

**ANALISIS HUBUNGAN FLAGELLA DENGAN GEN  
FLAGELLIN PADA PENDERITA DEMAM TIFOID  
ASAL JAYAPURA DENGAN TEKNIK PCR**

**HAMID  
N121 07 008**



10 - 2 - 10

Farmasi

1 elg

Hamid

SKR - #10

HAM

a

**PROGRAM KONSENTRASI  
TEKNOLOGI LABORATORIUM KESEHATAN  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2010**

**ANALISIS HUBUNGAN FLAGELLA DENGAN GEN  
FLAGELLIN PADA PENDERITA DEMAM TIFOID  
ASAL JAYAPURA DENGAN TEKNIK PCR**

**SKRIPSI**

**untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi  
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**HAMID  
N121 07 008**

**PROGRAM KONSENTRASI  
TEKNOLOGI LABORATORIUM KESEHATAN  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2010**

**ANALISIS HUBUNGAN FLAGELLA DENGAN GEN  
FLAGELLIN PADA PENDERITA DEMAM TIFOID  
ASAL JAYAPURA DENGAN TEKNIK PCR**

HAMID

N121 07 008

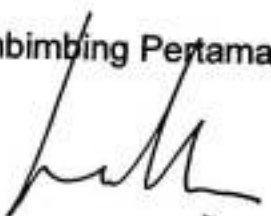
Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama,



Drs. Hasyim Bariun, M.Sr, Apt  
NIP. 19470314 198003 1 001

Pembimbing Pertama,



Prof.dr.Mochammad Hatta, SpMK, Ph.D  
NIP. 1957 0416 198503 1 001

Pembimbing Kedua,



dr. Suci Aprianti, Sp.PK  
NIP.19650415 199903 2 002

Pada Tanggal: 18 Januari 2010

## ABSTRAK

Telah di lakukan penelitian analisis hubungan flagella dengan gen flagellin pada penderita demam tifoid asal Jayapura. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui terdapat hubungan antara flagella dengan gen flagellin menggunakan teknik PCR. Penelitian ini adalah uji diagnostik menggunakan pendekatan *cross sectional* pada darah yang diambil dari penderita demam tifoid sebanyak 67 sampel. Hasil penelitian menunjukkan tidak terdapat hubungan antara flagella dengan gen flagellin dengan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) = -0,061.

Kata Kunci : Flagella, Flagellin dan PCR

## ABSTRACT

A research has been done about analysis the correlation of flagella with flagellin gen on typhoid fever patient from Jayapura. The aim of this research is to know the correlation between flagella with flagellin gen using PCR technique. The research is a diagnostic test using cross sectional approach on blood sample that taken from typhoid fever patient that are 67 samples. The result shows that there is no correlation between flagella and flagellin gen with coefisien correlation  $(r) = -0.061$ .

Key word : Flagella, Flagellin dan PCR

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan ke Hadirat Allah Rabbul alamin yang telah melimpahkan rahmat, hidayat serta taufiknya, yang telah memberi kekuatan, ketabahan, kesabaran dan kesehatan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "*analisis hubungan flagella dengan gen flagellin pada penderita demam tifoid asal Jayapura dengan teknik PCR*" sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada jurusan Teknologi Laboratorium Kesehatan pada Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin Makassar.

Penulis menyadari bahwa dengan selesainya skripsi ini, tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada Bapak Drs. Hasyim Bariun, Msi,Apt sebagai pembimbing utama, Bapak Prof.dr.Mochammad Hatta, SpMK, Ph.D, sebagai pembimbing pertama dan Ibu dr.Suci Aprianti, Sp.PK sebagai pembimbing kedua, yang telah menuntun dan membimbing penulis, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Ucapan terima kasih terima kasih yang tulus juga penulis sampaikan kepada :

1. Dekan Fakultas Farmasi UNHAS, atas kesediaannya menerima penulis sebagai peserta pendidikan di program Konsentrasi Teknologi Laboratorium Kesehatan, Fakultas Farmasi UNHAS.
2. Ketua Program Konsentrasi Teknologi Laboratorium Kesehatan beserta staf, atas bimbingan serta asuhannya selama penulis menjalani pendidikan.
3. Pembantu dekan I, pembantu dekan II Fakultas Farmasi UNHAS dan dosen – dosen Program Konsentrasi Teknologi Laboratorium Kesehatan yang amat penulis hormati yang telah membimbing penulis selama masa pendidikan sampai penulisan karya akhir ini.
4. Bapak Gubernur Provinsi Papua beserta jajarannya yang telah mendukung biaya pendidikan ini.
5. Kepala Instalasi Laboratorium Patologi Klinik RSUD Jayapura, yang telah memberikan bantuan Fasilitas penyimpanan sampel selama penulis melaksanakan penelitian, hingga terselesainya skripsi ini.
6. Kepala Balai Laboratorium Kesehatan Jayapura beserta stafnya yang telah memberikan bantuan fasilitas selama penulis melakukan penelitian, hingga terselesainya skripsi ini
7. Kepala RSAL Jayapura beserta seluruh jajarannya yang telah memberikan bantuan fasilitas selama penulis melakukan pengambilan sampel, hingga terselesaikannya skripsi ini

8. Kepala Laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi beserta staf dan jajarannya, terkhusus Mas Rommy Usman yang selalu membimbing penulis selama penelitian berlangsung
9. *Salmonella typhi* tim ( Ningsih, Rini Cicilia, Rini Amra dan Camel ) atas kebersamaan, kesabaran, kesetiaan, ketulusan dan ketabahan selama mengalami kendala dalam penelitian, sehingga suka dan duka kita lalui bersama serta semua teman seangkatan.
10. Kedua orang tua dan Bapak mertua (alm) dan ibu mertua yang tercinta, terima kasih atas doa, dukungan serta cinta kasihnya selama ini sehingga ananda dapat menyelesaikan skripsi ini pada waktunya.

Dan akhirnya skripsi ini secara khusus kupersembahkan untuk yang tercinta Luluk Indayati dan kedua mutiaraku macco ( Mawar dan Collin ) terima kasih atas doa, kesabaran, dan pengertiannya dengan tersitannya waktu dan kasih sayang selama menjalankan pendidikan.

Dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, Amin.....

Makassar, 18 Januari 2010

HAMID





## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN PENUNJUK SKRIPSI .....	ii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
BAB I PENDAHULUAN .....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	4
II.1 Tinjauan Umum Demam Typhoid.....	4
II.2 Tinjauan Salmonella typhi .....	9
II.3 Morfologi dan Fisiologi Salmonella typhi .....	9
II.4 Klasifikasi S.typhi .....	11
II.5 Daya Tahan S.typhi.....	11
II.6 Struktur Antigen.....	12
II.8 Flagella S.typhi.....	14
II.9 Antigen Flagella (Antigen H).....	18
II.10 Gen Spesifik S,typhy .....	19
II.10 Gen Flagellar H1 (Fli C).....	19
II.10. Gen Flagella H1-j.....	20
II.11 Mekanisme Infeksi S.typhy pada penderita Demam ....	20
II.12 Gejala Klinis .....	21
II.13 Mekanisme Penularan S.typhi pada manusia .....	22
II.14 Diagnosa Laboratorium .....	23
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN .....	32
III.1 Jenis Penelitian .....	32
III.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....	32
III.3 Populasi dan Sampel.....	32

III.4	Kerangka Penelitian .....	33
III.5	Definisi Operasional .....	34
III.6	Prosedur Kerja .....	35
III.7	Uji Widal .....	36
III.8	Teknik PCR .....	37
III.10	Analisa Data .....	39
III.11	Pembahasan Hasil .....	39
III.12	Kesimpulan.....	39
<b>BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....</b>		<b>40</b>
IV.1	Hasil Penelitian .....	40
IV.2	Pembahasan.....	44
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>		<b>48</b>
V.1	Kesimpulan .....	48
V.2	Saran .....	48
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>49</b>
<b>LAMPIRAN – LAMPIRAN .....</b>		<b>54</b>

## DAFTAR LAMPIRAN

1. Alur kerangka konsep Analisis flagelin .....	57
2. Alur Kerja Penelitian.....	58
3. Skema Kerja Ekstraksi DNA metode BOOM.....	59
4. Skema Kerja Deteksi DNA Neste PCR .....	60
5. Hasil Widal dan PCR.....	61
6. Tabel Hasil Pengolahan Data SPSS Uji X2 (chi-square).....	65
7. Tabel Hasil Pengolahan Data SPSS Uji X2(chi-square).....	66
8. Bahan – bahan Isolasi DNA.....	69
9. Gambar 1.Mesin Amplifikasi DNA .....	71
10. Gambar 2. Running Elektroforesis .....	71
11. Gambar 3. Mesin PCR .....	72
12. Foto hasil PCR S.typhi pada Gel 1 .....	73
13. Foto hasil PCR S.typhi pada Gel 2.....	73
14. Foto hasil PCR S.typhi pada Gel 3.....	73
15. Foto hasil PCR S.typhi pada Gel 4.....	74
16. Foto hasil PCR S.typhi pada Gel 5.....	74

# BAB I

## PENDAHULUAN

Demam tifoid adalah gejala penyakit infeksi akut pada usus halus yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* dengan gejala utama demam yang berkepanjangan, gangguan saluran pencernaan, dan gangguan kesadaran.<sup>(1)</sup>

Di seluruh dunia diperkirakan 21 juta penderita demam tifoid dengan 5 juta kasus *Salmonellosis*. Indonesia merupakan salah satu negara dengan insiden demam tifoid tertinggi di dunia. Hampir 80% kasus demam tifoid ditemukan pada anak – anak dan dewasa, usia antara 5 – 29 tahun dan kelompok yang mudah terpapar sebagian besar terjadi pada umur 3 – 19 tahun.<sup>(2)</sup>

Di Propinsi Papua, prevalensi demam tifoid termasuk salah satu dari tiga belas propinsi yang mempunyai prevalensi diatas angka nasional yaitu sekitar 1,6%. (rentang 0,3% - 3.0%).<sup>(3)</sup>

Diagnosis defenitif dan merupakan baku emas (gold standard) diagnosis penyakit demam tifoid berdasarkan pada isolasi kuman *salmonella typhi* yang berasal dari cairan biologis dari penderita yaitu darah. Kultur darah memerlukan waktu yang cukup lama (4-7 hari), memerlukan peralatan yang rumit dan tidak semua laboratorium mampu melaksakannya serta prosentase tingkat kepositifan biasanya menurun setelah minggu pertama demam, dan tes mungkin menunjukkan negatif palsu oleh pemberian antibiotik sebelumnya.<sup>(4,5)</sup>

Tes serologi yang dilakukan adalah uji widal yang digunakan untuk melacak kenaikan titer dengan cara menentukan titer agglutinin O dan H. Namun peran tes widal dalam diagnosis demam tifoid sampai saat ini masih kontroversial karena sensitivitas masih diragukan.<sup>(6)</sup>

Adanya keterbatasan teknik – teknik diatas maka dilakukan berbagai upaya untuk pemeriksaan laboratorium yang sensitive untuk mendeteksi pasien demam tifoid dan spesifik untuk menghindari salah diagnosis dengan penyakit demam yang lain.

Dewasa ini telah tersedia beberapa metode untuk mendeteksi keberadaan gen. Teknik PCR mampu merevolusi berbagai aspek dalam riset termasuk diagnostik efek genetik, kelainan metabolik, penyakit bawaan, hingga mendeteksi virus.<sup>(7)</sup>

Flagella mengandung protein yang disebut flagellin, yang diakui sebagai tanda bahaya oleh system kekebalan tubuh. *Salmonella typhi* adalah bakteri yang menyebabkan demam tifoid memiliki flagella H.<sup>(8)</sup> Flagellin bertanggung jawab terhadap aktivitas flagella. Flagellin bersifat sangat antigenik. Keberadaan gen flagellin dapat di diagnose dengan menggunakan teknik PCR serta dapat menunjukkan diagnosis yang spesifik terhadap *Salmonella typhi*.<sup>(10)</sup>

Spesifitas PCR sebesar 100% dengan sensitivitas yang 10 kali lebih baik dimana mampu mendeteksi 1-5 bakteri/ml darah dan mempunyai sensitifitas sebesar 63% bila dibandingkan dengan metode yang lainnya.<sup>(9)</sup>



Berdasarkan latar belakang tersebut diatas maka akan dilakukan penelitian dengan rumusan masalah apakah terdapat hubungan antara flagella dengan gen flagellin pada penderita demam tifoid. Untuk memecahkan masalah tersebut dilakukan penelitian tentang analisis hubungan flagella dengan gen flagellin pada penderita demam tifoid asal Jayapura dengan teknik PCR.

Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mendeteksi Antibodi IgM dalam serum terhadap Antigen flagella dan hubungannya dengan keberadaan gen flagellin.

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah Menambah informasi ilmiah tentang penelitian *salmonella typhi* serta data yang ada diharapkan dapat menjadi petunjuk untuk penelitian selanjutnya dalam menegakkan diagnosis demam tifoid.

Hipotesis dari penelitian ini adalah mendeteksi antibodi IgM dalam serum terhadap Antigen flagella dan hubungannya dengan keberadaan gen flagellin.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1. Tinjauan umum Demam Tifoid

Demam tifoid merupakan infeksi akut pada usus halus yang biasanya lebih ringan dan menunjukkan manifestasi klinis yang sama dengan enteris akut. Oleh karena itu penyakit ini disebut juga demam enterik. Demam enterik (demam tifoid) gejala ini disebabkan oleh *Salmonella typhi*. Ketika *Salmonell typhi* mencapai usus kecil, kemudian masuk melalui getah bening dan kemudian ke aliran darah. Mereka dibawah oleh darah kebeberapa organ, termasuk usus. Organisme tersebut meningkat didalam jaringan getah bening intestinal dan dikeluarkan dalam tinja. Sesudah masa inkubasi 10-14 hari, demam, rasa tidak enak badan, sakit kepala, konstipasi, bradycardi dan myalgi terjadi.

(12)

Demam adalah reaksi fisiologis tubuh yang kompleks terhadap penyakit yang ditandai dengan meningkatnya suhu tubuh diatas normal akibat rangsangan zat pirogen terhadap kontrol suhu tubuh dihipotalamus, suhu tubuh normal berkisar antra 36,1°C – 37,7°C. Demam tifoid adalah suatu penyakit infeksi akut yang terjadi pada usus halus disebabkan oleh *Salmonella thypi*.<sup>(12)</sup> Terdapat 2 tingkatan pada penyakit demam tifoid, yaitu :

- Fase pertama



Suhu tubuh meningkat sampai 40°C disertai dengan keluarnya keringat, nafsu makan menurun, batuk, sakit kepala, dan sukar buang air besar. Pada anak-anak, sering muntah dan diare. Fase pertama berakhir dalam seminggu dan menjelang berakhir penderita tidak bergairah dan kurang kesadaran.

- Fase kedua

Pada minggu kedua sampai minggu ketiga, gejala infeksi intestinal semakin jelas dan demam semakin meningkat, dan denyut nadi menjadi lemah dan cepat, nafas berbau tidak sedap, kulit kering, bibir kering pecah-pecah, lidah ditutupi selaput putih dan kelihatan kotor, dan perut kembung orang tersebut tampak sakit berat. Pada minggu ketiga sukar buang air besar dan diganti dengan diare. Feses juga mungkin mengandung darah. Demam tifoid yang berat menimbulkan komplikasi pendarahan, kebocoran usus (perforasi), infeksi selaput usus (peritonitis), bronchopneumoniae dan kelainan otak (*Encephalopathy, meningitis*). Gejala ini tidak sampai pada minggu keempat dan kelima dimana penurunan demam dan kondisi umum lainnya membaik secara perlahan.<sup>(11)</sup>

Penyakit ini tersebar diseluruh dunia, terutama di negara-negara berkembang dengan tingkat pendidikan dan kesejahteraan yang rendah serta sanitasi yang buruk. Penyakit ini kebanyakan dijumpai di Asia Tenggara, Afrika, dan Amerika Latin. Kasus kejadian demam tifoid yang disebabkan *Salmonella typhi*, pada tahun 2002 mencapai 22 juta dengan



200.000 angka kematian. *Salmonella paratyphi* A,B atau C diperkirakan mencapai 5,5 juta kasus demam tifoid setiap tahunnya. *Salmonella paratyphi* A lebih sedikit menimbulkan penyakit dibandingkan *Salmonella typhi*, dengan gejala predominan gastrointestinal. Tingkat kematian penderita demam tifoid yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* sekitar 2% di Pakistan dan Vietnam mencapai 30 – 40% di Indonesia dan Papua Nugini.<sup>(13)</sup> Insiden penyakit ini hampir semua sama setiap tahun, termasuk kelompok mortalitas tertinggi di dunia. Berdasarkan laporan WHO lebih dari 17 juta kasus demam tifoid setiap tahun, angka kejadiannya cukup tinggi di negara berkembang seperti Indonesia, diperkirakan 800 per 100.000 penduduk per tahun menderita penyakit demam tifoid.<sup>(14)</sup> Keadaan ini tercermin pada tingginya angka kejadian per 100.000 penduduk di pedesaan dan 810 per 100.000 penduduk perkotaan, peningkatan angka kesakitan sebesar 34% dari tahun 1981 sampai 1986, angka kematian secara nasional berkisar antara 2 – 3,5% dan kekebalan obat pilihan untuk demam tifoid cenderung meningkat. Di Indonesia, penyakit ini mempunyai kecenderungan meningkat yaitu insiden pada tahun 1990 adalah 9,2 menjadi 15,4 per 100.000 penduduk pada tahun 1994. Angka kematian penyakit demam tifoid diperkirakan sebesar 2,5% dari seluruh kematian. Pada perjalanan penyakit, sekitar 3-5% pasien menjadi karier asimtomatik, merupakan ancaman sumber penularan penderita baru.<sup>(15)</sup>

Penyebaran penyakit ini sebagai penyakit menular, tidak terlalu bergantung pada iklim. Penyebaran penyakit ini juga tidak dipengaruhi oleh jenis kelamin. Laki-laki maupun perempuan mempunyai resiko yang sama terkena penyakit ini.<sup>(16)</sup>

Insiden tertinggi terdapat pada golongan umur 3-19 tahun(78%) suatu golongan khusus di masyarakat yang terdiri dari anak-anak sekolah. Gejala klinis pada anak-anak bervariasi mulai dari sangat ringan bahkan tanpa gejala sampai sangat berat seperti kejang-kejang dan tidak sadar.<sup>(17)</sup>

Tifoid merupakan penyakit menular yang penularannya terjadi melalui makanan dan minuman. Berikut adalah beberapa sumber infeksi yang penting :

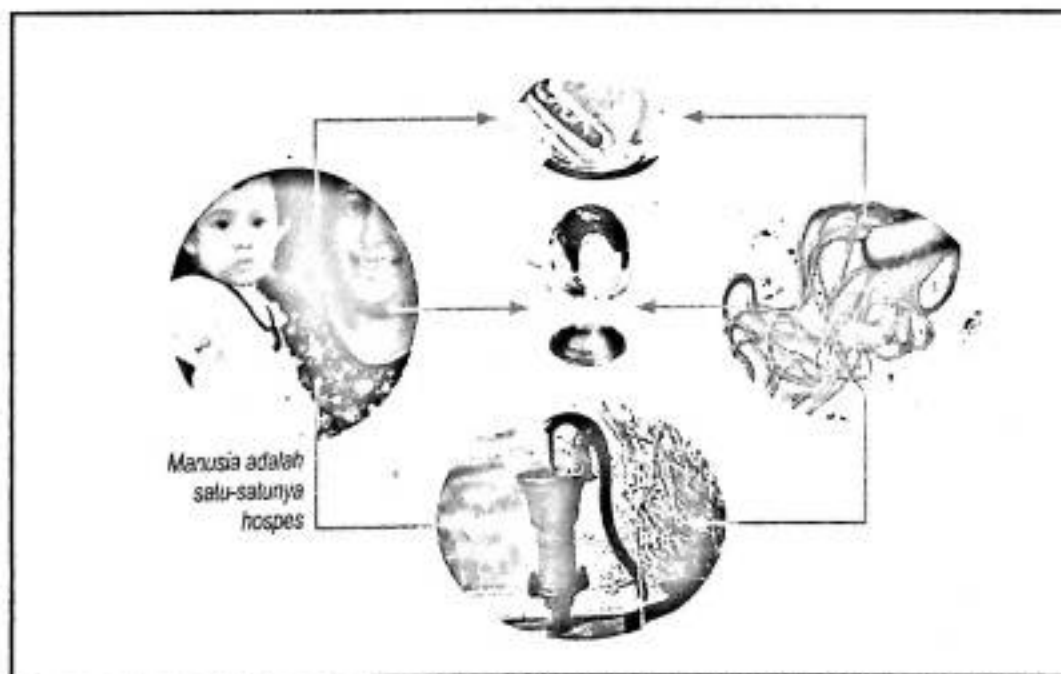
1. Air, kontaminasi dengan feses sering menimbulkan epidemik yang luas.
2. Susu dan produk susu lain (es krim, keju, pudding) kontaminasi dengan feses dan pasteurisasi yang tidak adekuat atau penanganan yang salah. Beberapa wabah dapat ditelusuri sampai sumber kumannya.
3. Kerang, dari air yang terkontaminasi.
4. Telur beku atau dikeringkan, dari unggas yang terinfeksi atau terkontaminasi saat pemrosesan.
5. Daging dan produk daging, dari hewan yang terinfeksi (hewan ternak) atau kontaminasi oleh feses melalui hewan pengerat atau manusia.

6. Obat "rekreasi" mariyuana dan obat lainnya.
7. Pewarna hewan, pewarnaan (misal, carmine) digunakan untuk obat, makanan, dan kosmetik.

Misalnya *carmine* digunakan dalam obat, makanan, dan kosmetik

8. Hewan piaraan, kura – kura, anjing, kucing dan lain-lain.<sup>(23)</sup>

Di Provinsi Papua, prevalensi demam tifoid termasuk salah satu dari tiga belas provinsi yang mempunyai prevalensi diatas angka nasional yaitu sekitar 1,6% (rentang 0,3-1,3%). Menurut diagnosa dan gejala kelompok umur yang rentan terhadap penyakit tifoid di provinsi Papua berada pada rentang umur ( 1- 74 thn) dengan kisaran antara (1.3 – 3.3%) dan terendah pada kelompok umur kurang dari satu tahun atau lebih dari 75 tahun.<sup>(3,9)</sup>



Gambar 1. Rantai penularan demam tifoid (Sumber : Crishantoro T. *Tubex if magnetic semi quatitative rapid immunoassay tes for typhoid vefer diagnostic. 2<sup>nd</sup> ed.* PT. Pacific Biotekindo Interlab, Jakarta.2006)

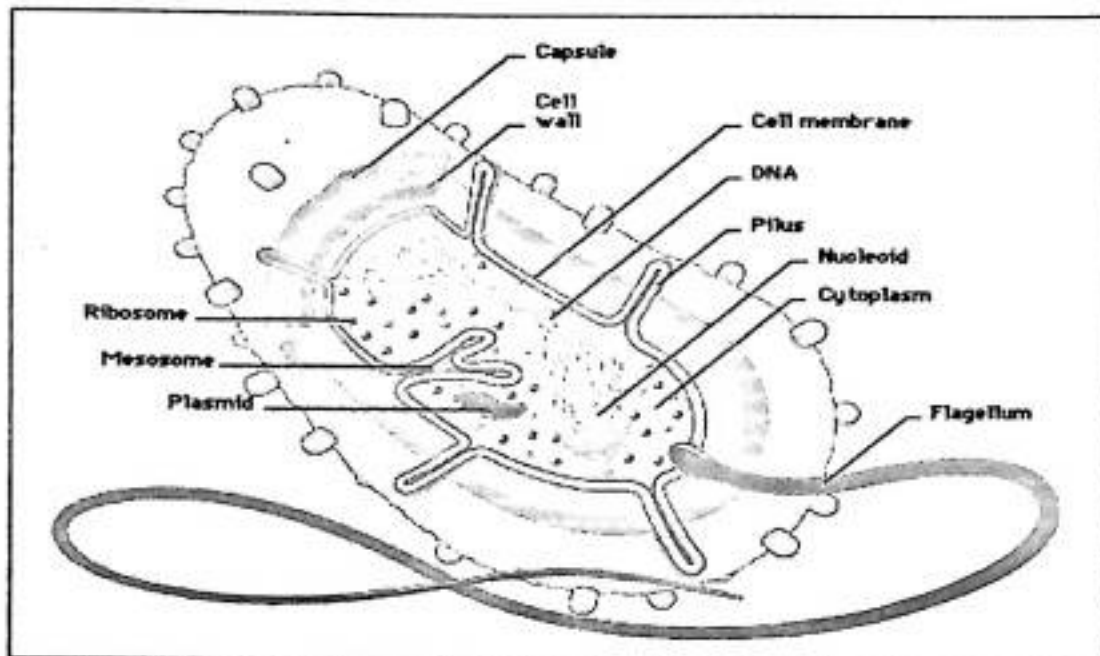
## II.2. Tinjauan umum *Salmonella typhi*

*Salmonella typhi* memproduksi H<sub>2</sub>S, tidak membentuk gas dari glukosa, tidak dapat melakukan dekarboksilat terhadap ornitin, tidak memfermentasi rhamnosa. Tumbuh pada suhu antara 5°C - 47°C, dengan suhu optimum 35°C - 37°C. Beberapa sel dapat tetap hidup selama penyimpanan beku, tumbuh pada pH optimum 6,5 – 7,5 nilai pH minimum dapat bervariasi tergantung pada serotype, suhu inkubasi, komposisi media dan jumlah sel. Pada pH kurang dari 4,0 dan lebih dari 9,0 *Salmonella typhi* akan mati secara perlahan. Bakteri ini tidak dapat dibedakan hanya dari sifat-sifat biokomia dan morfologinya, perlu diidentifikasi secara serologik. Berdasarkan skema Kautman White yang membedakan *Salmonella typhi* berdasarkan sifat-sifat antigeniknya. *Salmonella typhi* hidup secara anaerobik fakultatif, reaksi fermentasi terhadap mannitol, sarbitol positif, dan memberikan hasil negatif pada indol, fenil alanin, adonitol dan tidak tumbuh dalam Kalium Cianida (KCN).  
(18)

## II.3. Morfologi dan Fisiologi *Salmonella typhi*

*Salmonella typhi* merupakan bakteri yang hidup secara berkoloni, tidak memiliki spora, memiliki flagel, berukuran 2-4 µm x 0.5-0.8 µm(7). Apabila dilakukan pengecatan gram, bakteri ini akan berwarna kemerahan yang berarti bahwa bakteri merupakan gram negatif. Pada biakan agar darah, koloninya akan berdiameter mencapai 2-3mm. Bakteri ini hidup

pada kondisi aerob maupun anaerob fakultatif, pada suhu 15°C-41°C (suhu pertumbuhan optimum 37°C).<sup>(13)</sup>



Gambar 2. Morfologi *Salmonella typhi* ( Sumber. Abyankar. Antigenic Structure Of *Salmonella*. <http://www.geocities.com/Pustaka/avinas/antigen.htm>.)

*Salmonella typhi* merupakan salah satu genus dari family *Enterobacteriaceae*, bersifat gram negatif, bersifat motil dan mempunyai flagella peritrikus tidak membentuk spora, ukuran 1-2 x 0.5 sampai 0.8  $\mu\text{m}$ .<sup>(7)</sup> Struktur dinding sel *Salmonella typhi* memiliki membran sitoplasma yang dikelilingi oleh lapisan peptidoglikan yang disebut lapisan murein dan terdiri dari rantai panjang ikatan disakarida yang berulang. Rantai gula berikatan dengan oligopeptida. Lapisan ketiga yang terdapat diluar membran tersusun atas fosfolipid lapis dua pada bagian lipopolisakarida (LPS). Lipopolisakarida tersusun atas dua bagian, dari luar Lemak (lipid A) terdapat pada membran, sebuah selubung dan gula rantai pada oligosakarida. Bentuk akhirnya disebut antigen O. Lipid A memiliki

tingkatan toksisitas yang cukup tinggi (*endotoksin*) dan menyebabkan efek demam dan syok.<sup>(19)</sup>

#### II.4. Klasifikasi *Salmonella typhi*

Klasifikasi *Salmonella typhi* dalam "*Bergey's manual of Determinative Bacteriology*"<sup>(20)</sup> :

<i>Kingdom</i>	: <i>Procaryotae</i>
<i>Phylum</i>	: <i>Proteobacteria</i>
<i>Classis</i>	: <i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Ordo</i>	: <i>Enterobacteriales</i>
<i>Famili</i>	: <i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Salmonella</i>
<i>Species</i>	: <i>Salmonella typhi</i>

#### II.5. Daya tahan *Salmonella typhi*

*Salmonella typhi* mati pada pemanasan suhu 55°C selama 1 jam, atau 60°C selama 15-20 menit. Tumbuh subur pada medium yang mengandung garam empedu, dan sodium tetrasetat. Senyawa tersebut dapat menghambat pertumbuhan kuman Coliform sehingga dapat digunakan sebagai media isolasi kuman *Salmonella*.<sup>(21)</sup> Pada biakan *Salmonella*, *Salmonella typhi* sanggup bertahan selama beberapa bulan, bahkan beberapa tahun. Diluar tubuh, lingkungan alam basah, *Salmonella typhi* secara bertahap akan mati, tetapi beberapa hasil dapat tahan hidup hingga beberapa minggu lamanya, misalnya pada tanah yang basa, atau air limbah yang kotor, pada keadaan kering, kuman lebih cepat



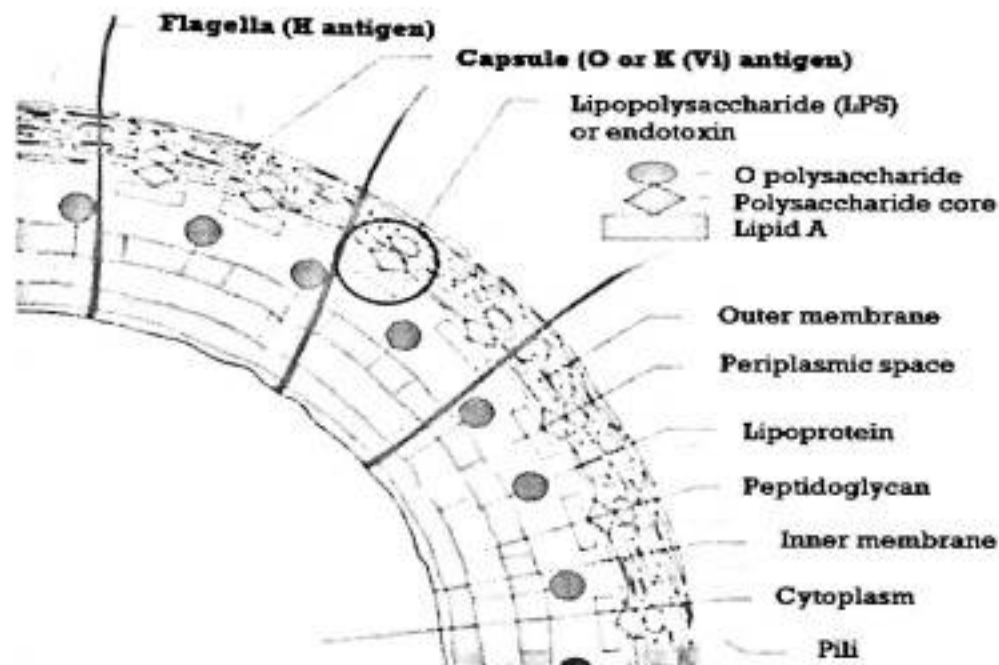
mati dalam beberapa jam, sehingga penyebaran melalui debu atau material yang terkontaminasi dalam suasana kering sangat kecil, dibandingkan dengan melalui air atau bahan makanan yang basah(7,21).

## II.6. Struktur Antigen (Ag)

*Salmonella typhi* memiliki 5 jenis antigen, yaitu antigen O (somatik) antigen H (*flagella*) dan antigen Vi (*permukaan*), Outer Membran Protein (OMP), Heat Shock Protein (HSP). Antigen O terdapat pada lapisan dinding luar bakteri, mempunyai komponen protein lipopolisakarida (LPS) dan lipid.<sup>(7)</sup> Antigen O bersifat hidrofilik dan memungkinkan bakteri membentuk suspensi yang homogen dalam larutan salin. Antigen ini dapat tahan hidup terhadap panas hingga suhu 100°C selama 2-5 jam, tahan terhadap alkohol 96% pada suhu 37°C selama 4 jam. Antigen O apabila dalam tubuh merespon terbentuknya Antibodi IgM. Antigen O mempunyai susunan kimia determinan antigenik O, yaitu Lipid A, adalah lipid dari lipopolisakarida (LPS) bertanggung jawab atas toksisitas dari endotoksin, *basal core polysacharida* bertanggung jawab atas spesifik antigen, dan O-spesifik chains, yang menentukan spesifitas serologik dari LPS. Ketika komponen ini membentuk LPS disebut endotoksin.<sup>(21)</sup> Antigen H terdapat di flagella, fimbriae dan pili pada bakteri yang mempunyai komponen protein. Antigen H labil terhadap panas dan alkohol, tetapi tahan terhadap formaldehid 0.04-0.2%. Pemanasan dengan suhu melebihi 60°C akan melepaskan flagel dari bakteri dan dengan pemanasan suhu 100°C selama 30 menit akan melepaskan semua flagella. Antigen Vi adalah

antigen kapsular yang dinyatakan dengan simbol Vi yang merupakan polimer dari polisakarida yang bersifat asam, terdapat pada selaput dinding bagian luar bakteri, hampir semua strain *Salmonella typhi* membentuk antigen Vi sebagai lapisan pelindung di luar dinding selnya. Antigen Vi biasanya tidak digunakan untuk menentukan diagnosis infeksi, tetapi hanya dipakai untuk mendeteksi karier.<sup>(21,22)</sup> *Outer Membrane Protein* (OMP), merupakan bagian dari dinding sel yang terletak di luar membrane sitoplasma dan lapisan peptidoglikan yang membatasi sel terhadap lingkungan sekitarnya. OMP berfungsi sebagai barier fisik yang mengendalikan masuknya zat dan cairan ke dalam membrane sitoplasma untuk bakteriofag dan bakteriosin. *Heat Shock Protein* (HSP) atau stress protein, adalah protein yang diproduksi oleh jasad renik dalam lingkungan yang terus bertambah, terutama yang menimbulkan stress pada jasad renik tersebut dalam usahanya untuk dapat mempertahankan hidupnya. Disamping potensi biologisnya, HSP mempunyai daya imunogenik yang cukup besar sehingga dapat membangkitkan respon imun, baik seluler maupun humoral, baik protektif maupun nonprotektif. Atas dasar ini, maka HSP dapat dipakai baik untuk keperluan diagnostik (sebagai antigen dari immunoasai) maupun untuk keperluan preventif (untuk vaksin).<sup>(37,38)</sup>





Gambar 3. Struktur Antigen *Salmonella* (21) Anonim). Genus *Salmonella*. [dikutip 30 Juni 2009]. Available from: [www.vphcap.org/file/THESIS/4634903Mr.Arsooth/chapter2.pdf](http://www.vphcap.org/file/THESIS/4634903Mr.Arsooth/chapter2.pdf)

## II.7. Flagella *Salmonella typhi*

Flagella adalah bagian bakteri yang berbentuk seperti benang, yang umumnya terdiri dari sub unit - sub unit protein yang disebut flagellin dengan diameter 12-30 nanometer. Flagella bakteri terbentuk dari ribuan molekul suatu subunit protein yang disebut flagellin. Flagella terbentuk dari kumpulan subunit yang membentuk struktur heliks. Jika flagella dilepaskan secara mekanisme melalui pemecahan suspensi bakteri, akan segera terbentuk flagella yang baru yang disintesis, disambung dan dibentuk oleh subunit flagellin. Pergerakan bisa setelah 3-6 menit. Terdapat dugaan bahwa flagellin pada berbagai spesies bakteri memiliki struktur primer yang berbeda-beda. Flagellin bersifat sangat antigenik (*antigen H*) dan beberapa respon imun terhadap infeksi ditunjukkan untuk protein ini. Flagella melekat pada badan sel bakteri melalui struktur

kompleks yang tersusun atas kait dan badan basal. Kait merupakan suatu struktur melengkung pendek yang berperan sebagai penghubung utama antara motor dari badan basal dengan flagella. Pada badan basal terdapat beberapa pasang cincin, sepasang pada bakteri gram positif dan dua pasang pada bakteri gram negatif. Cincin yang ditandai dengan label L dan P tidak terdapat pada bakteri gram positif. Flagella merupakan alat pergerakan. Berdasarkan letak dan jumlah flagellanya, flagella bakteri dikelompokkan menjadi :

1. Atrik bakteri yang tidak mempunyai flagellum
2. Monotrik, yaitu memiliki flagellum tunggal
3. Lopotrik, yaitu memiliki seberkas flagella yang mengutub
4. Amfitrik, yaitu memiliki flagella, baik tunggal maupun sekelompok pada kedua ujung.
5. Peritrik, yaitu flagella yang menyelubungi seluruh tubuh bakteri



Gambar 4. Jenis-jenis Flagella ( sumber.<http://biobakteri.file.wordpress.com/2009/flagel3>).

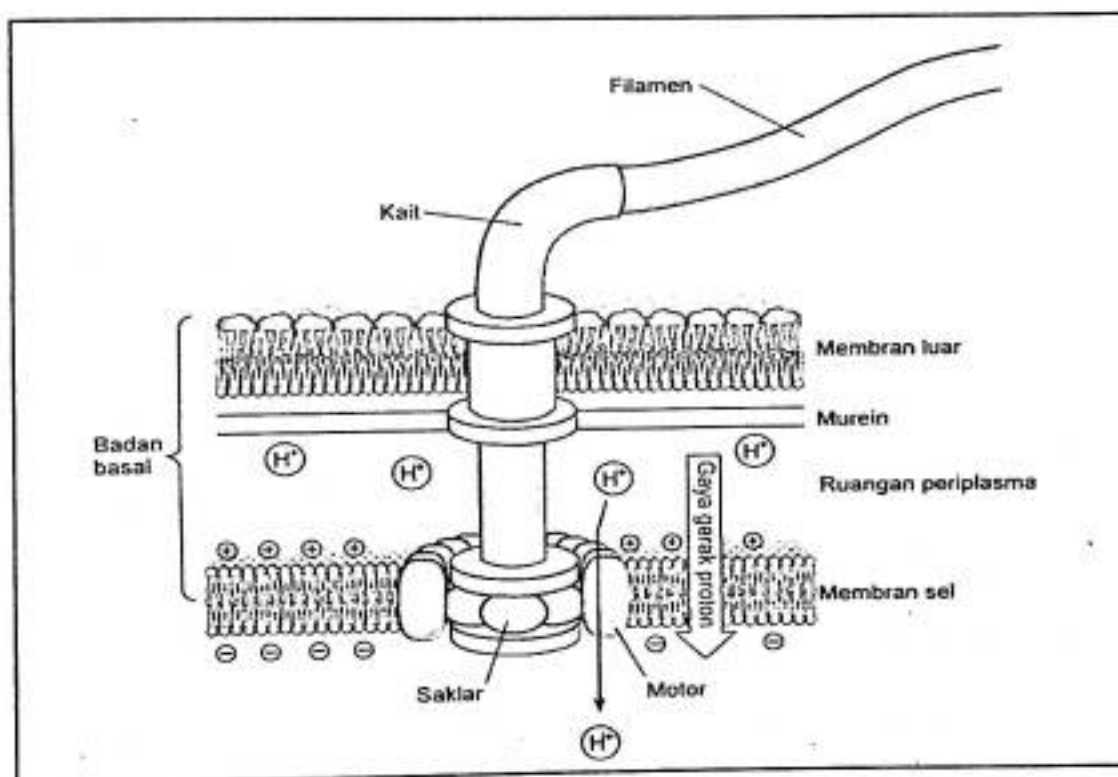
Flagellum merupakan rambut yang teramat tipis mencuat menembus dinding sel dan bermula dari tubuh dasar, suatu struktur granula tepat dibawah membrane sel di dalam sitoplasma, disebut flagellum.

Flagellum bakteri terdiri atas 3 bagian utama, yaitu :

1. The basal body (*dasar tubuh*), terdiri dari beberapa bentuk komponen cincin yang koaksial ( dengan sumbu yang sama ) pada bagian sentral

2. The hook (*kail*), merupakan struktur proteinaceous yang berbentuk lekukan .
3. The filament (*filament*) berbentuk heliks dengan ukuran 5-20 x 0,02  $\mu\text{m}$  dan terdiri dari sebelas protein fibril dan berbentuk seperti untaian tali.

Pada pusat daerah hipervariabel terdapat kira-kira 350 bp yang menyandi karakter dari antigen filament flagellar.<sup>(23,24)</sup>



Gambar 5. Bagian-bagian dari flagellum. Komponen struktural di dalam badan basal flagel memungkinkan bagian dalam struktur, yaitu bagian badan basal, dan kompleks perlekatan kait-filamen dapat berputar. Cincin luar tetap terhubung secara statis dengan membrane luar dan dalam serta dengan dinding sel (murein), melekatkan kompleks flagella ke selubung sel bakteri. (Sumber :Jawetz, Melnick JP Adeberg EA, 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*, Jakarta, Salemba medika)

Flagella bakteri adalah rotor heliks yang semi kaku yang digunakan sel untuk gerak memutar. Rotasi dipicu oleh aliran proton menuju sel yang mengikuti gradient yang dihasilkan oleh pompa proton utama. Bila tidak

ada sumber energi metabolik, pergerakan ini bisa dipicu oleh kekuatan daya proton yang dihasilkan oleh ionofor. Seluruh komponen motor flagella terletak pada selubung sel. Flagella melekat pada selubung sel yang tertutup secara terpisah, berotasi secara normal bila mediumnya mengandung cukup substrat untuk respirasi atau bila terbentuk gradien proton artificial. Saat bakteri peritrik berenang, flagella-flagellanya bergabung membentuk suatu berkas posterior yang menggerakkan sel ke depan searah garis lurus dengan cara berotasi berlawanan arah jarum jam. Dalam selang waktu tertentu, flagella akan berotasi berbalik arah dan akan terpisah-pisah untuk beberapa saat, menyebabkan sel tenggelam sampai sel melanjutkan berenang kembali kearah baru secara acak.

Adanya bahan kimia penarik (gula atau asam amino) dirasakan oleh reseptor spesifik yang terletak pada membrane sel. Beberapa senyawa lebih bersifat sebagai zat penolak dari pada zat penarik. Suatu mekanisme yang membuat sel berspon terhadap zat penarik dan zat penolak melibatkan proses metilasi dan demetilasi protein-protein tertentu pada membrane yang di perantarai oleh cGMP. Zat penarik sementara akan menghambat sementara proses demetilasi oleh protein-protein tersebut, sedangkan zat penolak justru akan menstimulasi proses demetilasinya.

Mekanisme yang menyebabkan perubahan perilaku sel sebagai respon terhadap perubahan lingkungannya disebut *tranduksi sensorik*. Tranduksi sensorik berperan tidak hanya dalam kemotaksis namun juga *aerotaksis* (pergerakan menuju daerah dengan konsentrasi oksigen yang optimal), *fototaksis* (pergerakan bakteri fotosintesis kearah cahaya), dan *taksis penerima electron* (pergerakan bakteri respiratorik menuju penerima

elektron alternatif, seperti nitrat dan fumarat). Dalam ketiga jenis respon ini, seperti pada kemotaksis, hasil akhir gerakan ditentukan oleh pengaturan respon menenggelamkan diri.

Berbeda dengan Pili atau fimbria terdapat banyak bakteri gram negatif mempunyai permukaan tubuh yang kaku yang disebut pili atau rambut atau fimbria. Organ ini lebih pendek dan lebih halus daripada flagella. Pili tersusun atas subunit protein yang disebut *pilin*. Protein minor yang terletak pada ujung pili, menyebabkan bakteri dapat melekat pada sel lain. Pili dibagi dalam dua kelas, pili biasa yang berperan dalam perlekatan bakteri simbiotik atau patogen ke sel pejamu, dan pili seksual yang berperan dalam perlekatan sel donor ke resipien pada proses konjugasi bakteri. Diameter pili biasanya 7 nm dan pili seksual sekitar 8.5 nm.<sup>(23)</sup>

## II.8. Antigen Flagella (Antigen H)

Antigen Flagella adalah suatu protein yang disebut flagellin dan sifatnya tidak tahan terhadap panas, fenol dan alkohol tetapi dapat bertahan dalam formalin. Huruf H berasal dari bahasa jerman *Hauch* yang berarti *film*. *Salmonella typhi* yang beredar sebagai penyebab penyakit pada manusia, adalah hanya satu gen falgella monophasik yaitu *fiC* yang menyandi gen H:d antigen.<sup>(39)</sup>

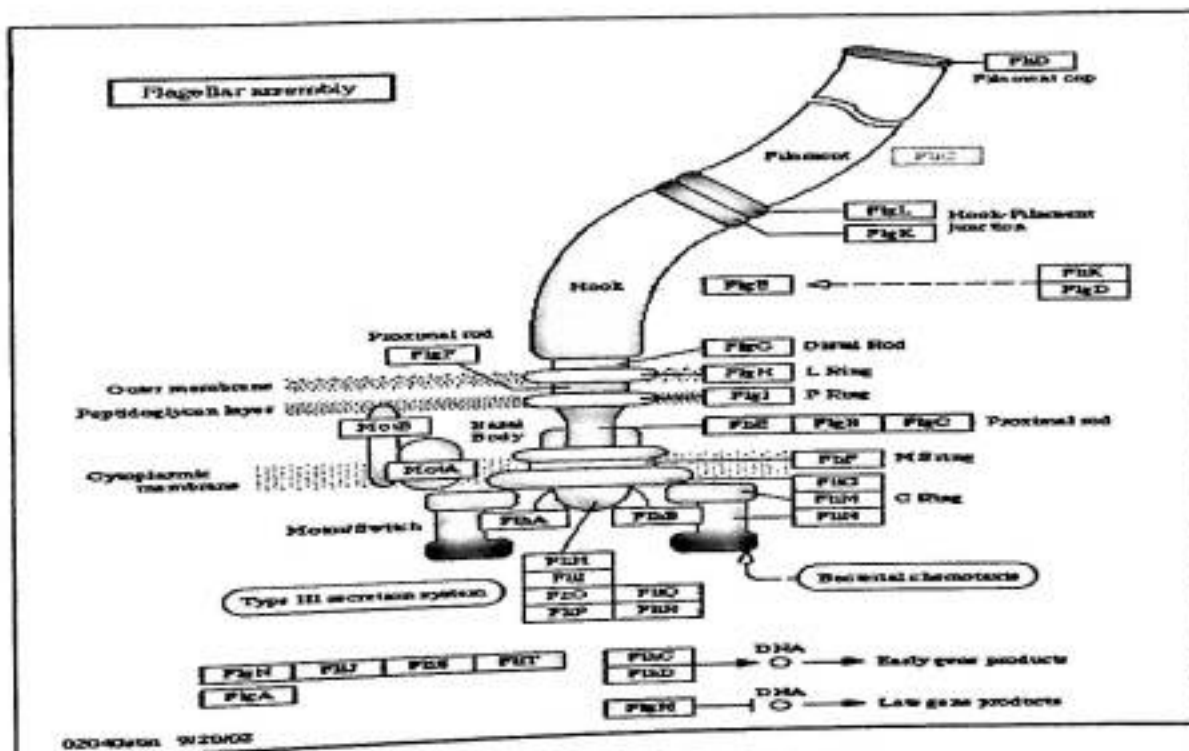
Terdapat dua macam fase antigen flagellar pada salmonella typhi , yaitu fase spesifik dan fase tidak spesifik. Antigen H rusak pada pemanasan diatas 60°C, alkohol dan asam.<sup>(19,37)</sup>



## II.9 Gen spesifik salmonella typhi.

### II.9.1 Gen Flagellar H1 (*Fli C*)

Pada *Salmonella typhi* terdapat alel fase-1 (H1) yang menentukan gen flagellin d. Gen flagellin H1-d mengandung rangkaian DNA pada sub bagian protein pada flagellum bakteri yang menyandi gen potensial daya invasive bakteri. Antigen flagella dari *Salmonella typhi* (H1-d). Secara umum antigen flagellar H1-d ditemukan pada hampir semua spesies *Salmonella* dan belum ada spesifikasi struktur antigen flagella yang jelas pada masing-masing spesies *Salmonella*. Dijelaskan bahwa terdapat keunikan rangkaian nucleotide pada gen flagellin dari *Salmonella thypi* dalam bagian hipervariabel dari gen.<sup>(41)</sup>



Gambar 6.. Letak FliC pada flagella bakteri yang berfungsi sebagai penggerak. (Sumber :Jawetz, Melnick JP Aderberg EA, 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*, Jakarta, Salemba medika).

## II.9.2 Gen Flagellar H1-j

Terdapat variasi phase dari antigen flagella yang dimiliki oleh *salmonella typhi* yaitu gen flagellin pada loci H, meliputi H1 dan H2 sekarang diganti, masing – masing FliC dan FliB (Lino,et al). Pada umumnya Fli C dan Fli B oleh hampir semua spesies *Salmonella typhi*. Beberapa gen flagellin ini disebabkan oleh inverse atau pembalikan dari urutan DNA yang mengandung promoter, dari sebuah operon spesifik gen fase-2, H2, dan sebuah gen reseptor Rh1 dinamakan FliA. Sedangkan H1, dalam suatu orientasi, operon tidak memiliki promoter, sehingga hanya satu dari dua gen flegellin yang dinyakan pada strain *Salmonella typhi*.<sup>(25)</sup>

Fungsi flagellar dapat berhubungan dengan motilitas flagella dan yang membawa bakteri kontak langsung dengan sel host (sel epitel). Jika fungsi motilitas serotype H1-j berkurang sebagai akibat perubahan fungsi flagellar, maka daya invasive dan tingkat penyakit klinis dapat juga berkurang. Penurunan motilitas isolasi H1-j merupakan suatu kontributor penting pada penurunan invasinya sementara H1-j hanya spesifik terisolasi di Indonesia dan menyebar hanya oleh kasus-kasus akut.<sup>(26,27)</sup>

## II.10 Mekanisme Infeksi *salmonella typhi* pada penderita demam tifoid

Patogenitas *Salmonellosis* diawali oleh ingesti bakteri *Salmonella* melalui makanan atau minuman terkontaminasi dan bakteri tersebut mengadakan penetrasi kedalam sel epithelium intestinal sebelum menginduksi penyakit. Invasi ke dalam sel intestinal hospes menghasilkan

perubahan morfologi pada sel yang berhubungan dengan eksploitasi dari sitoskeleton hospes. Setelah kontak dengan ephitelium, *Salmonella* akan menginduksi degenerasi makrovili eritrosit. Struktur mikrovilar akan berkurang diikuti oleh mengkerutnya membran bagain dalam di tempat kontak antara sel bakteri dan sel hospes. Mengkerutnya membran disertai dengan makropinositosis profus, sebagai jalan masuknya bakteri ke dalam sel hospes. Ketika proses masuknya bakteri sempurna, salmonella terletak dan bermultiplikasi di dalam endosom.

Sitoskeleton selanjutnya akan kembali pada distribusi yang normal. Seluruh proses terjadi hanya dalam beberapa menit. Prostaglandin yang disekresikan pada proses inflamasi menyebabkan dilepaskannya elektrolit dan menarik air kedalam lumen usus sehingga terjadi diare (adanya enterotoksin non inflamatori dalam usus besar). Dinding sel bakteri akan menghasilkan endotoksin yang tersusun dari lipopolisakarida (LPS). Diduga LPS ini merupakan penyebab timbulnya gejala demam pada penderita.<sup>(28)</sup>

## II.11 Gejala klinis

Pada manusia dapat terjadi demam enterik akibat infeksi *Salmonella typhi* sedangkan infeksi *Salmonella Spp* yang lain yang adaptasi utamanya pada manusia menimbulkan yang hampir serupa. Masa inkubasi berlangsung sekitar 7-28 hari atau kira-kira 14 hari. Penyakit diawali dengan kenaikan suhu tubuh disertai dengan rasa kurang enak badan dan sakit kepala. Demam dapat mencapai 40°C.<sup>(16)</sup>



Suhu tubuh pada sore hari dan malam hari akan lebih tinggi dibanding pagi hari. Denyut nadi terasa perlahan, terjadi pada saat ini terdapat bradikardi negatif. Hal ini berbeda dengan demam pada umumnya, dimana peningkatan suhu tubuh akan disertai dengan peningkatan denyut nadi. Buang air besar biasanya terganggu, lidah berwarna putih serta kotor, tepi lidah merah dan tampak gemetar serta timbul bintik-bintik di dada dan perut pada awal serangan penyakit selama kira-kira 5 hari pertama, kemudian tanda-tanda ini akan menghilang dan bisa menimbulkan infeksi pada kelenjar usus halus.<sup>(16)</sup>

## II.12 Mekanisme penularan *Salmonella typhi* pada manusia

Pada *Salmonella typhi* biasanya sumber penularan berasal dari individu dengan status karier *Salmonella* dan kurang menjaga kebersihan. Penularan dapat meluas dari individu satu ke individu yang lain terutama pada anak-anak prasekolah maupun dirumah-rumah tangga. Pada umumnya juga dapat terjadi di rumah sakit dan pusat-pusat kesehatan lainnya. Lebih lanjut bahwa infeksi tersebut menular dari satu pasien satu ke pasien lainnya atau dari perawat ke pasien melalui tangan, pakaian, handuk, wastafel atau tempat cuci tangan maupun debu.

Sumber infeksi yang terjadi pada *salmonella typhi* biasanya berhubungan dengan mengkonsumsi makanan dan minuman yang terkontaminasi *salmonella* atau kontak dengan feses manusia, unggas atau hewan lainnya yang terinfeksi. *Salmonella* dapat berada di dalam makanan

akibat adanya kontaminasi silang atau melalui tangan yang tidak dicuci bersih setelah kontak dengan bakteri tersebut.<sup>(29)</sup>

## II.13 Diagnosa Laboratorium

Diagnosa demam tifoid sukar untuk ditegakkan hanya atas dasar gejala klinis saja, sebab gambaran klinisnya bervariasi, umumnya tidak khas. Peranan laboratorium dalam membantu menegakkan diagnosis sangat penting.<sup>(28)</sup> Untuk membantu penegakkan diagnosis demam tifoid diperlukan pemeriksaan laboratorium. Bahan pemeriksaan dapat berupa darah, feses, urine, sumsum tulang belakang.<sup>(30)</sup> Sarana laboratorium dalam penegakkan diagnosis demam tifoid terdapat beberapa cara diantaranya adalah :

1. Imunoasai untuk melacak kenaikan titer antibody terhadap antigen *Salmonella typhi* dan menentukan adanya antigen spesifik dari *Salmonella typhi*.
2. Tes *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk melacak DNA spesifik dan *Salmonella typhi*<sup>(28)</sup>

### II.13.1 Imunoasai Uji Widal

Tes widal adalah metode tertua(1896) untuk melacak kenaikan titer antibodi terhadap *Salmonella typhi* dari agglutinin O dan H. Prinsip tes widal yaitu suspensi antigen widal yang berwarna dicampur dan diinkubasi dengan serum pasien. Antigen antibodi *salmonella typhi* yang berada dalam serum pasien bereaksi dengan suspense antigen widal berbentuk

aglutinasi. Tes tersebut dikatakan positif apabila terjadi aglutinasi antara antibodi yang terdapat dalam serum pasien dengan suspensi antigen widal, negatif jika tidak terjadi aglutinasi. Tes widal walaupun mempunyai banyak kelemahan, sampai saat ini masih banyak dipakai untuk menunjang diagnosis demam tifoid<sup>(28)</sup>.

### II.13.2 Teknik *Plymerase Chain Reaction* (PCR)

Reaksi berantai polymerase atau yang biasa disebut Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu metode enzimatik atau teknik biomolekuler untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu dengan cara *in vitro* dan dapat digunakan untuk memperkuat gen spesifik sebelum pengklonan lebih lanjut dalam sel. Teknik ini menggunakan molekul DNA dengan jumlah yang sangat kecil untuk diampifikasikan. Metode ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B.Mullis. Metode PCR sangat sensitive. Sensitifitasnya dapat digunakan untuk memisahkan gen-gen berkopi tunggal dari sekelompok sekuen genom. Dengan menggunakan metode PCR dapat diperoleh pelipat gandaan suatu fragmen DNA ( 110 bp,  $5 \times 10^{19}$  mol) sebesar 200.000 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit. Tiga langkah utama pada proses PCR yang senantiasa terulang 30 hingga 40 siklus dan berlangsung dalam waktu yang sangat singkat. Langkah – langkah tersebut adalah<sup>(31)</sup>:

### II.13.2.1 Denaturation ( *Pemisahan* )

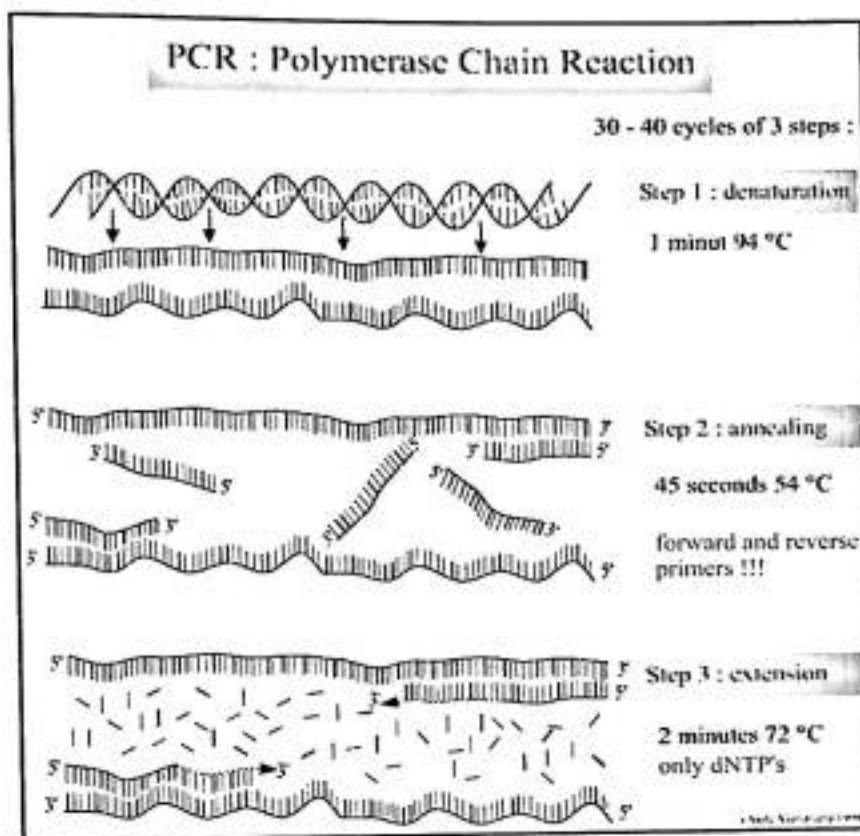
Reaksi pelipatgandaan suatu fragmen DNA di mulai dengan denaturasi DNA template ( cetakan ) sehingga rantai DNA yang semula beruntai ganda ( double stranded ) akan terpisah menjadi rantai tunggal ( single stranded ). Denaturasi DNA dilakukan dengan menggunakan pemanasan antara 90°C sampai 95°C selama 1-2 menit. Pemanasan ini yang memisahkan ikatan – ikatan hydrogen antara pasangan basa yang berdampingan. Biasanya DNA di denaturasi pada perpanjangan waktu untuk benar-benar memastikan apakah cetakan DNA dan primer telah terpisah menjadi untai tunggal.

### II.13.2.2 Annealing ( *Penempelan* )

Tahap ini, dua primer menempel pada masing-masing DNA template dengan rantai tunggal yang tadinya mengalami denaturasi. Masing-masing primer menempel pada ujung yang berlawanan dari rantai DNA template. Primer akan membentuk jembatan hydrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen primer. Pada tahap ini, suhu dari proses denaturasi diturunkan menjadi 37°C - 65°C dan biasanya membutuhkan waktu 1- 2 menit. Suhu 55°C yang digunakan untuk penempelan primer pada dasarnya merupakan kompromi. Jika suhu yang digunakan tidak sesuai, maka akan menyebabkan primer tidak menempel pada DNA cetakan atau kemungkinan lain akan menempel secara acak.

### II.13.2.3 Extension ( *Pemanjangan* )

Tahap ini meliputi pemanjangan dari primer. DNA polymerase mengkatalisis penambahan nukleotida pada primer sehingga diperoleh untai DNA spesifik yang baru. Pemanjangan ini berjalan dari ujung 3' ke 5' dan dari 5' ke 3' dan menggunakan suhu 72°C. Waktu yang dibutuhkan pada fase ini tergantung pada DNA polymerase dan panjang DNA yang akan diamplifikasi. Reaksi tersebut diulang dari 25 – 30 kali siklus sehingga pada akhir siklus akan diperoleh molekul – molekul DNA rantai ganda yang baru merupakan hasil polymerase dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target dalam campuran.



Gambar 7. Tahapan Siklus Amplifikasi DNA Secara Umum (Anonim). *Principle of PCR*. 2009. [dikutip 24 Maret 2006]. Available from : <http://www.users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.

Produk PCR dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Metode ini terdiri atas penginjeksian DNA ke dalam gel Agarosa dan menyatukan gel tersebut dengan listrik. Hasilnya untai DNA kecil pindah dengan cepat dan untai yang besar diantara gel menunjukkan hasil positif.

Teknik PCR merupakan uji yang paling spesifik dan sensitif dalam membantu menegakkan diagnose demam tifoid, dimana tidak memerlukan waktu yang lama untuk mendapatkan hasil. Namun teknik PCR ini mempunyai kendala yaitu membutuhkan laboratorium khusus, tenaga yang trampil dan biayanya yang relatif mahal<sup>(32)</sup>.

Pada metode PCR terdapat beberapa komponen utama, yaitu :





- a. DNA cetakan
- b. Oligonukleotida primer
- c. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP.
- d. Enzim DNA polymerase
- e. Komponen pendukung lain adalah buffer.

Teknik PCR dapat dimodifikasi ke dalam beberapa jenis, yaitu :

- a. Multiplex-PCR : metode ini digunakan untuk amplifikasi sekuen DNA target dengan menggunakan multiple primer ( lebih dari satu primer). Multiple set primer pada metode PCR, mengamplifikasi sekaligus multiple gen target dalam satu kali running amplifikasi.
- b. Nested-PCR : proses ini memungkinkan untuk mengurangi kontaminasi pada produk selama amplifikasi dari penyatuan primer yang tidak diperlukan. Dua set primer digunakan untuk mendukung metode tersebut, set kedua mengamplifikasi target kedua selama proses pertama berlangsung.
- c. Reverse transkriptase (RT-PCR) : Metode ini digunakan untuk mengamplifikasi, isolasi atau identifikasi sekuen dari sel atau jaringan RNA. Metode ini didukung oleh Reverse transcriptase (mengubah RNA menjadi cDNA), dan mencakup pemetaan, menggambarkan kapan dan dimana gen diekspresikan.
- d. Inverse-PCR : metode ini digunakan jika satu sekuen internal yang diketahui.

- e. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) : metode ini digunakan untuk membedakan organism berdasarkan analisis model derifat dari perbedaan DNA.
- f. Quantitative-PCR : digunakan untuk pengukuran berulang dari hasil produk PCR. Metode ini secara ini tidak langsung digunakan untuk mengukur kuantitas dan dimulai dari jumlah DNA atau RNA. Hasil dari metode ini juga dapat menampilkan copy dari sampel.

#### II.13.2.4. Elektroforesis

Elektroforesis gel merupakan salah satu teknik utama dalam biologi molekular. Prinsip dasar teknik ini adalah bahwa DNA, RNA, atau protein dapat dipisahkan oleh medan listrik. Dalam hal ini, molekul-molekul tersebut dipisahkan berdasarkan laju perpindahannya oleh gaya gerak listrik di dalam matriks gel. Laju perpindahan tersebut bergantung pada ukuran molekul bersangkutan. Elektroforesis gel biasanya dilakukan untuk tujuan analisis, namun dapat pula digunakan sebagai teknik preparatif untuk memurnikan molekul sebelum digunakan dalam metode-metode lain seperti spektrometri massa, PCR, kloning, sekuensing DNA, atau immuno-blotting yang merupakan metode-metode karakterisasi lebih lanjut<sup>(36)</sup>.

Polyacrylamid gel (tanpa denaturasi) dapat digunakan untuk memisahkan fragmen DNA (untai ganda) mulai dari 6 bp (20% acrylamid) sampai 1000 bp (3% acrylamid), sedangkan penggunaan agarose gel mempunyai kemampuan pemisahan dengan range yang lebih luas, yaitu

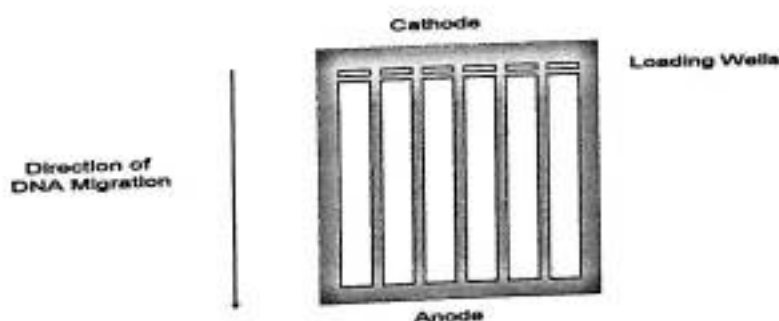


fragmen DNA antara 70 bp (3% agarose) dan 800.000 bp (0,1% agarose). Elektroforesis dengan agarose gel termasuk teknik yang sederhana, mudah penanganannya, cepat dikerjakan, murah dan memerlukan sampel yang relatif sedikit (1 ng DNA). Keuntungan lain penggunaan agarose gel, yaitu lokasi DNA (DNA fragmen) dalam gel bisa diamati langsung secara 'in situ' dengan menggunakan ethidium bromida, baik dengan mencampur langsung dalam gel buffer ataupun setelah elektroforesis berakhir. Pemakaian ethidium bromide dengan melarutkan langsung dalam buffer dapat mempengaruhi mobilitas DNA dalam gel. Warna ini berinteraksi dengan basa molekul DNA dengan memberikan warna orange fluorescence di bawah lampu ultra violet (UV). Di samping faktor-faktor yang telah disebutkan di atas kecepatan migrasi DNA dalam agarose gel ditentukan pula oleh konsentrasi agar, komposisi basa DNA dan temperatur<sup>(35)</sup>.

Dalam proses elektroforesis, sampel molekul ditempatkan ke dalam sumur (well) pada gel yang ditempatkan di dalam larutan penyangga, dan listrik dialirkan kepadanya. Molekul-molekul sampel tersebut akan bergerak di dalam matriks gel ke arah salah satu kutub listrik sesuai dengan muatannya. Dalam hal asam nukleat, arah pergerakan adalah menuju elektroda positif, disebabkan oleh muatan negatif alami pada rangka gula-fosfat yang dimilikinya. Untuk menjaga agar laju perpindahan asam nukleat benar-benar hanya berdasarkan ukuran (yaitu panjangnya), zat seperti natrium hidroksida atau formamida digunakan untuk menjaga

agar asam nukleat berbentuk lurus. Sementara itu, protein didenaturasi dengan deterjen (misalnya natrium dodesil sulfat, SDS) untuk membuat protein tersebut berbentuk lurus dan bermuatan negatif. Pita-pita (band) pada lajur-lajur (lane) yang berbeda pada gel akan tampak setelah proses pewarnaan, satu lajur merupakan arah pergerakan sampel dari "sumur" gel. Pita-pita yang berjarak sama dari sumur gel pada akhir elektroforesis mengandung molekul-molekul yang bergerak di dalam gel selama elektroforesis dengan kecepatan yang sama, yang biasanya berarti bahwa molekul-molekul tersebut berukuran sama. "Marka" atau penanda (marker) yang merupakan campuran molekul dengan ukuran berbeda-beda dapat digunakan untuk menentukan ukuran molekul dalam pita sampel dengan mengelektroforesis marka tersebut pada lajur di gel yang paralel dengan sampel. Pita-pita pada lajur marka tersebut dapat dibandingkan dengan pita sampel untuk menentukan ukurannya. Jarak pita dari sumur gel berbanding terbalik terhadap logaritma ukuran molekul.

(34)



*Gambar.8 Proses Elektroforesis pada media agarose gel  
Nikmawati A. Perbandingan Tes Immunoserologi, Tes Kultur dan  
Polymerase Chain eaction Pada Penderita Suspek Demam  
tifoid. Tesis. Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. 2007.*

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **III.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah eksperimen Laboratorium untuk mengetahui adanya hubungan antara flagella dengan gen flagellin pada penderita demam tifoid menggunakan teknik *Polymerase Chain Reactif (PCR)*.

#### **III.2 Waktu dan Tempat penelitian**

1. Penelitian dilaksanakan pada bulan mei sampai bulan agustus 2009.
2. RSUD Jayapura, RSAL Jayapura, Balai Laboratorium Kesehatan Jayapura untuk pengumpulan sampel.
3. Laboratorium Imunologi dan Biologi Molekuler Bagian Biologi Molekuler dan imunologi fakultas kedokteran universitas hasanuddin Makassar.

#### **III.3 Populasi dan Sampel Penelitian**

##### **III.3.1 Populasi Penelitian**

Populasi sampel adalah pasien suspek demam tifoid yang berkunjung di instalasi gawat darurat atau poliklinik RSUD Jayapura, RSAL Jayapura atau pasien yang berkunjung di Balai Labkes Jayapura dengan rujukan dokter untuk permintaan pemeriksaan laboratorium.

### III.3.2 Sampel penelitian

Sampel adalah semua populasi terjangkau yang memenuhi kriteria penelitian yaitu penderita suspek demam tifoid dan belum mendapat terapi antibiotik, di mana teknik pengambilan sampel menggunakan *Accidental Sampling* yaitu sampel diambil dari penderita tersebut selama peneliti melakukan penelitian ini.

### III.3.3 Besar sampel

Besar sampel yang diteliti dalam penelitian ini adalah sebanyak 67 sampel darah.

### III.3.4 Kriteria sampel Penelitian

- a. Telah menjalani pemeriksaan fisik dan dinyatakan sebagai suspek demam tifoid.
- b. Penderita tidak mengonsumsi antibiotik

### III.4 Kerangka Penelitian

Berdasarkan kerangka pemikiran teoritis maka timbulah kerangka konsep sebagai berikut : individu yang terinfeksi *Salmonella typhi*, di dalam tubuh kuman tersebut akan bereplikasi dan timbul gejala-gejala klinis demam tifoid, yang dapat diketahui melalui deteksi antibodi bila tes antibodi positif. Selanjutnya akan dilakukan deteksi gen flagelin dalam flagella dengan teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)*.

### III.5 Definisi Operasional

1. Suspek demam tifoid adalah penderita tersangka demam tifoid yang merupakan gejala klinis, terdiri dari demam (38-40°C) 5-14 hari berturut-turut, sakit kepala, lidah putih dan kotor, lesu, mual, muntah, dll.
2. Tes Laboratorium adalah tes yang dilakukan secara *in vitro* untuk menentukan diagnosis penyakit infeksi.
3. Deteksi antibodi adalah pemeriksaan laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui adanya antibodi (kekebalan yang terbentuk dalam tubuh manusia dan hewan sebagai respon dan bereaksi spesifik terhadap antigen yang masuk).
4. Tes serologi adalah prosedur laboratorium yang mengukur aktivitas imun.(reaksi antigen dan antibodi)
5. *PCR (Polymerase Chain Reaction)* adalah satu teknik untuk menganalisis genom sel dengan menggunakan enzim katalisator sehingga segmen untaian ganda DNA yang jumlahnya sedikit dapat diperbesar secara linier.
6. Ekstraksi DNA adalah suatu proses ekstraksi dari ribuan sel sehingga dapat terlihat banyak dengan melalui tahapan pemecahan sel, keluarnya sel dan pengendapan/ presipitasi.
7. Amplifikasi DNA adalah membuat beberapa salinan identik(replicates), yang dapat dilakukan dengan berbagai cara salah satunya adalah kloning sel.

8. Elektroforesis adalah proses Bergeraknya molekul pada suatu medan listrik, kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, banyaknya dan ukuran.
9. Gen flagellin adalah gen yang bertanggung jawab terhadap aktifitas flagella yang dibentuk oleh subunit-subunit protein dan bukan sebagai pewaris sifat keturunan.

### III.6 Prosedur Kerja

#### III.6.1 Alat dan Bahan Penelitian

##### III.6.1.1 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *micro pipet* (*single channel* 5-25  $\mu$ l, 25-50  $\mu$ l, 50-100  $\mu$ l; *multi channel* 25-50  $\mu$ l, 50-150  $\mu$ l) (Bio-Rad), *micro shaker*, autoklaf, incubator, (Mettler), tabung *ependorf*, *vortex shaker*, rak tabung *ependorf*, sentrifuge, neraca analitik, gelas ukur, botol reagen, , *refrigerator*, *freezer*, *water bath*, *ataudry block heater*, *biohazard (safety cabinet)*, *thermocycler*, elektroforesis, perangkat ultraviolet (UV), dan kamera digital.

##### III.6.1.2 Bahan penelitian

Larutan hipoklorit 2%, HCl, *high purity analytical grade celite* (diatoms) (Jansen chimica, Beerse, Belgium 10. 846.79), *pure distilled water* , GuSCN (*Guanidiumthiocyanate*) (FlukaChemie AG, Buchs, Switzerland, catalog No. 50990), TrisHCl, EDTA, NaOH, Triton X-100 (Roche, 789704),



etanol 70%, aceton,  $MgCl_2$ , Gelatin, dNTP, Taq DNA polymerase, agarose, aquadeststeril, etidium bromide, *loading buffer*.

primer ST1 (5\_-ACT GCT AAA ACC ACT ACT-3\_), primer ST2 (5\_-ACT GCT AAA ACC ACT-3\_), primer ST3 (5\_-AGA TGG TAC TGG CGT TGC TC-3\_), primer ST4 (5\_-TGG AGA CTT CGG TCG CGT AG-3\_), Taq DNA polymerase.

### III.7 Uji Widal

Uji widal yang digunakan dengan menggunakan metode slide dan menggunakan antigen import.

Dibuat seri slide O dan H pada platet. Pipet serum pada seri slide O dan H secara berturut – turut : 80  $\mu$ l, 40  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 5  $\mu$ l. Sebagai kontrol positif dan negatif adalah slide ke 6 dan 7, sehingga di dapatkan titer : 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320. Masing – masing slide ditambahkan dengan satu tetes antigen O dan pada slide H satu tetes antigen H termasuk kontrol positif dan negatif. Campur serum dan antigen dengan menggunakan stik bersih pada masing – masing slide, selanjutnya mikoplate dishaker selama 2 menit . Amati langsung dengan kasat mata adanya reaksi aglutinasi pada masing – masing slide, dengan syarat kontrol positif terjadi aglutinasi dan kontrol negatif tidak terjadi aglutinasi.

### III.8 Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

#### III.8.1 Ekstraksi DNA *Salmonella typhi* dengan metode Boom (39).

Sebanyak 100  $\mu$ l sampel darah dicampur dengan 900  $\mu$ l buffer lisis L6 (50 M Tris-HCl, 5,25 M GuSCN, 20 M EDTA, 0,2% Triton X-100) divortex lalu disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 15 detik, selanjutnya 40  $\mu$ l suspensi diatom (*celite suspensi*) ditambahkan. Campuran tersebut di homogenkan kemudian di *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 10 menit.

Diatom yang telah mengandung DNA terikat kemudian diendapkan melalui sentrifugasi pada 12.000xg selama 15 detik. Supernatan dibuang dan endapan (*pellet*) diatom dicuci sebanyak dua kali dengan menggunakan 1 ml buffer pencuci L2 (*washing buffer*) yang terdiri dari campuran 5,25 M GuSCN dalam 0,1 M Tris-HCl, pH 6,4. Setelah itu dilanjutkan dengan pencucian dengan 1 ml etanol 70% sebanyak dua kali dan terakhir 1 kali. Setelah itu, dikeringkan dengan cara diinkubasikan dalam oven dengan suhu 56<sup>0</sup>C selama 10 menit. Pellet yang sudah dikeringkan tersebut kemudian dicampurkan dengan 80  $\mu$ l aquadest steril dan diinkubasikan pada suhu 56<sup>0</sup>C selama 10 menit. Selanjutnya, diatom diendapkan melalui sentrifugasi pada 12000xg selama 30 detik, kemudian supernatannya diambil. Pada akhir dari prosedur metode Boom akan didapatkan sejumlah 40-50  $\mu$ l DNA yang tersuspensi dalam aquadest steril. Hasil ekstraksi dapat disimpan pada suhu 20<sup>0</sup>C atau suhu -80<sup>0</sup>C.

### III.8.2 Deteksi DNA *Salmonella typhi* (Gen *Flagellin*) dengan *Nested* PCR

Setelah diperoleh DNA hasil ekstraksi, disiapkan campuran reaksi PCR sebanyak 55X dan setiap campuran reaksi 1X terdiri dari : 28,5 µl dH<sub>2</sub>O, 5 µl buffer PCR 10X, 2 µl dNTPs, Primer ST1 dan ST2 masing-masing 1 µl dan 0,5 µl TaqPolimerase. Campuran reaksi ini dimasukkan kedalam tabung 0,5 ml dan ditambahkan 2 µl ekstrak DNA hasil ekstraksi.

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR sebanyak 29 siklus. Denaturasi awal dilakukan selama 3 menit pada suhu 94<sup>0</sup>C kemudian setiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 94<sup>0</sup>C selama 15 detik, annealing pada suhu 57<sup>0</sup>C selama 1 menit 15 detik dan polimerisasi pada suhu 72<sup>0</sup>C selama 3 menit. Pada terminasi atau elongasi akhir dan pendinginan pada suhu 16<sup>0</sup>C.

Sebanyak 5 µl produk amplifikasi pertama kemudian ditambahkan dengan campuran reaksi PCR kedua. Campuran reaksi kedua ini hampir sama dengan campuran reaksi PCR pertama, hanya saja primer untuk amplifikasi kedua ini adalah ST3 dan ST4.

Amplifikasi kedua dilakukan dengan menggunakan mesin PCR sebanyak 29 siklus. Denaturasi awal dilakukan selama 3 menit pada suhu 94<sup>0</sup>C kemudian setiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 94<sup>0</sup>C selama 1 menit, annealing pada suhu 68<sup>0</sup>C selama 1 menit 15 detik dan polimerisasi pada suhu 72<sup>0</sup>C selama 3 menit. Pada terminasi atau elongasi akhir dan pendinginan pada suhu 16<sup>0</sup>C

### III.8.3 Elektroforesis Gel

Pada proses elektroforesis, larutan gel agarosa 2% yang telah ditambahkan etidium bromide diletakkan dalam cetakan mesin elektroforesis dan kemudian dibiarkan hingga memadat. Selanjutnya gel agarosa tersebut ditambahkan dengan *Tris Boric Etidium Bromida* (TBE). Kemudian sebanyak 5  $\mu$ l DNA hasil amplifikasi PCR dan 2  $\mu$ l *loading buffer* dicampur dan dimasukkan kedalam sumur-sumur pada gel agarose 2% dan selanjutnya proses elektroforesis dijalankan selama 1 jam dengan tegangan konstan 100 volt. Setelah proses elektroforesis selesai, gel elektroforesis diangkat dan kemudian dimasukkan kemesin *gel doc* untuk di foto.

Pada *nested* PCR, hasil dikatakan positif ada *Salmonella typhi* jika terdapat pita DNA dengan fragmen 343 pasangan basa.

### III.9 Analisis Data

Pengolahan data menggunakan program *SPSS (Statistic Program for Social Science) for Windows versi 16*

### III.10 Pembahasan Hasil

Pembahasan berdasarkan dari hasil analisis data yang diperoleh.

### III.11 Kesimpulan

Kesimpulan didapatkan berdasarkan hasil pengolahan data

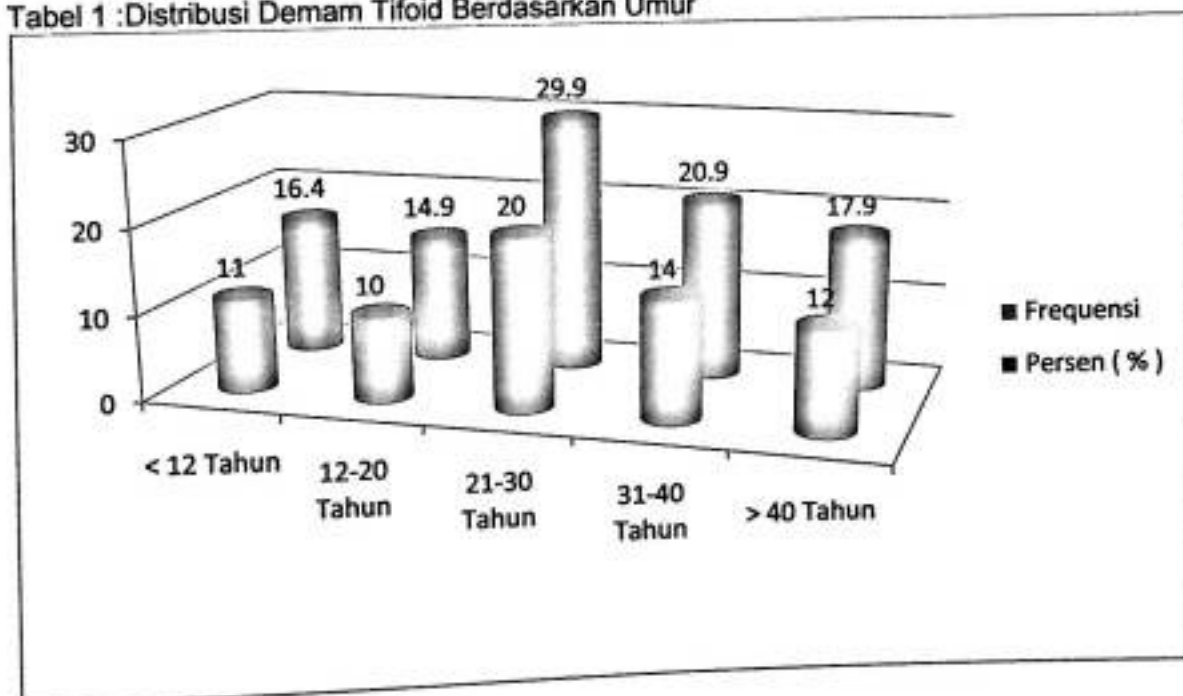
## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

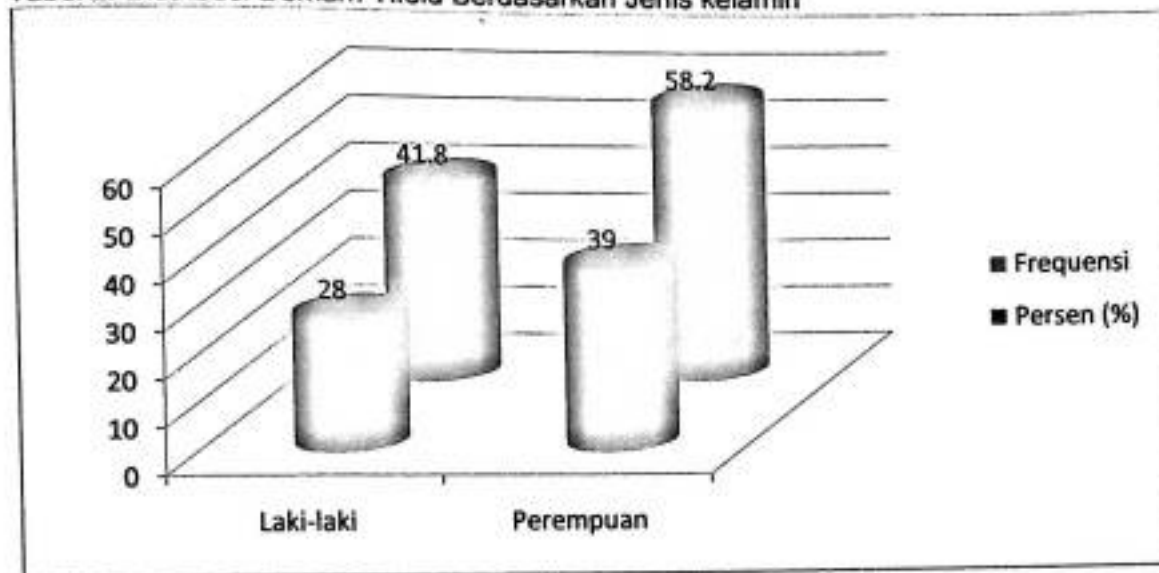
#### IV.1 Hasil Penelitian

Pada penelitian ini telah dikumpulkan 67 sampel penderita suspek demam tifoid dari beberapa rumah sakit umum dan laboratorium kesehatan daerah yang terdapat di kota jayapura. Terhadap sampel tersebut telah dilakukan pemeriksaan widal sesuai dengan rujukan dari klinis masing- masing rumah sakit dan mendeteksi adanya gen flagellin digunakan teknik PCR.

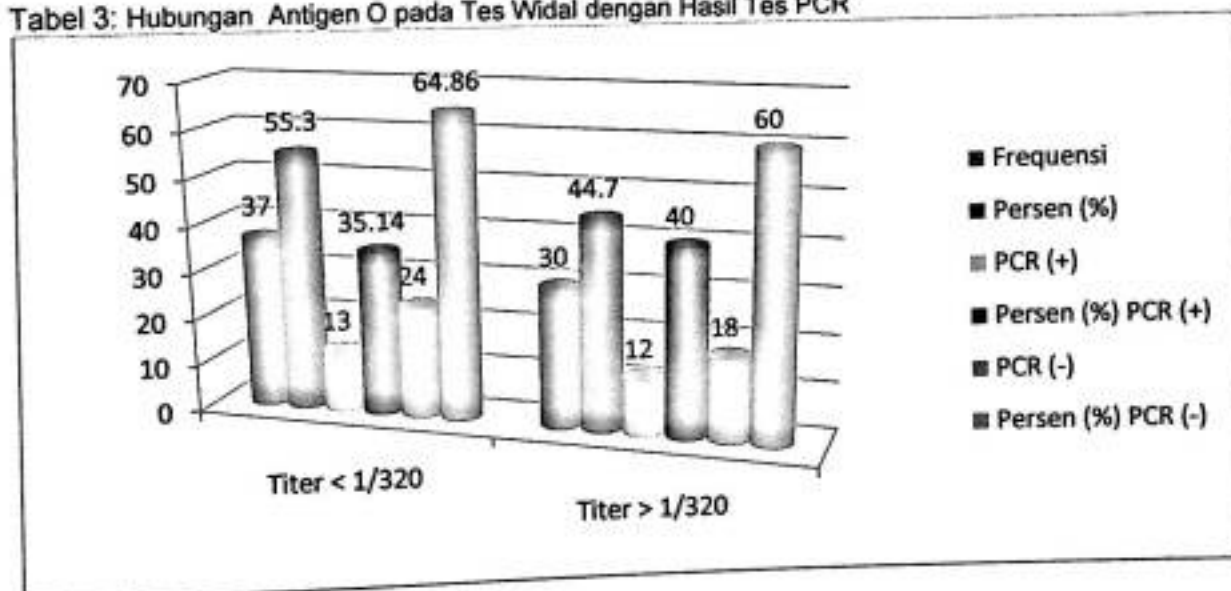
Tabel 1 :Distribusi Demam Tifoid Berdasarkan Umur



Tabel 2: Distribusi Demam Tifoid Berdasarkan Jenis kelamin

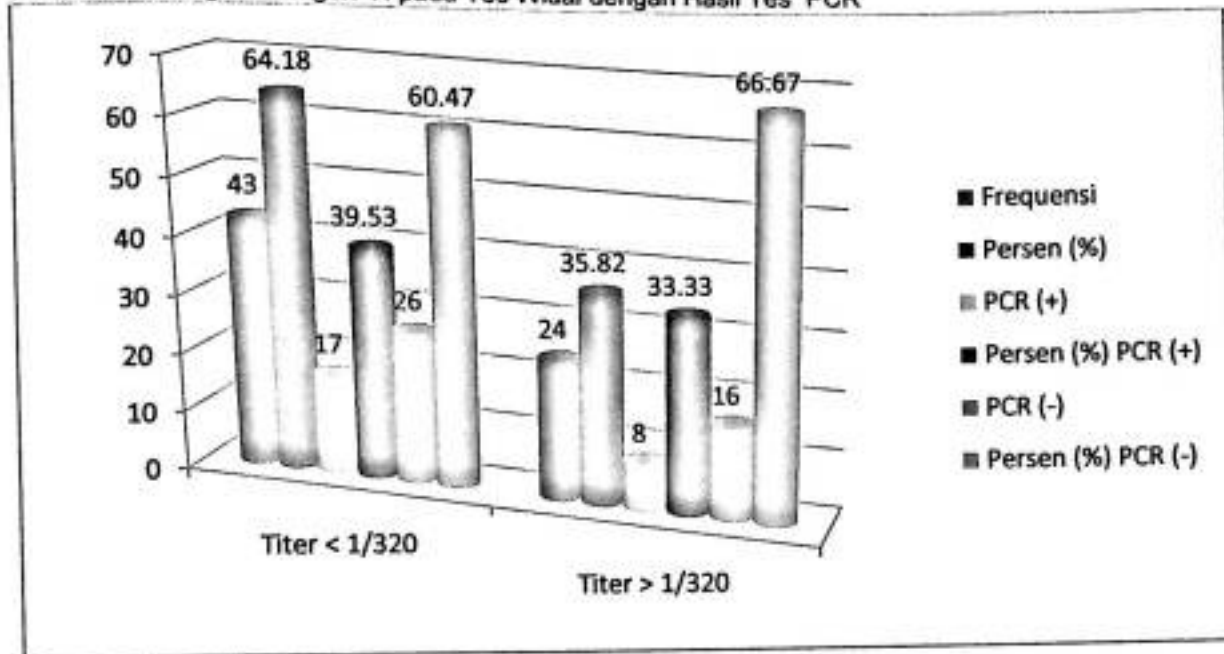


Tabel 3: Hubungan Antigen O pada Tes Widal dengan Hasil Tes PCR





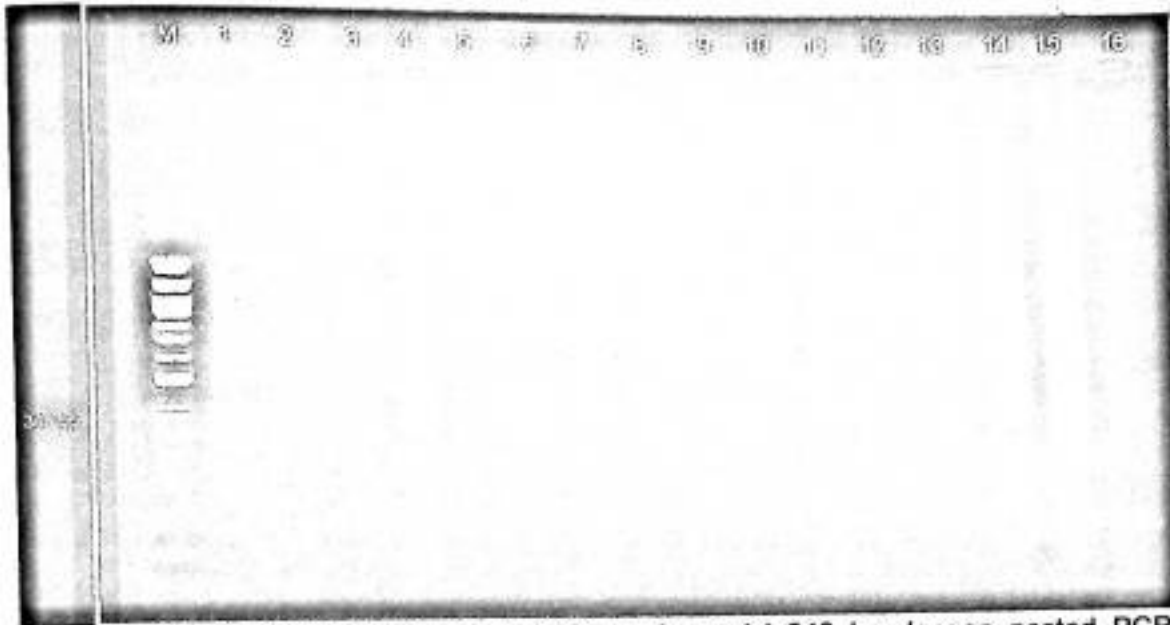
Tabel 4: Hubungan Antigen H pada Tes Widal dengan Hasil Tes PCR



#### IV.1.1. Uji Elektroforesis dari produk PCR dengan *Nested PCR*

Penelitian ini menggunakan Elektroforesis dari produksi PCR dengan *Nested PCR* sebagai standar baku (*Gold standard*), adapun tes flagella menggunakan tes widal.

Telah dilakukan penelitian uji *Nested PCR* pada 67 sampel penderita suspek demam tifoid. Hasil elektroforesis *Salmonella typhi* ditandai dengan adanya band pita 343 bp (lihat Gambar 4). Hasil terhadap 67 sampel darah memperlihatkan 25 positif (37,3%), dan 42 negatif (62,7%).



Gambar 4. Hasil elektroforesis tampak pita pada posisi 343 bp dengan nested PCR. M=Marker; No.1 – 16 = sampel Suspek demam tifoid; No.4, 7, 11, 14, 15, 26, =sampel positif ; No.1,2,3,5,6dll (tidak tampak pita pada posisi 343 bp) = sampel negatif

#### IV.1.2. Uji Widal

Dalam penelitian ini tes widal digunakan sebagai tes skrining. Hasil tes widal dinyatakan positif, jika titer  $\geq 1/320$  dan negative jika titer  $< 1/320$  yaitu berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Guli MJ 2003 terhadap suspek demam tifoid pada daerah dengan angka prevalensi di atas angka nasional.

Hasil pengujian tes widal terhadap 67 sampel suspek demam tifoid dapat ditunjukkan dengan kenaikan titer antigen. Antigen O positif sebanyak 30 sampel (44,8%), pada antigen H positif 24 sampel (35,8%). Apabila hasil tes titer antigen O dan H di uji dengan dengan hasil tes PCR, maka diperoleh hasil tes PCR sebanyak 25 positif, 17 sampel (68,0%) antigen O dan antigen H sebanyak 8 sampel (32,0%).

## IV.2. Pembahasan

Penelitian ini menggunakan 67 sampel penderita suspek demam tifoid yang hasil tes widalnya positif. Dari 67 sampel di tes dengan PCR ditunjukkan dengan adanya pita DNA yang jelas (seperti pada Gambar 4)

Tabel 5. Hasil Uji Titer Antigen O terhadap PCR

Antigen O	PCR		Total
	Negatif(%)	Positif(%)	
TITER < 1/320	24 64.90	13 35.10	33 100.00
TITER >= 1/320	18 60.0	12 40.0	30 100.00
Total	42 62.70	25 37.30	67 100.00

Untuk mengetahui hubungan antara antigen O dengan PCR maka dilakukan analisis dengan uji *chi-square*. Berdasarkan uji *chi-square* di dapatkan nilai  $X^2$  hitung (0,168) dengan tingkat signifikan  $p = 0,682$ . Dari hasil tersebut diketahui bahwa  $X^2$  hitung (0.168) < dari  $X^2$  tabel (3,84) yang berarti  $H_0$  diterima ( $H_0$  : tidak ada hubungan antara antigen O dengan PCR). Tingkat signifikansi  $> 0,05$  ( $p=0,682$ ) berarti tidak ada hubungan yang bermakna antara antigen O dengan PCR. Berdasarkan uji korelasi didapatkan angka koefisien korelasi ( $r$ ) = 0,050 yang berarti hubungan tersebut diabaikan. Jadi dapat disimpulkan bahwa tidak ada hubungan antara antigen O dengan PCR.

Hal ini di sebabkan karena pengambilan sampel skrining tes widal diambil pada awal minggu pertama demam. Hal ini menyebabkan tidak adanya hubungan antara antigen O dengan PCR pada penelitian ini,

disebabkan karena antibodi terhadap antigen O muncul pada akhir minggu pertama sakit dan baru mencapai puncaknya pada minggu ketiga dan keempat. Peningkatan titer antigen O juga dapat disebabkan oleh antigen O kuman *Salmonella* yang lain, selain itu juga antigen O dan H pada *Salmonella typhi* juga bereaksi silang dengan antigen *Enterobacteriaceae*.<sup>(2)</sup> Antigen yang digunakan untuk mendiagnosis demam tifoid masih menggunakan antigen asing yang sensitifitas dan spesifitasnya lebih rendah dibandingkan dengan antigen strain Indonesia.<sup>(6)</sup>

Tabel 6. Hasil uji titer antigen H terhadap PCR

Antigen H	PCR		Total
	Negatif(%)	Positif(%)	
TITER < 1/320	26 60.50	17 39.50	43 100.00
TITER ≥ 1/320	16 66.70	8 33.30	24 100.00
Total	42 62.70	25 37.30	67 100.00

Untuk mengetahui hubungan antara Flagella dengan gen flagellin maka dilakukan analisis dengan uji *chi-square*. Berdasarkan uji *chi-square* didapatkan nilai  $X^2$  hitung (0,253) dengan tingkat signifikan  $p = 0,615$ . Dari hasil tersebut diketahui bahwa  $X^2$  hitung (0,253) < dari  $X^2$  tabel (3,84) yang berarti  $H_0$  diterima ( $H_0$  : tidak ada hubungan antara flagella dengan gen flagellin). Tingkat signifikansi  $> 0,05$  ( $p = 0,615$ ) berarti tidak ada hubungan yang bermakna antara flagella dengan gen flagellin. Berdasarkan uji korelasi didapatkan angka koefisien korelasi ( $r$ ) = -0.061 yang berarti

hubungan tersebut diabaikan. Jadi dapat disimpulkan bahwa pemeriksaan widal dengan antigen H (flagella) tidak sepenuhnya dapat digunakan untuk mendiagnosa demam tifoid. Interpretasi hasil tes widal untuk menunjang diagnosa harus dilakukan dengan hati-hati karena dapat dipengaruhi oleh banyak faktor, akibatnya hasil yang diperoleh adalah positif palsu atau negatif palsu. Uji widal dapat memberikan informasi yang tidak kuat oleh karena : (1) Uji ini merupakan tes imunologik dan seharusnya dikerjakan dalam keadaan yang baku (Schroeder, 1986), (2) *Salmonella typhi* mempunyai antigen O dan H yang sama dengan *salmonella typhi* jenis lain, maka kenaikan titer antibodi ini tidak spesifik untuk *salmonella typhi*<sup>(26)</sup>, (3) Untuk penentuan hasil positif mungkin didasarkan atas titer antibodi dalam populasi daerah endemis yang secara konstan terpapar dengan organisme tersebut dan mempunyai titer antibodi mungkin lebih tinggi dari pada daerah non endemis pada orang yang tidak sakit sekalipun, (4) tidak dihasilkannya antibodi terhadap *salmonella typhi* karena rendahnya stimulus yang dapat merangsang timbulnya antibodi, sehingga produksi antibodi terganggu (Rocckhill, et al, 1981).

Hal lain yang menyebabkan tes widal tidak sepenuhnya dapat digunakan adalah antibodi terhadap antigen flagella meningkat titernya setelah minggu pertama dan mencapai puncaknya pada minggu keempat sampai minggu keenam. Ditemukannya titer antibodi flagella yang tinggi tidak berarti ada infeksi yang akut. Perlu di perhatikan faktor-faktor yang mempengaruhi hasil tes widal, antara lain : stadium penyakit, vaksinasi,

pengobatan, status gizi, pengaruh pembentukan antibodi, faktor antigen, serta reagen yang digunakan.<sup>(2)</sup> Selain itu juga peningkatan titer agglutinin H pada satu kali pemeriksaan tidak memiliki arti diagnostik yang penting untuk demam tifoid.<sup>(6)</sup>

Namun demikian masih dapat membantu menegakkan diagnosis demam tifoid pada penderita dewasa pada daerah non endemik atau anak umur kurang dari 10 tahun dari daerah endemik. Sebab di kelompok penderita ini kemungkinan terkena *Salmonella typhi* dalam dosis subterinfeksi masih amat kecil. Pada orang dewasa atau anak kecil diatas 10 tahun yang bertempat tinggal di daerah endemik kemungkinan untuk menelan *Salmonella typhi* dalam dosis subterinfeksi lebih besar, sehingga uji widal dapat memberikan ambang batas titer rujukan yang berbeda – beda antar daerah endemik yang satu dengan yang lainnya.<sup>(2)</sup>



## BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

### V.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan diperoleh kesimpulan bahwa tidak terdapat hubungan nyata ( $r = -0,061$ ) antara adanya flagella dengan gen flagellin yang dites dengan menggunakan PCR pada penderita demam tifoid asal Jayapura.

### V.2. Saran

1. Tes widal walaupun sensitifitasnya rendah masih dapat digunakan oleh rumah sakit dan puskesmas untuk diagnosa demam tifoid, karena harganya relatif murah dan hasilnya juga cepat.
2. Diharapkan ada penelitian selanjutnya untuk meneliti variasi gen flagellin terhadap *Salmonella typhi* pada penderita demam tifoid dengan jumlah sampel yang lebih banyak.
3. Untuk penelitian selanjutnya diharapkan meneliti antigen flagella secara spesifik pada minggu ke 2 dan ke 3 dengan jumlah sampel yang lebih banyak.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Hardjoeno, H. Esa, T, Nurhayana. 2007. *Kumpulan penyakit infeksi dan tes sensitivitas kuman serta upaya pengendaliannya*. Makassar. Makassar. Lembaga Penerbit Universitas Hasanudin, Hal.281.
2. Problematik salmonellosis pada manusia <http://peternakan.litbang.deptan.go.id/publikasi/lokakarya/05>. diakses 10 maret 2009.
3. [http://www.litbang.depkes.go.id/laporan RKD/papua/laporan papua.pdf](http://www.litbang.depkes.go.id/laporan/RKD/papua/laporan_papua.pdf). diakses 3 april 2009
4. *Diagnosis Dini Demam tifoid dengan menggunakan Protein membra nluar S.typhi sebagai Antigen spesifik*. Diakses dari [http://www.kalbe.co.id/07 DiagnosisDiniDemamTifoid124.pdf](http://www.kalbe.co.id/07_DiagnosisDiniDemamTifoid124.pdf). diakses 15 maret 2009.
5. *Diagnosa demam tifoid pada anak* Diakses dari <http://idmgarut.wordpress.com/2009/01/29>. Diakses 2 april 2009.
6. Kemampuan Uji tabung widal menggunakan antigen import dan antigen local. Diakses April 2009. <http://www.journal.unair.ac.id/filerPDF/UCPML-12-1-07>
7. Jawetz, Melnick JP Adeberg EA, 1995. *Reviw of Medical Mikrobiologi 16<sup>th</sup> Ed California USA : Lange Medical Publication*
8. Halil F, Rusli B. Tes kultur dan identifikasi salmonella. Di dalam :Hardjoeno, Esa T, Nurhayana, Editor. *Kumpulan penyakit infeksi dan tes kultur sensitivity kuman sert aupaya pengendaliannya*. Ed.1.
9. Crishantoro T. *Tubextf amagnetic semi quantitative rapid immunoassay te for fever diagnostic 2<sup>nd</sup> ed*. Jakarta :PT.PacificBiotekindolIntralab, 2006.
10. Dedy's Reaksirantai polymerase. 18 juli 2007. Diakses 10 maret 2009. [www.271090.multiply.com](http://www.271090.multiply.com)

11. Easmon.C.2006.Typhoid and Paratyphoid Fever.6<sup>th</sup> Edition,  
[http://www.necdoctor.couk/travel\\_diasess/typhoid.htm](http://www.necdoctor.couk/travel_diasess/typhoid.htm). diakses 20 Juli 2009
12. Widodo D. 2004. *Bunga Rampai I Penyakit infeksi*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Divisi penyakit tropic dan infeksi Departemen Ilmu Penyakit Dalam. Hal. 1-5
13. Gupte,S.1990. *Mikrobiolog iDasar*. Binapura Aksara. Jakarta
14. Hatta.M., Abdoel.,Smits., and Henk,L.2002, *Antibody response in typhoid fever in endemic Indonesia and the relevance of serology and culture to diagnosis, Southeast, Asian Journal Tropical Medicine and Public Health* vol.33; 182-191
15. Mills.SD., Finlay BB.1998. *Virulence Factors of Salmonella typhi southeast asian*,J.Trop.Med.Public Health,26 (SUPPL 2) PP.102-106
16. Rasmilah.2001. *Thypus*,(online),(<http://library.usu.ac.id/download/fkm/fkm-asmilah.html>), diakses 20 juli 2009.
17. Kusumawati RT. 1996, *UjiElisa-Ty sebagai penunjang diagnose demam tifoid padaanak*, FK UNAIR, Lab/Instalasi Patologi Klinik, RSUD.DR.Soetomo Surabaya. Hal 27-28
18. Supardi I, Sukanto, 1999. *Mikrobiologi Dalam Pengelolaan Dan Keamanan Pangan*. Bandung.Penerbit Alumni 1999: Hal.158-159.
19. Endene, and V.Den, 2006 *Typhoid Fever*. [www.itg.be/Distansel Learning/LectureNotesVandenEndene/teksten/Sylabus/30 typhoid fefer.doc](http://www.itg.be/DistanselLearning/LectureNotesVandenEndene/teksten/Sylabus/30_typhoid_fefer.doc), diakses 20 juli 2009
20. Holt,J.G.N.R.Krieg,P.A.Sneath, J.T.Staley, S.T.William.1994. *Bergey's Manual of Determinatif Bacteriology, Ninth Edition*.William and Wilkins. United State.

21. Lakare C, 2004. *Mikrobiologi Kedokteran II (bagian special)*, Bagian Kedokteran, Makassar. Universitas Hasanuddin, hal, 9-12.
22. Kresno, B.S 1996, *Immunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium Edisi IV*, Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
23. Jaweltz, Melnick, & Adelberg, *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 23, Penerbit : EGC : Jakarta, 2007.
24. Newton, S.M.C, Jacob, C.O. and Stocker, B.A.D. 1989, *Science*, 244; 70-72
25. Silverman, M Dan Simon, M. 1974, *J. Bacteriol*, 120; 1196-1203.
26. Levine, M.M., O. Grados, R.H. Gilman, E Woodward, R. Solis-plaza, and Walman, W. 1987, *Diagnostic value of widal test in areas endemic for typhoid*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 795-800.
27. Kidgell, C., Derek, P., John W., Keith J., L.T. Diem Nga, To Song D., Myron M.L., and Peadar O'Gaora. 2002, *Characterisation and Distribution of a Cryptic Salmonella Typhi plasmid pHCM2*, *Academic Press Plasmid* 47. 159-171.
28. Handojo I, 2004. *Imunoasai terapan pada beberapa penyakit infeksi*, Surabaya, *Airlangga University Press*, hal. 1-23
29. Staf pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 1994 *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran edisi revisi*. Binarupa Aksara. Hal 172-173
30. Walford DN. 2000, *Salmonella food poisoning and Other gastrointestinal infection*. *Journ. Emerging Infections Disease*, vol. 5 number 2 pp. 191.

31. Yuwono, Triwibowo. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction* Panduan Eksperimen PCR untuk memecahkan Masalah Biologi Terkini, Penerbit Andi. Yogyakarta.
32. Hatta, M. 2006. *Clinical and Molecular Characterisation of Typhoid Fever in Endemic South Sulawesi ; Prevalence, Response to treatment and Epidemiology*, Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, hal. 1 – 7.
33. Anonim). *Genus Salmonella*. [dikutip 26 november 2009]. Available from : [www.vph.cap.org/file/THESIS/4634903Mr.Arsooth/chapter2.pdf](http://www.vph.cap.org/file/THESIS/4634903Mr.Arsooth/chapter2.pdf)
34. (Anonim). *Principle of PCR*. 2009. [dikutip 24 Maret 2006]. Available from : <http://www.users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.
35. Nikmawati A. Perbandingan Tes Immunoserologi, Tes Kultur dan Polymerase Chain eaction Pada Penderita Suspek Demam tifoid. Tesis. Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. 2007.
36. Wikipedia. Biologi Molekuler. 2009 (dikutip 26 februari 2009). Available from: <http://www.Wikipedia.com>
- 37 Handojo I. *Imunoasai Terapan Pada Beberapa Penyakit Infeksi*. Airlangga University Press. Jakarta. 2004. hal 1-8
37. Brook, G.F., Butel, J.S. & Morse. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi I. Salemba Medika. Jakarta. 2005. hal. 365
38. Hatta M, Smith HL. *Detection of Salmonella typhi by Nested Polymerase Chain Reaction In Blood, Urine and Stools Samples* American Society Of Tropical Medicine and Hygiene. 2007. 76 (1) halaman 139 – 143

39. Xixiang Huang, Le V.Phung, Surang Dejsirilert, 2004, *Cloning and Characterization of the gene Encoding the Z66 Antigen of salmonella enteric serovar typhi*, Departemen of Microbiologi and Bioinformatics, Japan.
40. Abyankar. Antigenic Struktur Of Salmonella. <http://www.geocities.Com/avinitas/antigen.htm> 1. diakses mei 2009.
41. Amran. P. Analisis Keberadaan Gen H1-j Salmonella enterica seroval typhi dengan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) dalam darah penderita Demam tifoid. Tesis. Fakultas kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. 2008.
42. Jenis – jenis Flegella  
<http://biobakteri.files.wordpress.com/2009/06/flagel3.jpg>. diakses 10 desember 2009.