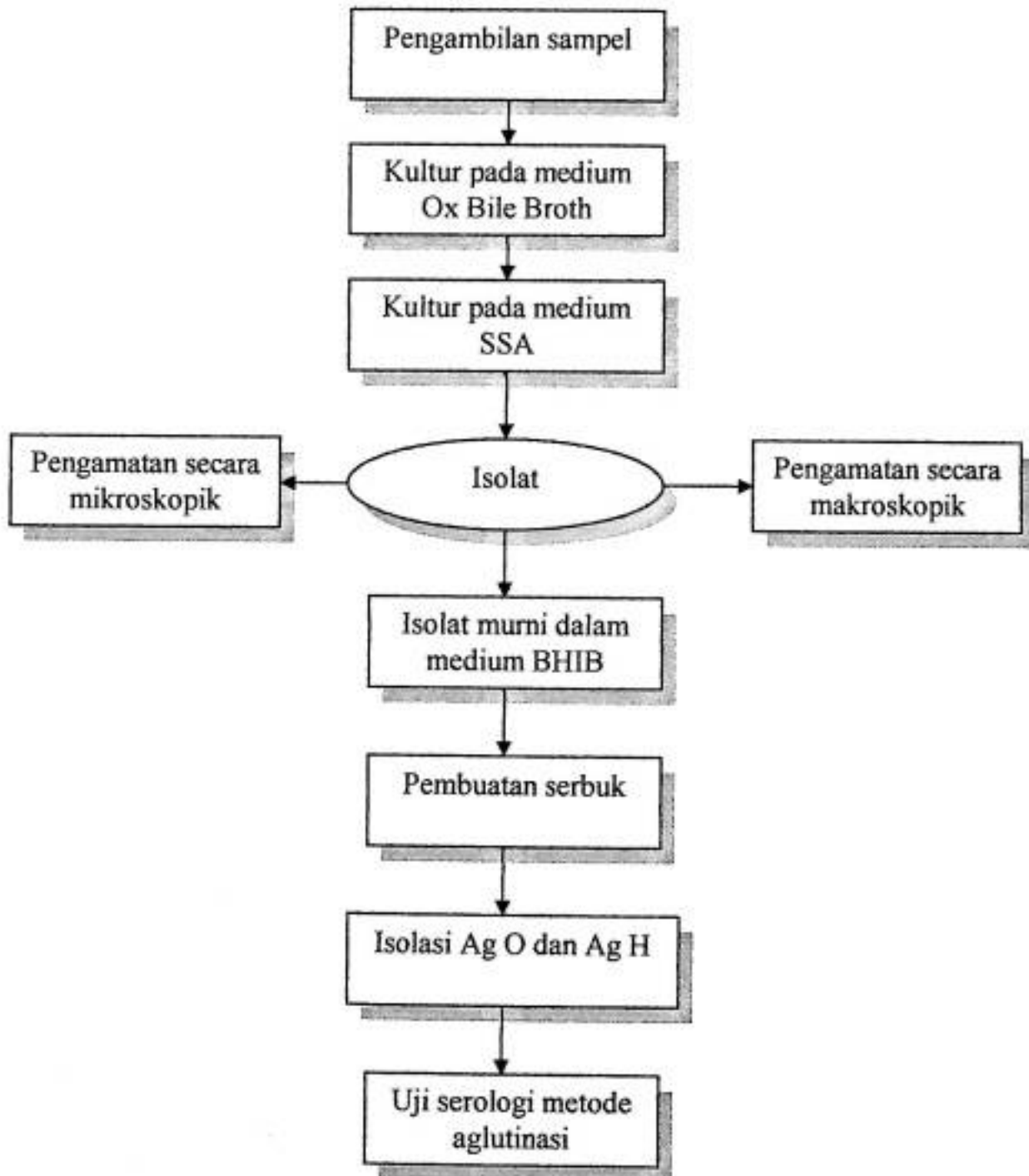
- House, D. *et al.* 2001. **Serology of Typhoid Fever in an Area of Endemicity and Its Relevance to Diagnosis.** *Journal of Clinical Microbiology.* Vol 39 no 3.
- Indan, Dr., 2003. **Mikrobiologi dan Parasitologi Untuk Akademi Keperawatan dan Sekolah Tenaga Kesehatan Yang Sederajat.** PT.Citra Aditya Bakti, Bandung.
- Ismail, T.F., *et al.* 2002. **Evaluation of Dipstick Serologic Tests for Diagnosis of Brucellosis and Typhoid Fever in Egypt.** *Journal of Clinical Microbiology.* Vol 40 : 9
- Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E., 1996. **Review of Medical Microbiology** <sup>11th</sup> Edition. Lange Medical Publication, Canada.
- , Melnick., Adelberg., 2001. **Mikrobiologi Kedokteran Edisi 20.** Salemba Medika, Universitas Airlangga, Jakarta.
- Juwono, R., 1996. **Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid I Edisi ke-3 : Demam Tifoid.** Fakultas Kedokteran UI, Jakarta.
- Kresno, SB., 1996. **Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium Edisi III.** Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Lakare, C., Karema, C.F., 2001. **Reaksi Aglutinasi Widal dan Interpretasinya.** Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran UH, Makassar.
- Lay, BW., 1994. **Analisis Mikroba di Laboratorium.** Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Lay, BW., Hastowo, S., 2000. **Mikrobiologi.** Rajawali Pers, Jakarta.
- Muliawan, S., Surjawidjaja, J.E., 1999. **Diagnosis Dini demam Tifoid dengan Menggunakan Protein Membran Luar *Salmonella typhi* Sebagai Antigen.** Cermin Dunia Kedokteran (Penyakit Infeksi), Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti, Jakarta.
- Munir, M., 2003. **Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati (Life Sciences).** Universitas Brawijaya, Malang.
- Myrvik., Quentin, N., Russel, S., Weiser., 1998. **Fundamental of Medical Bacteriology and Mycology.** Lea & Febiger, Philadelphia.
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S., 2002 **Dasar-Dasar Mikrobiologi II.** UI Press, Jakarta.

Song, J.H., 1993. **Detection of *Salmonella typhi* in the Blood of Patients with Typhoid Fever by PCR.** Journal of Clinical microbiology. Vol 31 : 43.

Volk, WA., 1998. **Mikrobiologi Dasar Jilid 1 Edisi V.** Erlangga, Jakarta.

## Lampiran I

### SKEMA ALUR PENELITIAN



## Lampiran 2.

Komposisi larutan zat warna, pengencer dan reagen yang digunakan.

### 1. Larutan Lugol

Kristal Iodine	1 gr
Kristal KI	2 gr
Air suling	300 cc

### 2. Reagen metil red (MR)

Merah metal	0,2 gr
Etanol 95%	600 mL
Air suling	400 mL

### 3. Reagen Voges Proskauer (VP)

Alfa naftol : Alfa-naftol	5 gr
Etanol 95%	100 mL
KOH 40% : KOH	40 gr
Air suling	100 mL

### 4. Reagen kovaks

Para-dimetil-amino-benzaldehid	5 gr
Butanol	75 mL
HCl pekat	250 mL

### 5. Phosphate-buffer saline (PBS) pH 7,4

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	12,8 gr
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	2,62 gr
NaCl	1,6 gr
$\text{H}_2\text{O}$	1 L

6. Brain Heart Infusion Broth (BHIB)

Calf heart infusion solid	12,5 gr
Calf brain infusion solid	5,0 gr
Proteose peptone	10 gr
Glukosa	2 gr
Sodium clorida	5 gr
Di sodium phosphate	2,5 gr
Aquades	1 L

7. Salmonella Shigella Agar (SSA)

Pepton	10 gr
Lactosa	10 gr
Ox bile, drie	8,5 gr
Sodium sitrat	10 gr
Sodium tiosulfat	8,5 gr
Amonium iron (III) citrate	1 gr
Brilliant hijau	0,0003 gr
Neutral merah	0,025 gr
Agar	12 gr
Aquades	1 L

8. Simmon Citrat Agar (SCA)

Magnesium sulfat	0,2 gr
Ammonium dihydrogen pospat	0,2 gr
Sodium ammonium pospat	0,8 gr



Sodium citrate	2,0 gr
Sodium clorida	5,0 gr
Bromtimol biru	0,08 gr
Agar	15 gr
Aquades	1 L

9. Sulfit Indol Motility (SIM)

Peptone	30 gr
Beef ekstrak	3,0 gr
Ferro ammonium sulfat	0,2 gr
Sodium tiosulfat	0,0025 gr
Agar	3,0 gr
Aquades	1 L

10. Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Beef ekstrak	3,0 gr
Yeast ekstrak	3,0 gr
Peptone	15,0 gr
Protease peptone	5,0 gr
Lactose	10,0 gr
Saccharose	10,0 gr
Dextrose	1,0 gr
Ferro sulfat	0,2 gr
Sodium clorida	5,0 gr
Sodium tiosulfat	0,3 gr

Fenol merah	0,024 gr
Agar	12,0 gr
Aquades	1 L

11. Medium Gula-gula (glukosa, laktosa, sukrosa, manitol)

Peptone	5,0 gr
Glukosa	5 gr
Laktosa	5 gr
Sukrosa	5 gr
Manitol	5 gr
Aquadest	1 L

12. Medium MR-VP

Polipeptone	7,0 gr
Dekstrosa	5,0 gr
Dikalium fosfat	5,0 gr; pH 6,9
Aquadest	1 L