

**ANALISIS GEN NRAMP-1 LOKUS D543N DAN HUBUNGANNYA
DENGAN TITER ANTIBODI PADA PENDERITA DEMAM TIFOID DI
SULAWESI SELATAN**

*AN ANALYSIS OF NRAMP-1 GENE LOCUS D543N AND ITS
RELATIONSHIP WITH ANTIBODY TITER IN TYPHOID FEVER PATIENT
IN SOUTH SULAWESI*

RAFIKA



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2009**

**ANALISIS GEN NRAMP-1 LOKUS D543N DAN HUBUNGANNYA
DENGAN TITER ANTIBODI PADA PENDERITA DEMAM TIFOID DI
SULAWESI SELATAN**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Biomedik Konsentrasi Mikrobiologi

Disusun dan diajukan oleh

RAFIKA

Kepada

PROGRAM PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2009

TESIS

ANALISIS GEN NRAMP -1 LOKUS D543N DAN HUBUNGANNYA
DENGAN TITER ANTIBODI PADA PENDERITA DEMAM TIFOID DI
SULAWESI SELATAN

Disusun dan diajukan oleh

RAFIKA

Nomor Pokok P1506207005

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis

Pada tanggal 25 Februari 2009

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasihat,

Prof.dr. Moch. Hatta, Sp.MK., Ph.D
Ketua

Ketua Program Studi
Biomedik

dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D
Anggota

Direktur Program Pascasarjana
Universitas Hasanuddin

Prof.dr. Rosdiana Natsir, Ph.D

Prof.Dr.dr.A. Razak Thaha, M.Sc.

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Rafika

Nomor mahasiswa : P1506207005

Program studi : Biomedik

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 25 Februari 2009

Yang menyatakan

Rafika

PRAKATA

Syukur Alhamdulillah, puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas limpahan rahmat, hidayah, karunia serta kemudahan kepada hamba-Nya sehingga atas izin dan pertolongan-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini.

Disadari banyak kendala yang dihadapi oleh penulis dalam rangka penyusunan hasil penelitian ini, berkat kerja sama, bimbingan serta bantuan baik moril maupun material dari berbagai pihak kepada penulis sehingga tesis ini selesai pada waktunya.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Bapak Prof.dr. Moch. Hatta, Sp.MK.,Ph.D selaku ketua komisi penasihat dan Bapak dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D selaku anggota penasehat yang telah banyak meluangkan waktunya memberi petunjuk dan motivasi dalam penulisan tesis ini.

Pada kesempatan ini pula, penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada:

1. Direktur Program Pascasarjana Unhas beserta seluruh staf yang telah membantu selama proses pendidikan.
2. Bapak penguji Prof.Dr. Ahyar Ahmad, Bapak Prof.Dr.dr. Asaad Maidin, M.Sc., SpMK., Dr.dr. Burhanuddin Bahar, M.Si. selaku anggota tim penguji.

3. Ibu Prof.dr. Rosdiana Natsir, Ph.D selaku Ketua Program Studi Biomedik dan Bapak Prof.dr. Moch. Hatta, Sp.MK.,Ph.D selaku Ketua Konsentrasi serta seluruh staf pada Program Studi Biomedik.
4. Kepala Laboratorium Biomolekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Unhas Bapak dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D beserta staf laboratotium.
5. Terkhusus penulis menyampaikan terima kasih banyak kepada keluarga tercinta Ayahanda H. Uddin Ramli, Ibunda Hj. Hajanang Rais, kakanda Yuli, Riski dan adinda Muh. Akbar atas kasih sayangnya, dorongan moril, do'a yang tulus dan segala pengertiannya selama ini kepada penulis.
6. Kepada seluruh teman seperjuangan mahasiswa Program Studi Biomedik angkatan 2007 khususnya mahasiswa Konsentrasi Mikrobiologi, sahabatku seluruh teman Biologi'02 serta semua pihak yang telah membantu dalam penulisan dan penelitian sampai selesainya tesis ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penelitian dan penulisan tesis ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun sangat diharapkan. Akhirnya dengan kesederhanaan penulis berharap tesis ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua.

Makassar, 29 Februari 2009

Rafika

ABSTRAK

RAFIKA. Analisis Gen NRAMP-1 Lokus D543N dan Hubungannya dengan Titer Antibodi pada Penderita Demam Tifoid di Sulawesi Selatan (dimbing oleh Mochammad Hatta dan Muh. Nasrum Massi).

Penelitian ini bertujuan untuk (1) mengetahui polimorfisme gen NRAMP-1 pada penderita demam tifoid dan orang normal, dan (2) mengetahui hubungan antara mutasi gen NRAMP-1 dengan titer antibodi pada penderita demam tifoid.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biomolekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Pengambilan sampel penderita demam tifoid dari beberapa rumah sakit dan puskesmas di Sulawesi Selatan, sedangkan sampel orang normal dari Dinas Transfusi Darah. Metode yang digunakan adalah kultur darah, dipstik dan RFLP-PCR.

Hasil dari kultur darah pada kelompok sampel penderita diperoleh 100% positif dan 100% negatif orang normal. Hasil Pengujian RFLP-PCR pada gen NRAMP-1 yang normal dideteksi ada dua potongan pita DNA pada kelompok sampel penderita dan orang normal, yang mana pita pertama berukuran 156 bp dan pita kedua ukurannya 88 bp. Sedangkan gen NRAMP-1 yang mutasi pada sampel penderita dideteksi hanya ada satu potongan pita DNA tunggal yang terbentuk dengan ukuran 244 bp. Untuk hubungan antara titer antibodi hasil dipstik dan gen NRAMP-1 hasil RFLP-PCR pada 25 sampel penderita yaitu pengujian dipstik diperoleh 100% positif dan pengujian RFLP-PCR didapatkan 76% sampel yang normal dan 24% yang mutasi. Sedangkan total hasil pengujian kelompok sampel orang normal dengan cara dipstik diperoleh 100% negatif dan RFLP-PCR menunjukkan 100% sampel normal.

ABSTRACT

RAFIKA. *An Analysis Of Nramp-1 Gene Locus D543n And Its Relationship With Antibody Titer In Typhoid Fever Patient In South Sulawesi* (supervised by Mochammad Hatta and Muh. Nasrum Massi)

The objectives of the study are to investigate the polymorphism of NRAMP-1 gene in patients with typhoid fever and in normal patients and describe the relationship between NRAMP-1 gene mutation and the antibody titer of the typhoid fever patients.

The study was carried out in the Biomolecular and Immunology Laboratory of Faculty of Medicine, Hasanuddin University, Makassar. The typhoid fever patient sample was derived from several hospitals and community health centre in South Sulawesi, while normal sample was taken from blood transfusion unit. The method used in the study was blood culture, dipstick and RFLP-PCR.

The blood culture of all typhoid fever patients indicates 100% positive and of the entire normal sample indicates 100% negative. The RFLP-PCR assay of normal NRAMP-1 gene indicates fragments of two single DNA bands in the patients and the normal sample. The first fragment of the DNA band is 156 bp and the second one is 88 bp. While in the mutating NRAMP-1 gene of the typhoid fever sample there is only one single DNA band with a size of 244 bp. As for the relationship between the dipstick result of antibody titer and the NRAMP-1 gene as the result of RFLP-PCR of 25 sample patients examined under dipstick assay, it was found that 100% positive. RFLP-PCR signifies that 76% is normal and 24% is mutation. Total assay result of normal patient sample with dipstick method reveals that 100% negative and NRAMP-1 gene of RFLP-PCR result indicates 100% normal.

DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
ABSTRAC	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar belakang	2
B. Rumusan masalah	7
C. Tujuan penelitian	8
D. Manfaat penelitian penyakit demam tifoid	8
II. TINJAUAN PUSTAKA	9
A. Tinjauan umum penyakit demam tifoid	9
B. Tinjauan umum bakteri <i>Salmonella typhi</i>	21
C. Sistem Imunitas	24
D. Respon Imun seluler	26
E. Antigen dan Antibodi	32
F. Struktur <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (DNA)	37
G. Gen NRAMP-1	42
H. Ekstraksi DNA	47
I. Polymerase Chain Reaction (PCR)	50
J. Metode RFLP-PCR	58

K. Elektroforesis gel agarosa	61
L. Kerangka Konsep	64
M. Hipotesis Penelitian	69
III. METODOLOGI	70
A. Jenis penelitian	70
B. Waktu dan lokasi penelitian	70
C. Alat dan bahan penelitian	70
D. Populasi dan sampel penelitian	72
E. Definisi operasional	73
F. Data penelitian	73
G. Analisis data	73
H. Kriteria sampel	74
I. Prosedur kerja	74
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	78
A. Hasil penelitian	78
B. Pembahasan	89
V. PENUTUP	97
A. Kesimpulan	97
B. Saran	97
DAFTAR PUSTAKA	98

DAFTAR TABEL

Nomor	halaman
1. Hasil Isolasi <i>S. typhi</i> pada medium SSA	80
2. Hasil uji biokimia dari <i>S. typhi</i>	81
3. Frekuensi kultur darah pada penderita demam tifoid berdasarkan lama demam	82
4. Hubungan antara kelompok penderita demam tifoid dan orang normal dari hasil darah dengan dipstik	82
5. Hasil RFLP-PCR pada kelompok sampel penderita demam tifoid	83
6. Hasil RFLP-PCR pada kelompok sampel orang normal	86
7. Hubungan antara kelompok penderita demam tifoid dan orang normal dengan hasil dipstik dan RFLP	88

DAFTAR GAMBAR

Nomor	halaman
1. Siklus infeksi <i>S. typhi</i> pada tubuh manusia	13
2. Bakteri <i>Salmonella typhi</i>	22
3. Proses fagositosis	30
4. Struktur basa nitrogen DNA	39
5. Model molekul DNA	40
6. DNA double helix	41
7. Proses Siklus PCR	55
8. Eksponensial amplifikasi DNA pada PCR	56
9. Proses genotyping RFLP	60
10. Diagram prinsip analisis DNA dengan metode elektroforesis	64
11. Kerangka konsep penelitian	68
12. Hasil elektroforesis produk RFLP-PCR pada kelompok sampel penderita demam tifoid	85
13. Hasil elektroforesis produk RFLP-PCR pada kelompok sampel orang normal	87

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	halaman
1. Skema kerja kultur darah	104
2. Alur kerja penelitian	105
3. Skema kerja ekstraksi DNA	106
4. Skema kerja tes dipstik	107
5. Skema kerja RFLP-PCR	108
6. Sequence nukleotida gen NRAMP -1, posisi primer dan letak pemotongan oleh enzim restriksi	109
7. Foto hasil kultur darah deteksi <i>S. typhi</i> pada medium SSA	110
8. Foto hasil uji biokimia	111
9. Foto hasil tes dipstik pada sampel penderita demam tifoid	112
10. Data dasar penderita demam tifoid	114
11. Data dasar orang normal	115

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Demam enterik atau demam tifoid merupakan penyakit infeksi akut dan bersifat endemis yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* yang termasuk bakteri gram negatif berbentuk basil dan bersifat patogen intraseluler obligat pada manusia yang menginfeksi makrofag dan sel Schwann. Dalam melawan bakteri patogen diperlukan peningkatan respon seluler dan humoral dalam tubuh (Kwenang, 2007).

Demam tifoid disebarkan melalui jalur *feco-oral* yang menginfeksi manusia yang mengkonsumsi makanan dan minuman yang terkontaminasi oleh feses yang terdapat bakteri *S. typhi* (Aspx, 2006). Orang yang terinfeksi ini akan menyebarkan sumber kuman *Salmonella* yang akan masuk ke dalam tubuh orang sehat. Secara langsung jika bakteri ini terdapat pada feses, urin atau muntahan penderita dapat menularkan kepada orang lain. Sedangkan secara tidak langsung (90%) melalui makanan atau minuman (Djauzi, 2005).

Penyakit ini mudah berpindah dari satu orang ke orang lain yang kurang menjaga kebersihan diri dan lingkungan misalnya orang yang tidak mencuci tangan setelah dari toilet dan bisa menyebar pada orang lain (De Witt, 2002).

Proses infeksi *S. typhi* ini pada manusia, jika *S. typhi* masuk bersama makanan atau minuman ke dalam tubuh manusia akan mencapai sistem pencernaan sehingga mencapai usus halus dan saluran sel M dan menyebabkan lesi dan bermultifikasi pada saluran plak peyer, kelenjar mesenterik dan limfa kemudian dibawa ke aliran darah. Selanjutnya terbawa oleh darah menuju berbagai organ dan diekskresi dalam tinja (Everest, 2001; Santoso, 2003; Jawetz, dkk., 2005).

Sumber penularan *S. typhi* berasal dari kontak dengan pasien penderita demam tifoid dan karier (pembawa kuman) yaitu seseorang yang terinfeksi, tetapi tidak menunjukkan gejala apapun biasa. Seseorang dikatakan karier apabila orang yang telah sembuh dari demam tifoid, tetapi dalam tubuhnya masih berkembang *S. typhi*. Mereka dapat menginfeksi orang lain melalui feses atau urin, dan hal ini dapat terjadi selama bertahun-tahun tanpa disadari. Kedua sumber ini termasuk faktor resiko besar, tetapi ada pula faktor penyebab lain yaitu tingkat pendidikan yang rendah, kondisi lingkungan hidup yang kurang bersih, suplai air minum dan makanan yang di pinggir jalan. Infeksi kuman ini tidak selalu memberikan manifestasi klinik. Tergantung pada jumlah dan faktor virulensi kuman dan imunitas tubuh (Noer, 1996; Hatta and Smits, 2007).

Besarnya angka pasti kasus demam tifoid di dunia sangat sulit ditentukan karena penyakit ini dikenal mempunyai gejala dengan spektrum klinis yang sangat luas. Data World Health Organization (WHO) tahun 2003 memperkirakan angka tertinggi orang yang terinfeksi *S. typhi*

diperkirakan 78% sekitar 17 juta kasus. Rata-rata terjadi kasus demam tifoid 900.000 kasus per tahun dengan angka kematian lebih dari 20.000 kasus. Di negara berkembang, kasus demam tifoid dilaporkan sebagai penyakit endemis dimana 95% merupakan kasus rawat jalan sehingga insidensi yang sebenarnya adalah 15-25 kali lebih besar dari laporan rawat inap di rumah sakit. Di Indonesia kasus ini tersebar secara merata di seluruh propinsi dengan insidensi di daerah pedesaan 358/100.000 penduduk/tahun dan di daerah perkotaan 760/100.000 penduduk/tahun atau sekitar 600.000 dan 1.5 juta kasus per tahun. Umur penderita yang terkena di Indonesia dilaporkan antara 3 - 19 tahun pada 91% kasus. Antara 1 – 5% dari pasien yang mengalami infeksi tifoid yang akut akan menjadi karier yang kronis karena infeksi yang terjadi pada kantung empedu. Kasus ini terjadi tergantung pada umur, jenis kelamin dan perawatan. Kondisi ini lebih sering terjadi pada wanita daripada laki-laki (WHO, 2003; Santoso, 2003).

Penyakit ini termasuk infeksi tropik sistemik bersifat endemis, dan masih merupakan problema kesehatan masyarakat pada negara-negara sedang berkembang di dunia termasuk Indonesia. Penyakit ini jarang ditemukan secara epidemik di Indonesia dan lebih bersifat sporadik, terpencar-pencar di suatu daerah dan jarang sekali terjadi lebih dari satu kasus pada orang serumah (Darmowandowo, 2002). Penyakit ini tercantum dalam Undang-Undang No.6 tahun 1962 tentang wabah. Kelompok penyakit menular ini merupakan penyakit yang mudah

menular dan dapat menyerang banyak orang sehingga menimbulkan wabah. Walaupun demam tifoid tercantum dalam Undang-Undang wabah dan wajib dilaporkan, maka data yang lengkap belum ada sehingga gambaran epidemiologisnya belum diketahui secara pasti (Noer, 1996; Santoso, 2003).

Di Sulawesi Selatan, penderita demam tifoid memperlihatkan peningkatan dari tahun 1990 terdapat 8.528 penderita menjadi 24.405 penderita tahun 1995, sedangkan angka kematian meningkat dari 1,80% menjadi 4,59% (Windarti, 1998). Selama tahun 2005 di Makassar jumlah penderita demam tifoid 2210 orang dan berada pada urutan ke-5 dari 20 penyakit terbanyak penderita rawat inap pada sejumlah rumah sakit yang ada di Makassar, sehingga masih merupakan masalah kesehatan masyarakat (Karim, 2005).

Hatta and Smits (2007) menambahkan di Sulawesi Selatan demam tifoid adalah salah satu penyakit infeksi yang sangat penting dan merupakan kasus terpenting dari komunitas yang terinfeksi mikroba dengan insidensi mencapai 2.500 – 100.000 kasus di beberapa wilayah.

Di dalam tubuh terdapat mekanisme imunitas seluler dan humoral yang menghalangi infeksi dari mikroorganisme yang masuk ke dalam tubuh. Komponen dari imunitas seluler ini diantaranya sel-sel mononuklear (monosit / makrofag). Salah satu kerja dari makrofag yang ada dalam tubuh setelah terinfeksi kuman patogen intraseluler seperti infeksi *Salmonella* akan memfagositosis kuman yang menempel pada

membrannya dengan gerakan seperti amuboid selanjutnya kuman akan lisis setelah dicerna oleh enzim lisosom yang dihasilkan makrofag dan akhirnya kuman tereliminasi sehingga seseorang menjadi sembuh (Kresno, 2001; Baratawidjaja, 2000). Selain itu di dalam tubuh penderita demam tifoid akan terbentuk antibodi anti-O, termasuk kelas Immunoglobulin M (IgM) yang bersifat protektif serta antibodi anti-H yang tergolong kelas IgG bersifat tidak protektif (Lakare, 2001). Antibodi yang berperan pada awal infeksi adalah IgM. Kadar IgM mencapai puncaknya kira-kira 7-14 hari setelah itu kadar IgM menurun dan digantikan oleh IgG (Hatta, et.al., 2002). Terbentuknya antibodi ini merupakan salah satu pula kerja makrofag merangsang pembentukan respon humoral sehingga antibodi IgM dalam tubuh dapat terbentuk. Setelah terjadi peningkatan antibodi penderita maka kuman patogen akan mengalami opsonisasi sehingga kuman menjadi lisis dan penderita menjadi sembuh (Kresno, 2001).

Gen natural resistance associated macrophage protein (NRAMP-1) berperan dalam memodulasi respon imun terhadap serangan kuman patogen. Gen ini merupakan salah satu gen yang mempengaruhi pengaktifan kerja makrofag yakni dapat menyandi membran protein integral yang dilokalisasi pada endosomal dan kompartemen lisosomal makrofag. Selain itu gen NRAMP-1 dapat pula menyandi suatu divalen kation pengangkut protein yang dilibatkan dalam kontrol replikasi intrafagosomal pada patogen intraseluler dengan mengubah lingkungan

fagosomal (Dustan, et.al., 2001). Dengan demikian secara teoritis ada hubungan dengan kemampuan tubuh dalam membentuk respon humoral dalam peningkatan IgM pada penderita tersebut.

Banyak laporan penelitian sebelumnya mengenai hubungan antara gen NRAMP-1 dengan berbagai penyakit seperti tuberculosis, lepra dan penyakit lain yang terkait dengan respon imun. Sedangkan hubungan dengan demam tifoid masih belum jelas (Yen, et.al., 2006). Gen NRAMP-1 memiliki beberapa lokus antara lain INT4, D543N, dan 3'UTR. Selain itu terdapat pula beberapa gen yang berpengaruh pada respon imun tubuh seperti gen Vitamin D Reseptor (VDR), gen *Nucleotide Oligomerization Binding Domain 2* (NOD 2) yang memiliki masing-masing region (Abe, et al, 2003; Fitness, et al., 2004).

Pada penelitian ini kami meneliti gen NRAMP-1 lokus D543N. Hal ini didasarkan adanya penelitian dilaporkan terjadi polimorfisme genetik pada penderita demam tifoid (Dustan, et.al., 2001). Mutasi gen NRAMP-1 lokus D543N adalah perubahan basa pada gen tunggal yang tidak utuh urutan basa nitrogennya dari kodon 543 dalam exon 15 menyebabkan perubahan hasil terjemahan asam amino dari asam aspartat menjadi asparagin. Perubahan basa nitrogen pada gen tunggal yaitu basa G (Guanin) berubah menjadi basa A (Adenin) sehingga kerja gen NRAMP-1 lokus D543N menjadi terganggu (Bellamy, et.al., 1998; Fitness, et.al., 2004).

Polimorfisme gen NRAMP-1 setiap orang berbeda-beda baik pada penderita demam tifoid maupun orang normal. Hal ini kemungkinan bisa dipengaruhi oleh beberapa faktor yakni faktor keturunan ataupun bisa juga faktor lingkungan hidup. Dengan demikian, apabila terjadi perubahan polimorfisme pada gen ini maka akan mempengaruhi respon imun tubuh seseorang terhadap infeksi. Oleh karena itu bila keberadaan gen NRAMP-1 lokus D543N dapat dibuktikan memiliki hubungan dengan infeksi *S. typhi*, maka gen NRAMP-1 ini mempunyai pengaruh dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap penyakit demam tifoid.

Berdasarkan uraian tersebut dilakukan penelitian terhadap penderita demam tifoid di Makassar dengan menganalisis gen NRAMP-1 lokus D543N dan hubungannya dengan titer antibodi pada penderita demam tifoid dengan metode RFLP-PCR dan dipstik serta kultur darah sebagai metode diagnosis penunjang untuk penegasan pasti demam tifoid.

B. Rumusan Masalah

1. Apakah ada perbedaan polimorfisme gen NRAMP-1 lokus D543N pada penderita demam tifoid dan orang normal.
2. Apakah ada hubungan antara gen NRAMP-1 dan titer antibodi pada penderita demam tifoid.

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk

1. Mengetahui polimorfisme gen NRAMP-1 pada penderita demam tifoid dan orang normal.
2. Mengetahui hubungan antara mutasi gen NRAMP-1 dan titer antibodi pada penderita demam tifoid.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian adalah :

1. Hasil penelitian ini dapat menjadi salah satu informasi Dinas Kesehatan Propinsi Sulawesi Selatan dalam menangani masalah demam tifoid.
2. Dapat menambah wawasan peneliti mengenai penyakit demam tifoid dan dijadikan rujukan untuk peneliti selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Umum Penyakit Demam Tifoid

Demam tifoid ialah penyakit infeksi sistemik akut yang disebabkan oleh *S. typhi*, ditandai dengan demam yang berkepanjangan (lebih dari satu minggu), gangguan saluran cerna dan gangguan kesadaran (Ferri, 2004). A. Pfeifer pertama kali berhasil menemukan *Salmonella* dalam feses penderita, kemudian dalam urin oleh Hueppe dan dalam darah oleh R. Neuhauss (Karim, 2005).

Penyakit ini banyak diderita oleh anak-anak, namun tidak tertutup kemungkinan untuk orang muda atau dewasa. Kuman ini terdapat di dalam kotoran dan urin manusia dan juga pada makanan serta minuman yang tercemar kuman yang dibawa oleh lalat. Dalam masyarakat, penyakit ini biasa dikenal dengan nama thypus, tetapi dalam dunia kedokteran disebut tyfoïd fever atau thypus abdominalis, karena pada umumnya kuman menyerang usus, maka usus bisa jadi luka dan menyebabkan perdarahan serta dapat pula terjadi kebocoran usus (Rasmilah, 2001).

Menurut Punjabi (2004) mengatakan beberapa penelitian di seluruh dunia menemukan bahwa laki-laki lebih sering terkena demam tifoid karena laki-laki lebih sering bekerja dan makan di luar rumah yang tidak

terjamin kebersihannya. Tetapi berdasarkan teori daya tahan tubuh wanita lebih berpeluang untuk terkena dampak yang lebih berat atau mendapat komplikasi dari demam tifoid. Salah satu teori yang menunjukkan hal tersebut adalah ketika *Salmonella typhi* masuk ke dalam sel-sel hati, maka hormon estrogen pada wanita akan bekerja lebih berat karena menangani dua hal sekaligus.

Habitat dari kelompok *Salmonella* adalah bakteri yang hidup di dalam usus manusia atau binatang. Dapat juga ditemukan dalam lumpur atau air selokan dan air sungai. Oleh karena itu, *Salmonella* dapat diisolasi dari berbagai spesimen manusia maupun bukan manusia (Lakare, 2001).

Penyebaran sumber infeksi dari *S. typhi* adalah makanan dan minuman yang terkontaminasi oleh *Salmonella* yang ditularkan melalui : air, susu dan produk susu lain, kerang, telur, daging atau produk daging, penyalahgunaan obat, pewarna binatang dan binatang peliharaan di rumah secara alami terinfeksi dengan berbagai *Salmonella* (Jawetz, et.al., 2005).

a. Epidemiologi

Demam tifoid penyebabnya secara klinis hampir selalu *Salmonella* yang beradaptasi pada manusia, sebagian besar kasus dapat ditelusuri pada karier manusia. Penyebab yang paling sering adalah air atau makanan yang terkontaminasi oleh karier manusia. Karier menahun

umumnya berusia lebih dari 50 tahun dan lebih sering pada perempuan dan juga penderita batu empedu. Demam tifoid endemik di Indonesia, namun penyakit ini jarang ditemukan secara epidemik lebih bersifat sporadis banyak terpencar di suatu daerah dan jarang terjadi lebih dari satu kasus pada orang serumah. Di Indonesia demam tifoid dapat ditemukan sepanjang tahun dan insidensi tertinggi pada daerah endemik yaitu pada anak – anak. Terdapat dua sumber penularan *S. typhi* yaitu pasien dengan demam tifoid dan lebih sering adalah karier (Syahrurachman, dkk., 1994).

Di Indonesia kasus ini tersebar secara merata di seluruh propinsi dengan insidensi di daerah pedesaan 358 / 100.000 penduduk / tahun dan di daerah perkotaan 760 / 100.000 penduduk / tahun atau sekitar 600.000 dan 1.5 juta kasus per tahun. Penyakit ini meskipun sudah dinyatakan sembuh, namun penderita belum dikatakan sembuh total karena mereka masih dapat menularkan penyakitnya kepada orang lain (bersifat karier). Pada perempuan kemungkinan untuk menjadi karier 3 kali lebih besar dibandingkan pada laki-laki (Rasmilah, 2001).

b. Patologi

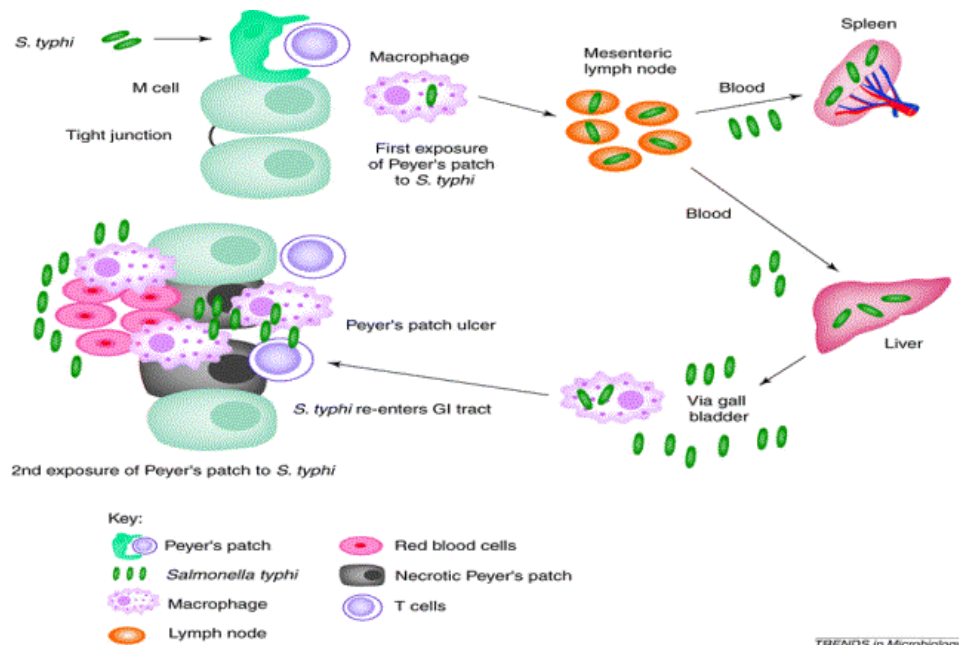
Pada saat *S. typhi* masuk ke dalam tubuh manusia melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi Setelah masuk ke dalam tubuh, bakteri *S. typhi* menuju ke saluran pencernaan dan melekat pada sel fagosit mononuklear (makrofag dan monosit). Sel fagosit ini

merupakan sel dari sistem imun yang bekerja untuk membunuh bakteri dan virus patogen yang masuk dalam tubuh. Namun, *S. typhi* mampu mempertahankan dan memperbanyak diri dalam sel ini. Karena kemampuan *S. typhi* bertahan dalam sel maka bakteri ini digolongkan ke dalam parasit fakultatif intraseluler. Ada sebagian bakteri yang dihancurkan oleh asam lambung dan sebagian lagi masuk ke usus halus dan mencapai jaringan limfoid plak peyer di pusat ileum yang mengalami hipertrofi (Everest, 2001; De Witt, 2002).

S. typhi yang berada dalam saluran pencernaan akan menyerang sel mukosa pada usus kecil. Setelah melekat, bakteri melakukan perpindahan pada folikel limfoid dari usus dan nodul limfa mesentrik. Kuman dapat bertahan dan memperbanyak diri diantara sel fagosit mononuklear dari folikel limfoid, hati dan limfa. Waktu yang dibutuhkan pada periode ini selama bakteri memperbanyak diri antara 10 – 14 hari dari periode inkubasi demam tifoid. *S. typhi* mengeluarkan endotoksin dalam proses inflamasi lokal pada jaringan tempat bakteri berkembang biak dan merangsang pelepasan zat pirogen dan leukosit pada jaringan yang meradang sehingga terjadi demam. Jumlah bakteri yang banyak dalam darah (bakteremia) menyebabkan demam makin tinggi. Bagian utama yang sering terkena infeksi sekunder adalah hati, sumsum tulang, kantung empedu dan ginjal (Everest, 2001).

Bakteri akan dilepaskan lagi ke dalam aliran darah setelah terjadi periode multifikasi intraseluler dan terjadi periode bakteremia kedua.

Periode ini umumnya cukup lama melibatkan beberapa organ dan biasanya penderita akan mengalami panas yang cukup tinggi. Bakteremia ini akan menyebabkan dua kejadian kritis yaitu masuknya bakteri ke dalam kantung empedu dan plak peyer. Periode tadi akan menyebabkan peradangan dan nekrosis jaringan klinis yang ditandai dengan kolesistitis nekrotikans dan pendarahan perforasi usus (Syahrurachaman, dkk., 1994; Everest, 2001).



Gambar 1 : Siklus infeksi *S.typhi* pada tubuh manusia (Everest, 2001)

c. Gejala Klinik

Manifestasi klinik yang ditunjukkan oleh penderita demam tifoid bervariasi. Demam tifoid mempunyai masa inkubasi rata-rata antara 7 - 20 hari. Inkubasi terpendek 3 hari dan terlama 60 hari. Masa inkubasi ini

mempunyai korelasi dengan jumlah kuman yang tertelan, umur, status gizi, dan status imunologik.

Pada minggu pertama dari fase awal sakit sampai menunjukkan gejala (periode inkubasi) biasanya membutuhkan waktu 1 – 3 minggu. Hal ini tergantung pada ukuran inokulum dan keadaan imunitas seseorang (Darmowandowo, 2002; Aspx, 2006).

Terdapat dua tingkatan manifestasi klinik pada penyakit demam tifoid yakni (Darmowandowo, 2002):

1. Fase minggu pertama: gejalanya berupa keluhan dan mirip dengan penyakit infeksi akut pada umumnya. Mulai dari demam biasa, suhu tubuh meningkat, malaise, perasaan tidak nyaman pada daerah perut, pusing, nyeri otot, anoreksia, mual dan muntah, batuk dan epistaksis.
2. Fase minggu kedua: gejala dan tanda klinik menjadi makin jelas. Demam ditemukan setiap hari dan lebih sering pada waktu sore dan malam hari dengan sifat demam remitten yaitu suhu badan naik turun lebih 1°C tetapi tidak mencapai suhu normal serta dapat pula bersifat reguler terutama pada bayi dan tifoid kongenital. Anoreksi dan gangguan gastrointestinal lain makin jelas. Gangguan kesadaran yang ditemukan disebabkan karena *S. typhi* juga dapat menembus sawar darah otak dan menyebabkan meningitis. Manifestasi gejala mental kadang mendominasi gambaran klinis, yaitu konfusi, stupor, psikotik atau koma. Nyeri perut kadang tidak dapat dibedakan dengan

apendisitis. Pada tahap lanjut dapat muncul gambaran peritonitis akibat perforasi usus.

Gejala klinis menjadi lebih kompleks diantaranya peningkatan suhu tubuh (demam mencapai 103° – 104° F atau 40° – 45°C), lidah penderita (kotor di tengah, tepi dan ujung merah dan tremor), hepatomegali, splenomegali, gangguan kesadaran sampai koma dan untuk beberapa kasus menunjukkan gejala yang disebut *rose spot* (bercak berwarna merah pada bagian leher dan perut) biasanya terjadi antara 2 – 5 hari, tetapi kondisi ini jarang ditemukan di Indonesia. Jumlah sel darah putih normal atau rendah. Pada masa preantibiotik, komplikasi utama dari demam enterik adalah hemorrhage dan perforasi dan angka kematian rata-rata 1 – 50 % (Hawley, 2003).

Ada banyak faktor yang mempengaruhi gejala klinis yang ditimbulkan pada infeksi ini, antara lain adalah : Lama sakit, pemilihan antimikroba, usia, pemaparan atau sejarah vaksinasi, virulensi dari bakteri, banyaknya inokulum dan faktor inang (misalnya pasien penderita AIDS) (WHO, 2003).

d. Diagnosis

Beberapa faktor penyebab demam tifoid masih terus menjadi masalah kesehatan penting di negara berkembang meliputi pula keterlambatan penegakan diagnosis pasti karena demam tifoid sukar untuk ditegakkan hanya atas dasar gejala klinis saja. Diagnosis demam

tifoid secara klinis seringkali tidak tepat karena tidak ditemukannya gejala klinis spesifik atau didapatkan gejala yang sama pada beberapa penyakit lain pada anak atau orang dewasa, terutama pada minggu pertama sakit. Sebab gambaran klinis penyakit ini sangat bervariasi dan umumnya tidak khas untuk demam tifoid. Selain penegakan diagnosis secara klinis diperlukan juga pemeriksaan laboratorium untuk konfirmasi penegakan diagnosis demam tifoid (Hatta, Goris, et.al., 2002; Tumbelaka, 2001).

Diagnosis demam tifoid berdasarkan manifestasi klinis dan pemeriksaan laboratorium bersifat penunjang. Untuk memastikan diagnosis demam tifoid diperlukan pemeriksaan bakteriologis dan serologis (Lubis, 1990).

Berbagai metode diagnosis masih terus dikembangkan untuk mencari cara yang cepat, mudah dilakukan dan murah biayanya dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Hal ini penting untuk membantu usaha penatalaksanaan penderita secara menyeluruh yang juga meliputi penegakan diagnosis sedini mungkin dimana pemberian terapi yang sesuai secara dini akan dapat menurunkan ketidaknyamanan penderita, insidensi terjadinya komplikasi yang berat dan kematian serta memungkinkan usaha kontrol penyebaran penyakit melalui identifikasi karier (Tumbelaka, 2001).

Metode yang umum dipakai untuk mendiagnosis demam tifoid antara lain: Diagnosis manifestasi klinik, pemeriksaan penunjang (diagnosis darah tepi, diagnosis bakteriologi dengan isolasi kuman atau

pembiakan kuman, diagnosis serologi dan pemeriksaan biomolekular kuman). Metode diagnosis mikrobiologi atau bakteriologi adalah metode yang paling spesifik dan lebih dari 90% penderita yang tidak mendapat pengobatan, maka pada minggu pertama akan menunjukkan kultur darah yang positif. Tetapi, setelah penggunaan antibiotik hasil akan menurun drastis menjadi 40%. Meskipun demikian, kultur sumsum tulang tetap memperlihatkan hasil yang tinggi yaitu sekitar 90% (Syahrurachman, dkk., 1994; Rasmilah, 2001).

Permasalahan yang terkadang muncul dalam mengkultur yaitu kultur darah menunjukkan hasil positif hanya pada awal berlangsungnya penyakit, yaitu pada minggu pertama dari penyakit. Sebab saat itu masih dalam fase bakteremia atau septikemia berat dan setelah minggu kedua berlangsungnya demam umumnya hasil kultur adalah negatif. Biakan darah positif memastikan demam tifoid tetapi biakan darah negatif tidak menyingkirkan demam tifoid. Hal ini disebabkan karena hasil biakan darah bergantung pada beberapa faktor antara lain : Teknik pemeriksaan laboratorium, vaksinasi dan pengobatan dengan antimikroba (Noer, 1996; Lakare, 2001).

Kegagalan dalam kultur dapat disebabkan oleh keterbatasan media yang digunakan, adanya penggunaan antibiotika, jumlah bakteri yang sangat minimal dalam darah, volume spesimen yang tidak mencukupi, dan waktu pengambilan spesimen yang tidak tepat. Walaupun spesifisitasnya tinggi, pemeriksaan kultur mempunyai sensitivitas yang rendah dan

adanya kendala berupa lamanya waktu yang dibutuhkan (5 – 7 hari) serta peralatan yang lebih canggih untuk identifikasi bakteri sehingga tidak praktis dan tidak tepat untuk dipakai sebagai metode diagnosis baku dalam pelayanan penderita (Tumbelaka, 2001).

Metode diagnosis serologi yang biasa digunakan untuk membantu menegakkan diagnosis penyakit demam tifoid dengan mendeteksi antibodi spesifik terhadap komponen antigen *S. typhi* maupun mendeteksi antigen itu sendiri. Beberapa uji serologis yang biasa digunakan untuk menunjang diagnosis demam tifoid ini meliputi :

1. Uji Widal

Prinsip uji Widal adalah suatu reaksi aglutinasi antara antibodi (aglutinin) dalam serum penderita yang telah mengalami pengenceran berbeda-beda terhadap antigen somatik (O) dan flagela (H) yang ditambahkan dalam jumlah yang sama sehingga terjadi aglutinasi. Pengenceran tertinggi yang masih menimbulkan aglutinasi menunjukkan titer antibodi dalam serum. Antigen yang digunakan pada uji widal adalah suspensi *Salmonella* yang sudah dimatikan dan diolah di laboratorium. Tujuan dari uji widal adalah untuk menentukan adanya aglutinin dalam serum pasien yang diduga menderita demam tifoid. Akibat dari infeksi *S. typhi*, pasien membentuk antibodi, yaitu : antibodi O, antibodi H, dan antibodi Vi. Dari ketiga antibodi tersebut hanya antibodi O dan H yang ditentukan titernya untuk diagnosis. Makin tinggi titernya, makin besar

kemungkinan pasien menderita demam tifoid (Noer, 1996; Baratawidjaja, 2000; Hatta, et.al., 2002).

2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Tes ELISA merupakan suatu pengujian yang melibatkan enzim dan yang penting dalam teknik ini adalah uji kadar *imunobersorben* terikat enzim. Keragaman terbesar dalam merancang ELISA dapat dilihat dalam pemilihan konjugat dan substratnya. Berbagai enzim telah tersedia. Enzim ini mengikat secara langsung ke antibodi atau antigen atau secara tidak langsung melalui biotin / streptavidin atau jembatan protein-A. Uji ini 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, IgG) dan antitragellum IgG pada demam tifoid (Mulyawan, 1999) .

3. Uji Dipstik

Tes dipstik adalah tes yang akurat untuk mendeteksi antibodi IgM spesifik terhadap antigen lipopolisakarida (LPS) dari *S. typhi* dan *S. paratyphi*, berdasarkan atas ikatan antara IgM spesifik dengan LPS tanpa membutuhkan peralatan dan keterampilan khusus serta dapat diterapkan di perifer (Hatta, et al.,2002). Berdasarkan hasil penelitian Hatta, Goris, et al. (2002) bahwa tes dipstik mempunyai tingkat sensitifitas dan spesifisitas lebih tinggi dibandingkan dengan tes konvensional widal.

Dipstik mempunyai dua pita horizontal, pita antigen yang digunakan yaitu lipopolisakarida (LPS) dari dinding sel bakteri *S. typhi* yang diisolasi

dari bakteri pada penderita demam tifoid. Pita bagian bawah merupakan pita antigen *S. typhi* dan sebuah kontrol internal (pita bagian atas). Dengan mengikatkan antigen zat warna khusus yaitu colloidal red atau palanil red dan selanjutnya zat warna khusus yang telah mengikat antigen tersebut ditempelkan pada kertas nilon. Bila serum penderita mengandung antibodi IgM *S. typhi* akan memperlihatkan reaksi yang positif, dimana akan terlihat pada kertas nilon berupa pita berwarna merah (Hatta, 2005).

Pemeriksaan dipstik didasarkan atas ikatan antigen *S. typhi* dengan antibodi manusia spesifik yaitu IgM. Ikatan antibodi secara spesifik terdeteksi dengan IgM konyugasi manusia. Dipstik disiapkan dengan titik dari berbagai jenis antisera yang diuji dengan menggunakan kumpulan serum normal dari ayam atau manusia dengan pengenceran 1/1000 hingga 1/40.000 dalam larutan penyangga fosfat sebagai antigen. Reagen-reagen antibodi menggunakan berbagai kombinasi partikel pewarna dan antisera yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen sebagai upaya untuk memilih kombinasi yang paling efektif terhadap pewarna dan antisera (Snowden, 1995).

4. Latex aglutinasi (drydot)

Menurut Abdoel, et.al. (2007) bahwa latex agglutination assay (drydot) menggunakan antigen *S. typhi* yang diekstraksi dengan fenol dan etanol dari kultur *S. typhi* yang diisolasi dari Indonesia yang ditumbuhkan pada medium Luria Bertabi agar. Kartu ini dapat disimpan dan bertahan selama 2 tahun pada suhu 4, 28, 45, atau 55°C.

Pemeriksaan latex agglutinası dilakukan dengan mengambil 10 ml serum diletakkan di atas kertas agglutinası dengan titik latex yang kering, selanjutnya latex kering dicampurkan dengan cepat ke dalam serum dengan cara mengaduk menggunakan pengaduk khusus yang sesuai dengan tesnya, jika latex suspensi telah homogen selanjutnya kartu diputar dengan posisi horizontal sampai timbul agglutinası (gumpalan) selama 30 detik. Interpretasi hasil, jika positif maka terbentuk agglutinası dan jika negatif suspensi tetap homogen (Abdoel, et.al., 2007).

B. Tinjauan Umum Bakteri *Salmonella Typhi*

a. Etiologi

S. typhi tergolong ke dalam famili enterobacteriaceae. Ciri dari genus *Salmonella* berbentuk batang, gram negatif intraseluler, tidak berspora, bersifat aerobik dan fakultatif anaerob yang artinya sebagian besar waktu hidup kuman tersebut termasuk berkembang biak dilakukan dalam sel pejamu, tetapi jika diperlukan juga dapat hidup dan berkembang hidup di luar sel. Merupakan agen penyebab bermacam-macam infeksi penyakit, mulai dari gastroenteritis yang ringan, infeksi sistemik fokal, septikemia sampai dengan demam tifoid yang berat disertai bakteremia (Syahrurachman, dkk., 1994; Jawezt, dkk., 2005).

b. Klasifikasi *S. typhi*

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

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

c. Morfologi *S. typhi*



Gambar 2 : Bakteri *Salmonella typhi* (Pollack, 2003)

Salmonella typhi adalah bakteri yang berbentuk batang, tidak berspora dan tidak berkapsul tetapi mempunyai flagel peritrik (fimbriae), bersifat fakultatif aerob, bersifat gram negatif, ukuran 2 - 4 mikrometer x 0.5 - 0.8 mikrometer dan bergerak, pada biakan agar darah koloninya besar bergaris tengah 2 sampai 3 millimeter, bulat, agak cembung, jernih,

licin dan tidak menyebabkan hemolisis (Gupte, 1990; Syahrurachman, dkk.,1994).

Memiliki dua atau lebih bentuk antigen H, kebanyakan strain meragikan glukosa, manosa dan manitol untuk menghasilkan asam dan gas, tetapi tidak meragikan laktosa dan sukrosa. Organisme *Salmonella* tumbuh secara aerob dan mampu tumbuh secara anaerob fakultatif. Kebanyakan spesies resisten terhadap agen fisik namun dapat dibunuh dengan pemanasan sampai 54,4°C (130°F) selama 1 jam atau 60°C (140 ° F) selama 15 menit. *Salmonella* tetap dapat hidup pada suhu ruang dan suhu yang rendah selama beberapa hari dan dapat bertahan hidup selama berminggu-minggu dalam sampah, bahan makanan kering, agen farmaceutika dan bahan tinja (Jawetz. Dkk., 2005; Hawley; 2003).

d. Fisiologi *S. typhi*

Kuman ini tumbuh pada suasana aerob dan fakultatif anaerob, pada suhu (15 – 41)°C (suhu pertumbuhan optimum 37°C) dan pH pertumbuhan 6 - 8. Pada umumnya isolat kuman *Salmonella* dikenal dengan sifat-sifatnya yaitu gerak positif, reaksi fermentasi terhadap manitol dan sorbitol positif dan memberikan hasil negatif pada reaksi indol, laktosa, voges praskauer dan KCN. Sebagian besar isolat *Salmonella* yang berasal dari bahan klinik menghasilkan H₂S. *S. thypi* hanya membentuk sedikit H₂S dan tidak membentuk gas pada fermentasi glukosa. Pada médium SSA, EMBA dan MacConkey yang

memperlihatkan koloni kuman berbentuk bulat, kecil dan tidak berwarna, pada agar Wilson Blair koloni kuman berwarna hitam mengkilat akibat pembentukan H₂S (Rasmilah, 2001).

e. Resistensi *S. typhi*

Kuman akan mati karena sinar matahari atau pada pemanasan dengan suhu 60°C selama 15 sampai 20 menit, juga dapat dimatikan dengan cara pasteurisasi, pendidihan dan klorinasi serta pada keadaan kering. Dapat bertahan hidup pada es, salju dan air selama 4 minggu sampai berbulan-bulan. Di samping itu dapat hidup subur pada medium yang mengandung garam metil, tahan terhadap zat warna hijau brilian dan senyawa natrium tetrasetat dan natrium deoksikolat. Senyawa-senyawa ini menghambat pertumbuhan kuman koliform sehingga senyawa tersebut dapat digunakan di dalam media untuk isolasi *Salmonella* dari tinja (Gupte, 1990).

C. Sistem Imunitas

Pertahanan tubuh terhadap infeksi dengan mikroorganisme patogen terjadi dengan berbagai cara. Pertama, sistem imun alamiah atau non-spesifik (*natural/innate*) dengan mengeluarkan agen infeksi atau membunuhnya pada kontak pertama. Bilamana patogen menimbulkan infeksi berbagai respon tidak adaptif ini penting untuk mengendalikan infeksi dan mempertahankan pengawasan terhadapnya sampai terbentuk

respon imun adaptif. Respon imun adaptif memerlukan waktu beberapa hari untuk mengingat limfosit T dan B dalam menemukan antigen spesifik untuk mengadakan proliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel efektor. Respon sel B yang tergantung pada sel T (*T-cell dependent B-cell responses*) tidak akan dapat dimulai sebelum sel mempunyai kesempatan untuk mengadakan proliferasi dan diferensiasi (Kresno, 2001).

Bila sistem imun terpapar benda asing (antigen), maka ada dua jenis sistem imun yang mungkin terjadi, yaitu (Baratawidjaja, 2000; Kresno, 2001; Campbell, 2002) :

1. Sistem Imun non-spesifik (*innate immunity*)

Sistem ini merupakan sistem pertahanan tubuh yang terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme, sehingga dapat memberikan respon langsung terhadap antigen. Pertahanan tersebut secara alamiah dan tidak dipengaruhi secara intrinsik oleh kontak dengan agen infeksi sebelumnya.

Sistem ini dikatakan non-spesifik atau imunitas bawaan karena respon ini tidak ditujukan pada mikroorganisme tertentu dan telah ada serta berperan sejak lahir. Komponen dari imunitas non-spesifik ini adalah kulit dan lapisan mukosa, sel makrofag, sel polimorfonuklear serta sel natural killer (NK).

2. Sistem imun spesifik (*acquired immunity*)

Sistem imun spesifik bersifat adaptif yang didapat yaitu mempunyai kemampuan untuk mengenal antigen tertentu yang pernah terpapar sebelumnya. Sistem imun spesifik membutuhkan waktu untuk mengenal antigen (benda asing) terlebih dahulu sebelum dapat memberikan respon. Mekanisme pertahanan spesifik meliputi sistem produksi antibodi oleh sel B dan sistem imunitas oleh sel T. Bila sel B dirangsang oleh antigen, maka sel tersebut akan berproliferasi dan berkembang menjadi sel plasma yang dapat membentuk antibodi. Fungsi utama antibodi ini ialah pertahanan terhadap infeksi ekstraselular virus dan bakteri. Berbeda dengan sel B, sel T terdiri atas beberapa sel subset dengan fungsi yang berlainan. Fungsi utama sistem imun spesifik ialah untuk pertahanan terhadap bakteri dan virus yang hidup intraseluler.

D. Respon Imun Seluler

a. Aktivasi Sel T

Mekanisme respon imun seluler lebih kompleks dibanding respon imun humoral. Limfosit T memegang peran penting sebagai manajer yang mengontrol respon imun secara keseluruhan. Untuk mengawali respon imun reseptor $\alpha\beta$ pada permukaan sel T harus berikatan dengan kompleks MHC kelas I atau kelas II yang mengandung fragmen antigen atau fragmen self-peptide yang dihasilkan oleh degradasi protein baik yang disintesis oleh sel yang sama (untuk MHC-I) atau yang diproses oleh sel

lain (untuk MHC-II). Pada umumnya respon imun seluler diawali dengan interaksi sel Th dengan antigen yang disajikan oleh APC, atau interaksi antara sel T sitotoksik (Tc) dengan sel sasaran (kontak antar sel). Interaksi antara reseptor sel T (TCR) atau lebih tepat lagi kompleks CD3-TCR, dengan logand Ag-MHC mengakibatkan suatu proses kompleks yang berakhir dengan terlaksananya fungsi sel T (misalnya pembunuhan sel sasaran tau membantu respon sel B) dan proliferasi sel yang diperlukan untuk menambah pool sel T yang dapat mengenal antigen. Setelah pengikatan ligand terjadi fosforilasi sejumlah protein membran maupun sitoplasmik oleh protein tyrosine kinase (PTK) atau non-PTK secara berurutan menyerupai suatu kaskade, sehingga sinyal dari membran dapat diteruskan (ditransduksi) ke nukleus. Di samping CD3, molekul permukaan lain yang juga berperan dalam transduksi sinyal pada sel T adalah CD4/CD8 dan CD45 (Efendi, 2003).

Sel utama yang berperan pada respon imun seluler adalah sel T-sitotoksik yang dapat melakukan fungsi sitotoksisitas apabila antigen dipresentasikan oleh MHC yang sesuai (MHC-restricted). Selain itu ada juga jenis sel lain yang tidak memerlukan presentasi oleh MHC (MHC-unrestricted) misalnya NK, sel LAK yang diduga berasal dari sel NK yang diaktivasi limfokin dan populasi sel lain dengan kemampuan membunuh secara non-spesifik (Efendi, 2003).

Pola pembunuhan sel sasaran oleh sel T-sitotoksik berlangsung dalam 3 fase: (1) sel T terikat pada sel sasaran; (2) Isi vesikel berupa

berbagai substansi yang dilepaskan oleh sel T, sehingga sel sasaran mengalami kerusakan; (3) fase akhir, setelah sel sasaran mati. Pembunuhan sel sasaran oleh sel T-sitotoksik tidak sama dengan lisis sel oleh komplemen, tetapi pada proses ini terjadi fragmentasi DNA dan disintegrasi sel menjadi fragmen-fragmen. Proses ini disebut apoptosis, setelah sel sasaran mati, sel T-sitotoksik tetap hidup dan dapat berfungsi untuk membunuh sel sasaran yang lain (Efendi, 2003).

b. Makrofag

Makrofag adalah sel darah putih yang berukuran besar, yang mencerna mikroba, antigen dan zat-zat lainnya. Sitoplasma makrofag mengandung beberapa granula dan melepaskan berbagai bahan, antara lain enzim lisosom, komplemen, interferon dan sitokin yang semuanya memungkinkan mencerna dan menghancurkan mikroba yang tertelan oleh makrofag. Makrofag tidak ditemukan di dalam darah, tetapi terdapat di tempat-tempat strategis, dimana organ tubuh berhubungan dengan aliran darah atau organ luar. Misalnya makrofag ditemukan di daerah dimana paru-paru menerima udara dari luar dan sel-sel hati berhubungan dengan pembuluh darah (Baratawidjaja, 2002).

Makrofag ini termasuk sistem fagosit mononuklear, makrofag dulu disebut dengan Retikulo Endotelial System (RES), untuk sel-sel yang sangat fagositik yang tersebar luas di seluruh tubuh terutama pada daerah yang kaya akan pembuluh darah (Efendi, 2003).

1. Perkembangan Makrofag (Kresno, 2001)

Makrofag terutama berasal dari sel precursor sum-sum tulang dari promonosit yang akan membelah menghasilkan monosit yang beredar dalam darah. Pada tahap kedua monosit bermigrasi ke dalam jaringan ikat tempat mereka menjadi matang disebut makrofag. Di dalam jaringan, makrofag dapat berproliferasi secara lokal menghasilkan sel sejenis lebih banyak.

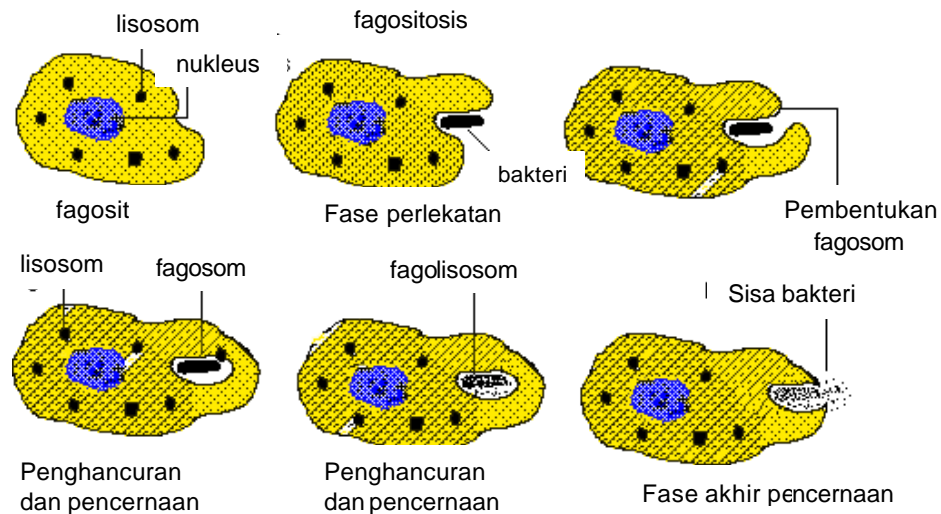
Keberadaan sel-sel sistem makrofag terdapat pada :

1. Jaringan ikat longgar berupa makrofag atau histiosit
2. Di dalam darah berupa monosit
3. Di dalam hati melapisi sinusoid dikenal sebagai sel kupffer
4. Makrofag perivaskular sinusoid limfa, limfonodus dan sum-sum tulang.
5. Pada susunan syaraf pusat berupa microglia berasal dari mesoderm.

2. Mekanisme Kerja Makrofag

Fagositosis merupakan suatu proses atau cara untuk memakan mikroorganisme atau benda asing yang dilakukan dimana setelah benda asing melekat pada permukaan makrofag sehingga makrofag membentuk sitoplasma dan melekat ke dalam membungkus bakteri atau benda tersebut. Tonjolan sitoplasma yang saling bertemu itu akan melebur menjadi satu sehingga benda asing atau bakteri akan tertangkap di dalam sebuah vakuola fagostik intrasel. Enzim lisosom merupakan sistem pencernaan intrasel makrofag dengan kemampuan memecah materi yang berasal dari luar maupun dari dalam. Jadi lisosom akan menyatu dengan

vakuola akan memusnahkan bakteri atau benda asing tersebut (Efendi, 2003).



Gambar 3 : Proses Fagositosis (Anonim, 2006)

3. Fungsi dari makrofag

Sifat fagositik atau gerakan amuboidnya aktif dalam pertahanan tubuh terhadap mikroorganisme, memiliki reseptor untuk immunoglobulin pada membran selnya. Makrofag mempunyai fungsi antara lain (Kresno, 2001; Efendi, 2003):

1. Fungsi utama adalah memakan partikel (fagositosis) dan dicerna oleh lisosom dan menyalurkan sederetan substansi yang berperan dalam fungsi pertahanan dan perbaikan.
2. Dalam sistem imun tubuh, sel ini berperan serta dalam mempengaruhi aktivitas dari respon imun, mereka menelan, memproses dan

menyimpan antigen dan menyampaikan informasi pada sel-sel berdekatan secara imunologis kompeten (limfosit dan sel plasma).

3. Makrofag yang aktif merupakan sel sekretori yang dapat mengeluarkan beberapa substansi penting termasuk enzim lisozim, elastase, kolagenase, dua protein dari sistem komplemen dan agen anti virus yaitu interferon.

4. Aktivasi Makrofag

Pada hakekatnya makrofag terlibat dalam semua stadium respon imun, dimulai dengan makrofag menangkap antigen kemudian memprosesnya lalu menyajikan antigen yang telah diproses dan diikat pada MHC kelas II kepada sel T-helper (Th). Dengan demikian makrofag berfungsi mengaktivasi limfosit. Sel Th teraktivasi memproduksi berbagai faktor kemotaktik yang menarik lebih banyak makrofag, granulosit dan limfosit. Setelah mengaktivasi limfosit, peran makrofag selanjutnya adalah meningkatkan proses inflamasi, tumorisidal dan mikrosidal. Aktivitas makrofag dipengaruhi oleh *Macrophage Activating Factor* (MAF), IFN-gamma (Interferon gamma) dan IL-3 (Interleukin 3) yang disekresikan oleh sel T (Kresno, 2001).

Banyak antigen mikroba maupun antigen larut dipresentasikan kepada limfosit oleh makrofag bersama dengan MHC kelas II. Umumnya mikroba dipresentasikan kepada sel Th oleh makrofag, karena makrofag yang pertama-tama menangkap antigen jenis ini.

E. Antigen dan Antibodi

a. Antigen

Antigen yaitu bahan yang dapat bereaksi dengan produk respon imun dan merupakan sasaran respon imun. Antigen sangat berfungsi dalam pembentukan antibodi. Hal-hal yang mempengaruhi antigen adalah berat molekul benda asing yang tinggi, namun berat molekul 5000 dalton dianggap sebagai berat molekul terendah yang dapat memberikan sifat antigenik. Protein dan karbohidrat digolongkan sebagai antigen yang sangat baik karena memiliki berat molekul tinggi, sedangkan yang kurang efektif tetapi masih antigenik adalah asam nukleat dan lipid (Kresno, 2001., Baratawidjaya, 2000).

Pada suatu molekul antigen terdapat beberapa tempat di permukaannya yang dapat bereaksi secara khas dengan antibodi, tempat ini disebut determinan antigenik.

Karakteristik antigen yang dapat menentukan sifat imunogenitas respon imun adalah (Jawezt, et.al., 2005):

a. Asing

Pada umumnya zat atau molekul yang dikenal sebagai *self* tidak bersifat imunogenik untuk menimbulkan respon imun, tetapi molekul bersifat *nonself*.

b. Ukuran molekul

Imunogen yang paling poten biasanya protein berukuran besar. Umumnya berat molekulnya kurang dari 10.000 dalton kurang bersifat imunogenik dan sangat kecil tidak bersifat imunogenik.

c. Kompleksitas kimiawi dan struktural

Jumlah tertentu kompleksitas kimiawi diperlukan misalnya homopolimer asam amino kurang bersifat imunogenik dibandingkan dengan heteropolimer yang mengandung dua atau tiga asam amino yang berbeda.

d. Determinan antigenik (epitop)

Unit kecil dari suatu antigen kompleks dapat diikat oleh antibodi disebut dengan epitop. Antigen mempunyai satu atau lebih determinan. Pada umumnya, suatu determinan mempunyai ukuran lima asam amino atau gula dengan ukuran secara kasar.

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 tergantung pada banyaknya antigen yang diberikan, respon imun dapat dioptimalkan dengan cara menentukan dosis antigen dan cara pemberian serta waktu pemberian dengan cermat.

b. Antibodi

Jika dirangsang oleh suatu antigen, limfosit B akan mengalami pematangan menjadi sel-sel yang menghasilkan antibodi. Dimana antibodi adalah bahan larut yang digolongkan dalam protein yang disebut globulin dan sekarang dikenal dengan imunoglobulin. Ada 2 ciri dari antibodi yaitu spesifitas dan aktivitas biologiknya (Baratawidjaja, 2000).

Imunoglobulin merupakan substansi pertama yang diidentifikasi sebagai molekul dalam serum yang mampu menetralkan sejumlah mikroorganisme penyebab infeksi yang terdiri atas komponen polipeptida sebanyak 82-96% dan selebihnya adalah karbohidrat. Fungsi imunoglobulin dalam respon imun adalah mengikat dan menghancurkan antigen, namun demikian pengikatan antigen tersebut kurang memberikan dampak yang nyata kalau tidak disertai fungsi efektor sekunder yaitu memacu aktivasi komplemen, di samping itu juga merangsang pelepasan histamin oleh basofil dan mastosit (Kresno, 2001).

Tahap awal pembentukan antibodi adalah fagositosis antigen, biasanya dilakukan oleh sel penyaji antigen (*antigen presenting cell*) terutama makrofag atau sel B, yang memproses dan menyajikan antigen kepada sel T. Sel T yang teraktivasi ini kemudian berinteraksi dengan sel B. Kemudian sel B membawa imunoglobulin permukaan yang cocok dengan antigen, lalu dirangsang untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang membentuk protein antibodi spesifik atau berdiferensiasi menjadi sel memori yang hidup dalam jangka waktu lama.

Sel plasma tersebut mensintesis imunoglobulin dengan spesifitas yang sama dengan yang dibawa oleh sel B (Jawetz, et al., 2005).

Setiap molekul antibodi memiliki suatu bagian yang unik dan terikat suatu antigen khusus dan bagian strukturnya menerangkan kelompok antibodi. Terdapat 5 kelompok antibodi (Baratawidjaja, 2000; Rewa, 2000; Kresno, 2001; Jawetz., et al, 2005):

1. IgM

IgM merupakan imunoglobulin utama yang diproduksi pada pemaparan awal oleh suatu antigen disebut antibodi primer. IgM terdapat pada permukaan semua sel B yang belum aktif. Molekul IgM sifatnya dalam bentuk pentamer, oleh karena itu merupakan imunoglobulin yang berukuran paling besar dengan berat molekul 900.000 dalton.

Antibodi IgM ini seperti isoaglutinin, golongan darah AB, antibodi heterofil. IgM dapat mencegah gerakan mikroorganisme patogen memudahkan fagositosis dan merupakan aglutinator kuat terhadap antigen. IgM juga merupakan antibodi yang dapat mengaktifkan komplemen dengan kuat. IgM ini banyak terdapat di dalam darah tetapi dalam keadaan normal tidak ditemukan di dalam organ maupun jaringan.

2. IgG

IgG merupakan jenis antibodi yang paling umum dihasilkan pada pemaparan antigen berikutnya. IgG termasuk respon antibodi sekunder ini lebih cepat dan berlimpah dibandingkan dengan respon antibodi primer.

IgG ditemukan di dalam darah dan jaringan. IgG merupakan satu-satunya antibodi yang dipindahkan melalui plasenta dari ibu ke janin di dalam kandungannya. IgG ibu melindungi janin dan bayi baru lahir sampai sistem kekebalan bayi bisa menghasilkan antibodi sendiri.

IgG bentuknya monomer dengan berat molekul 160.000 dalton; kadarnya dalam serum 13 mg/ml yang merupakan 75% dari semua imunoglobulin total. IgG ditemukan dalam berbagai cairan serebrospinal, urin, darah dan peritoneal.

3. IgA

Kelas antibodi kedua terbanyak dalam serum yang memegang peranan penting pada pertahanan tubuh terhadap masuknya mikroorganisme melalui cairan sekresi dan diproduksi dalam jumlah besar oleh sel plasma dalam jaringan limfoid yang terdapat sepanjang saluran pencernaan, respiratorik dan urogenital. IgA ditemukan di dalam saliva, air mata, kolostrum dan dalam sekret bronkus, vagina dan prostat. IgA juga berfungsi membatasi absorpsi antigen yang berasal dari makanan.

4. IgD

Antibodi yang terdapat dalam jumlah yang sangat sedikit di dalam darah, dimana fungsinya belum sepenuhnya dimengerti. Mungkin hal tersebut disebabkan oleh karena IgD tidak dilepas sel plasma dan sangat rentan terhadap degradasi oleh proses proteolitik. IgD bertindak sebagai

reseptor antigen ketika terdapat pada permukaan limfosit tertentu. Ini juga terjadi pada beberapa sel leukemia limfatik.

Peran biologiknya sebagai antibodi humoral belum jelas yang telah diketahui adalah perannya sebagai antibodi dalam reaksi hipersensitivitas terhadap penisilin. IgD merupakan komponen permukaan utama dari sel B dan pertanda dari diferensiasi sel B yang lebih matang. IgD tidak mengikat komplemen mempunyai aktivitas antibodi terhadap antigen berbagai makanan dan autoantigen. IgD ditemukan bersama IgM pada permukaan sel B sebagai reseptor antigen.

5. IgE

IgE dapat dijumpai dalam serum dengan kadar amat rendah hanya 0,0004% saja dari kadar immunoglobulin total. Salah satu sifat pentingnya yaitu kemampuannya melekat secara erat pada permukaan mastosit atau basofil melalui reseptor Fc. Antibodi yang menyebabkan reaksi alergi akut IgE penting dalam melawan infeksi parasit (misalnya *river blindness* dan *skistosomiasis*) yang banyak ditemukan di negara berkembang.

F. Struktur *Deoxyribonucleic Acid* (DNA)

DNA mengandung informasi genetika yang diwariskan oleh keturunan yang turun temurun dari satu generasi ke generasi berikutnya, informasi ini ditentukan oleh urutan pasangan basa pada DNA. Informasi ini dikode di dalam substansi kimiawi DNA dan diproduksi dalam semua sel tubuh. Program inilah yang mengendalikan perkembangan sifat

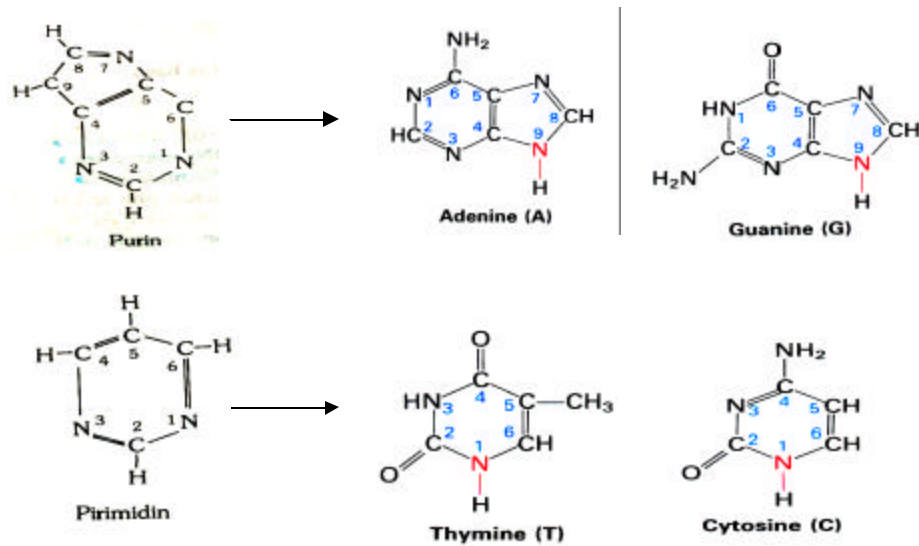
biokimiawi, fisiologi dan sebagian sifat perilaku (Suryo, 1998; Campbell, 2002).

Molekul DNA merupakan rantai ganda yang panjang, dengan basa-basa komplementer (A-T; G-C) berpasangan menggunakan ikatan hidrogen pada pusat molekul. Sifat komplementer dari basa memungkinkan satu rantai cetakan (*template*) menyediakan informasi untuk salinan atau ekspresi informasi pada suatu rantai yang lain (rantai penyandi). Pasangan-pasangan basa ini tersusun dalam bagian pusat *double helix* DNA dan menentukan informasi genetiknya (Jawezt, dkk., 2005; Fatchiyah, 2006).

Setiap untai heliks DNA tersusun oleh sederetan dari nukleotida-nukleotida yang menjadi unit dasar dari DNA biasanya disebut *Deoxynucleotide*. Sebelum disintesis menjadi DNA, molekul nukleotida berada dalam keadaan bebas terapung-apung dalam protoplasma sel. Dalam keadaan ini nukleotida berbentuk triposfat. Setiap nukleotida dibentuk dari tiga macam molekul (Pelczar, 1998; Suryo, 1998) :

1. Gula; sebuah gugusan gula yang berkarbon lima (pentosa) yang biasa disebut deoksiribosa
2. Sebuah molekul asam fosfat
3. Basa nitrogen; suatu struktur cincin berupa basa nitrogen yang dibedakan atas:
 - ? Adenin dan guanin, merupakan basa dengan struktur cincin ganda yang disebut purin.

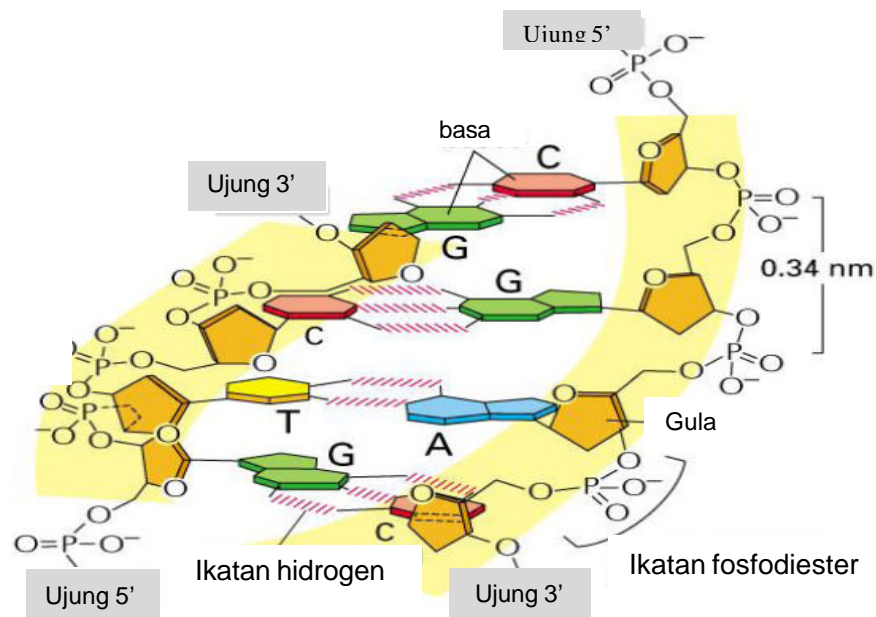
? Timin dan sitosin, merupakan basa dengan struktur cincin tunggal yang disebut pirimidin.



Gambar 4: Struktur Basa Nitrogen DNA (Wikipedia, 2006)

Berdasarkan model DNA dari James Watson dan Francis Crick pada gambar, yang menunjukkan bahwa DNA memiliki model heliks ganda (*double helix*). Di bagian luar terdapat deretan gula-fosfat (yang membentuk tulang punggung dari “double helix”). Di bagian dalam dari “double helix” terdapat basa purin dan pirimidin. Dua rantai polinukleotida saling berikatan melalui ikatan atom hidrogen antara basa-basa nitrogen dari rantai yang berbeda yaitu antara pasangan purin dan pirimidin tertentu. Adenin hanya dapat berpasangan dengan timin yang dihubungkan oleh dua atom H, sedangkan guanin hanya dapat berpasangan dengan sitosin yang dihubungkan oleh tiga atom H. Jadi dua

deretan nukleotida itu komplementer satu dengan lainnya, artinya urutan nukleotida dalam satu mendikte urutan nukleotida dari deret pasangannya.

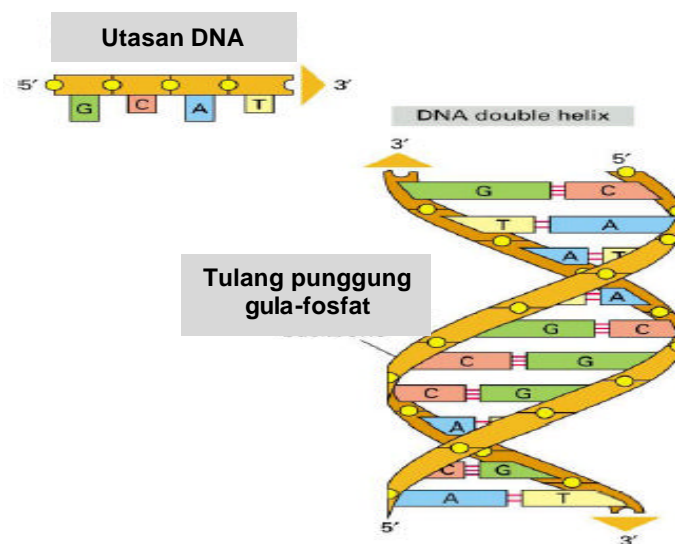


Gambar 5: Model molekul DNA (Fatchiyah, 2006)

Urutan nukleotida tersebut dihubungkan bersama-sama menjadi utasan polinukleotida DNA oleh ikatan-ikatan fosfodiester yaitu setiap gugusan fosfat menghubungkan atom karbon nomor-3 pada deoksiribosa sebuah nukleotida dengan atom karbon nomor-5 pada deoksiribosa nukleotida berikutnya dengan gugusan fosfat terletak di luar. Deretan polinukleotida DNA tersebut mempunyai bentuk spiral. Maka satu spiral penuh (360°) mengandung 10 pasangan basa dengan diameter kira-kira 20°A dan lebar spiral itu tetap. Spiral itu membuat satu putaran lengkap 34°A , sedangkan jarak antara satu basa dengan basa lainnya ialah $3,4^\circ\text{A}$.

Panjang molekul DNA pada umumnya tersusun dalam ribuan pasangan basa atau kilobase pavis (kbp). Setiap pasangan basa dipisahkan dari urutan sebelumnya sekitar 0,34 nm atau sekitar $3,4 \times 10^{-7}$ mm. Polaritas dari rantai DNA ditunjukkan dengan sebutan ujung 5' dan ujung 3'. Arah pembacaan basa nukleotida dari ujung-5' menuju ujung-3'. Pada ujung 3' membawa gugus -OH bebas pada posisi 3' dari cincin gula dan ujung 5' membawa gugus fosfat bebas pada posisi 5' dari cincin gula, seperti pada Gambar 7 (Suryo, 1998; Pelczar, 1998; Fatchiyah, 2006).

DNA double heliks dapat dikopi secara persis karena masing-masing untai mengandung sekuen nukleotida yang persis berkomplemen dengan sekuen untai pasangannya. Masing-masing untai dapat berperan sebagai cetakan untuk sintesis dari untai komplemen baru yang identik dengan pasangan awalnya (Campbell, 2002; Fatchiyah, 2006).



Gambar 6: DNA double helix (Fatchiyah, 2006)

G. GEN NRAMP-1

Gen NRAMP-1 sebelumnya dikenal dengan nama Solute Carrier Family 11 (SLC11A1) merupakan gen spesifik yang dapat menyandi proton yang digabung dengan divalen pengangkut ion logam dan pengaktifan kerja makrofag. Gen ini memiliki beberapa region antara lain: D543N (1703 G/A), 3' untranslated region (3'UTR, 1729+55 del 4 TGTG/del) yang berada pada daerah 55 nukleotida downstream dari kodon terakhir pada exon 15, nukleotida tunggal pada Intron 4 (469+14 G/C) yang mana dapat memodulasi fungsi makrofag dan dilaporkan mempunyai hubungan dengan penyakit yang terkait dengan kekebalan tubuh (Fitness, et.al., 2004).

Makrofag merupakan sebuah sel integral yang melawan agen mikroorganisme patogen intraselluler dan NRAMP-1 memiliki peran yang signifikan dalam fase awal interaksi antara makrofag dan patogen. Gen NRAMP-1 mempengaruhi banyak fungsi yang penting dalam pengaktifan makrofag meliputi up-regulasi, kemokin (KC), sitokin, histokompatibel kompleks utama (MHC) kelas II, aktivasi respirasi, apoptosis, dan lain-lain. Mekanisme langsung oleh efek NRAMP-1 pada fungsi makrofag ini tidaklah begitu jelas. Namun gen NRAMP-1 ini dapat menyandi suatu membran protein integral yang dilokalisir pada endosomal dan kompartemen lisosomal dalam makrofag. Gen NRAMP-1 berfungsi sebagai pengangkut ion logam yang mengatur tingkat seluler yang

mungkin membatasi replikasi patogen intraseluler dengan mengubah lingkungan fagolisosomal (Dustan, et.al., 2001).

Gen NRAMP-1 menyandi suatu divalen kation pengangkut protein yang dilibatkan dalam kendali replikasi *intraphagosomal* patogen intraseluler dan aktivasi makrofag. Ada banyak studi tentang hubungan antara gen NRAMP-1 dan berbagai penyakit yang terkait dengan kekebalan seperti Mycobacteriosis, Salmonellosis dan Leishmaniasis. Namun hubungan itu belum begitu jelas (Blackwell, et.al., 1995).

Pada tikus, kerentanan untuk infeksi dengan patogen intraseluler seperti *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium* dan *Leishmania* dikontrol oleh gen NRAMP-1 pada kromosom 1, yang mana pengaruhnya jarang terjadi pada replikasi parasit intraseluler di makrofag. Gen NRAMP-1 dikode pada membran protein integral yang diekspresikan dalam leukosit makrofag / monosit dan polimorfonuklear. Dimana pada protein dilokalisasi dalam lisosomal diruangan makrofag dengan cepat dihancurkan dalam partikel membran fagosom pada proses fagositosis. Gen NRAMP-1 berfungsi sebagai pengangkut pH-dependen dan mempunyai efek pleiotropik terhadap berbagai efektor terkait sistem kekebalan untuk memudahkan penghancuran atau pembunuhan bakteri (Govoni & Gros, 1998, Hergaux, et.al., 2002).

Gen NRAMP-1 ini pada manusia sama dengan gen NRAMP-1 murine terutama dalam hal resistensinya terhadap parasit intraseluler termasuk *Bacillus calmette Guerin*, *Leishmania* dan *Salmonella*. Dimana

NRAMP-1 ini mengkode pula ion transporter yang diletakkan di membran lisosom selama fagositosis dari Mycobacteria dan patogen lainnya (Koh, et.al., 2005).

Hergaux, et.al. (2002) mengatakan antibodi poliklonal dihasilkan gen NRAMP-1 untuk melawan kuman yang menginfeksi manusia dan menggunakan reagen untuk dilokalisasikan pada protein seluler dan subseluler di dalam neutrofil manusia. Kemungkinan fungsi NRAMP-1 di dalam neutrofil yakni berhubungan dengan NRAMP-1 yang memiliki kepekaan terhadap penyakit seperti lepra dan penyakit penyebab radang seperti arthritis rheumatoid.

Daerah kromosomal NRAMP-1 pada tikus terdapat pada kromosom 1 sedangkan manusia pada kromosom 2q35. Pada manusia, lokasi yang paling tinggi ekspresi NRAMP-1 yaitu daerah sekeliling leukosit dan paru-paru. Sejumlah varian polimorfik telah digunakan untuk mempelajari asosiasi NRAMP-1 dan kepekaannya terhadap penyakit TB dan lepra. Studi dilakukan untuk mengukur asosiasi NRAMP-1 terhadap penyakit TB pada suatu populasi Gambia (Afrika barat) dimana dari hasil varian polimorfik menunjukkan bahwa gen NRAMP-1 mempengaruhi kepekaan terhadap beberapa penyakit (Kishi, 1997).

Beberapa fungsi NRAMP-1 pada infeksi mikroba yakni mengatur pengaktifan makrofag pada infeksi dan penyakit autoimun. Sedangkan NRAMP-2 mengendalikan penyakit anemia. Kedua-duanya adalah pengangkut divalen kation (Fe^{2+} , Zn^{2+} , dan Mn^{2+}), NRAMP-2 merupakan

suatu simporter H^+ dan ion logam, sedangkan NRAMP-1 adalah suatu antiporter H^+ atau divalen kation. Hal ini menyediakan suatu model untuk ion logam homeostasis di dalam makrofag. NRAMP-2 dilokasi awal endosom dengan ekstraseluler memperoleh divalen kation ke dalam sitosol. NRAMP-1 dilokasi untuk memperlambat proses lisosom yang membawa divalen kation dari sitosol ke fagolisom. Pada ion Fe^{2+} menghasilkan antimikrobal hidroksil yang radikal pada reaksi Fenton. Ion Zn^{2+} dan Mn^{2+} dapat juga mempengaruhi aktivitas endosomal menghasilkan metalloprotease dan penghancuran fagolisom. Kebanyakan seluler berfungsi pada dependen ion logam sebagai kofaktor dapat menjelaskan berbagai efek NRAMP-1 pleiotropik dan berperan pada infeksi penyakit autoimmun (Jenefer, et.al., 2000).

Gen NRAMP-1 mengkode makrofag polipeptida spesifik yang diprediksi dalam gambaran karakteristik pada membran protein integral. Analisis urutan nukleotida NRAMP pada cDNA ditunjukkan dalam 27 perkawinan pada strain tikus yang tidak peka pada fenotifnya (Malo et al., 1994). Klon cDNA dikloning dan dikarakteristik dari gen NRAMP manusia. Analisis urutan diindikasikan pada polipeptida manusia yaitu 550 asam amino membran protein dalam 10 sampai 12 yang diduga termasuk domain transmembran (Cellier, et.al., 1994).

Kishi (1994) mengisolasi cDNA yang mengkode NRAMP manusia yang ukurannya 2,245-bp untuk menghasilkan protein 483 residu asam

amino dimana bobot molekularnya adalah 52.8 kD. Dalam hal ini urutan asam amino adalah 89% homolog dengan tikus.

Perubahan asam amino dari asam glisin menjadi asam aspartat pada posisi 169 (*G169 dan D169*) di dalam NRAMP-1 yang dihubungkan dengan kepekaan fenotipe. Hubungan antara NRAMP-1 dan kepekaan pada patogen intraseluler yang ditetapkan berdasarkan konstruksi dari NRAMP-1 tikus dan resistensi alel transgenik (NRAMP1^{G169}) ini peka pada alel tikus (NRAMP1^{D169}). Pada *typhimurium*, kepekaan alel NRAMP-1 tikus tidak mampu untuk mengendalikan infeksi pada mikroba yang jumlahnya sedikit sampai mengalami kematian. Tetapi *S. typhimurium* tumbuh pada tingkat lebih lambat dan cepat dimusnahkan dari binatang (Dustan, et.al., 2001).

Cellier, et.al. (1994) mengatakan gen NRAMP berisi sedikitnya 15 exon dan 1 exon disandikan oleh asam amino Ala yang ada di dalam intron 4. Menurut Blackwell, et.al. (1995) bahwa gen NRAMP manusia memutar 12 kb dan mempunyai 15 exon. Pada tahap transkripsi, lokasi inisiasi memetakan 148 bp pada proses translasi di kodon inisiasi.

Liu, et.al. (1995) mengidentifikasi 9 urutan varian exon yang dihubungkan dengan gen NRAMP. Empat varian di dalam daerah persandian gen yaitu 2 pada missin mutasi dan 2 pada substansi nukleotida pengganti. Suatu mikrosatelit terletak dalam region gen, 3 varian di dalam intron, dan 1 varian terletak di dalam 3'UTR. Hubungan 2 marker mikrosatelit ini sangat polimorfik yakni D2S104 dan D2S173

berubah menjadi NRAMP-1 pada 1.5-MB YAC. Marker molekular ini berperan pada NRAMP-1 di dalam kepekaan terhadap penyakit tuberculosi dan makrofag lain.

H. Ekstraksi DNA

Isolasi DNA merupakan proses mengidentifikasi DNA dari suatu makhluk hidup dengan suatu proses ekstraksi DNA di dalam sel. Tujuan isolasi DNA adalah untuk memisahkan genom DNA dari molekul lain di dalam suatu sel atau sel tanpa debris sel (Toha, 2001).

DNA dapat diisolasi pada manusia. DNA manusia dapat diisolasi melalui darah. Darah manusia terdiri atas plasma darah, globulus lemak, substansi kimia (karbohidrat, protein dan hormon) dan gas (oksigen, nitrogen dan karbon dioksida). Plasma darah terdiri atas eritrosit (sel darah merah), leukosit (sel darah putih) dan trombosit (platelet). Komponen darah yang diisolasi yaitu sel darah putih. Sel darah putih dijadikan pilihan karena memiliki nukleus, dimana terdapat DNA di dalamnya (Wikipedia, 2007).

Dalam preparasi sampel untuk DNA merupakan langkah awal untuk menentukan keberhasilan proses identifikasi DNA dari sampel yang akan dilihat. Isolasi DNA dari sel membutuhkan perangkat terutama laboratorium yang memenuhi syarat yang sangat dibutuhkan untuk melakukan proses isolasi DNA. Banyak metode yang digunakan untuk mengisolasi DNA tergantung pada spesimen yang akan diekstraksi.

Keberhasilan isolasi DNA sangat bergantung pada keterampilan teknik mengisolasi DNA yang akan diperiksa. Banyak metode yang digunakan untuk mengisolasi DNA tergantung pada spesimen yang akan dideteksi. Metode tersebut pada dasarnya memiliki prinsip yang sama, namun ada beberapa hal tertentu yang biasanya digunakan modifikasi untuk dapat menghancurkan inhibitor yang ada dalam masing-masing sumber spesimen (Steen, 1999; Hatta, 2002).

Ada dua metode dalam mengisolasi DNA adalah metode fisik dan metode kimia. Metode fisik merupakan sel yang dirusak secara mekanis dengan membuat sel menjadi shock dan pemanasan serta pembekuan (Hatta, 2002). Untuk metode pemanasan dan pembekuan, sel dilisis dengan pemberian suhu tinggi selanjutnya didinginkan secara tiba-tiba dalam freezer sehingga sel mengalami shock, setelah itu sel dapat didenaturasi pada suhu 90 – 94°C. Pada metode kimia, sel dilisis dengan menggunakan suatu zat kimia sehingga mengganggu integrasi sel barier (Hatta, 2002).

Prinsip-prinsip dalam melakukan isolasi DNA dengan teknik kimia ada dua yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas. Teknik sentrifugasi tersebut dilakukan di dalam sebuah

mesin yang bernama mesin sentrifuge dengan kecepatan yang bervariasi (Wikipedia, 2007).

Ada beberapa metode kimia untuk ekstraksi DNA antara lain (Fauza dan Hatta, 2003):

1. Metode enzim proteinase-K

Dalam metode ini setelah sampel mendapat perlakuan dengan metode enzim, maka bila jumlah atau volume sampel kecil (kurang dari 100 µl) dilanjutkan dengan metode Boom. Bila volume sampel besar (lebih dari 100 µl) dilanjutkan dengan metode ekstraksi fenol dan presipitasi alkohol

2. Metode Boom

Metode ini tidak dipakai jika sampel mengandung darah karena hemoglobin akan mempengaruhi proses PCR dan hemoglobin akan berikatan dengan bahan diatom yang dipergunakan pada metode ini.

3. Metode ekstraksi fenol dan presipitasi alkohol

Metode ini biasanya digunakan untuk ekstraksi DNA pada sampel darah dan cairan tubuh. Hemoglobin dapat dihilangkan pada ekstraksi fenol.

Metode kimia yang digunakan yaitu sel dapat dihancurkan dengan menggunakan senyawa kimia seperti buffer TES yang terdiri dari Tris, EDTA (Etilen Diamin Tetra Acetat) dan SDS (Sodium Deodesil Sulfat). Larutan EDTA berfungsi sebagai perusak sel dengan cara mengikat ion magnesium. Ion Mg^{2+} tersebut untuk mempertahankan integritas sel

maupun mempertahankan aktivitas enzim nuklease yang dapat merusak asam nukleat. Adapun SDS yakni sejenis detergen yang bersifat basa kuat yang dapat digunakan untuk merusak membran sel. Hal ini mengakibatkan sel mengalami lisis. Kotoran atau debris sel yang ditimbulkan akibat pengrusakan sel oleh EDTA dan SDS dibersihkan dengan proses sentrifugasi sehingga yang tertinggal hanya molekul nukleotida (DNA dan RNA). Untuk menghilangkan protein dari larutan digunakan fenol kloroform dimana fenol berfungsi mengikat protein dan sebagian kecil RNA, sedangkan kloroform berfungsi untuk membersihkan protein dan polisakarida dari larutan. Protein juga dapat dihilangkan dengan bantuan enzim proteinase. Agar molekul RNA juga dibersihkan dari larutan, enzim RNase juga digunakan untuk merusak molekul tersebut dengan hilangnya protein dan RNA maka DNA dapat diisolasi secara utuh. Hal ini dilakukan dengan cara memurnikan DNA dengan etanol 70% serta ditambahkan NH_4 asetat yang berfungsi untuk memekatkan DNA. Penambahan isopropanol akan menyebabkan DNA mengendap berupa tepung berwarna putih, endapan DNA tersebut dimurnikan kembali sebelum dilarutkan dengan buffer TE (Muladno, 2002).

I. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Reaksi berantai polymerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara in

vitro. PCR ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis. DNA pada PCR dapat dicapai bila menggunakan primer oligonukleotida yang disebut amplimers. Primer DNA suatu sekuens oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA PCR memungkinkan dilakukannya pelipatgandaan suatu fragmen DNA. Umumnya primer yang digunakan pada PCR terdiri dari 20-30 nukleotida. DNA template (cetakan) yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan dan berasal dari patogen yang terdapat dalam spesimen klinik. Enzim DNA polimerase merupakan enzim termostabil Taq dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus*. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) menempel pada ujung 3' primer ketika proses pemanjangan dan ion magnesium menstimulasi aktivasi polimerase (Yuwono, 2006).

Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama adalah (Nasir, 2006; Yuwono, 2006) :

- a. DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan. DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara $10^5 - 10^6$ molekul. Dua hal penting tentang cetakan adalah kemurnian dan kuantitas.
- b. Oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuens oligonukleotida pendek (18 – 28 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA yang mempunyai kandungan G + C sebesar 50 – 60% untuk kestabilan penempelan primer.

- c. Deoksiribonukelotida trifosfat (dNTP) terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP. dNTP mengikat ion Mg^{2+} sehingga dapat mengubah konsentrasi efektif ion. Komponen ini yang diperlukan untuk reaksi polimerasi.
- d. Enzim DNA Polimerase yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim ini diperoleh dari *Eubacterium* yang disebut *Thermus aquaticus*, spesies ini diisolasi dari taman *Yellowstone* pada tahun 1969. Enzim polimerase Taq tahan terhadap pemanasan berulang-ulang yang akan membantu melepaskan ikatan primer yang tidak tepat dan meluruskan wilayah yang mempunyai struktur sekunder.
- e. Komponen pendukung lain adalah senyawa buffer. Larutan buffer PCR umumnya mengandung 10 – 50mM Tris-HCl pH 8,3-8,8 (suhu 20°C); 50 mM KCl; 0,1% gelatin atau BSA (Bovine Serum Albumin); Tween 20 sebanyak 0,01% atau dapat diganti dengan Triton X-100 sebanyak 0,1% disamping itu perlu ditambahkan 1,5 mM $MgCl_2$.

Pada proses PCR menggunakan menggunakan alat termosiklus. Sebuah mesin yang memiliki kemampuan untuk memanaskan sekaligus mendinginkan tabung reaksi dan mengatur temperatur untuk tiap tahapan reaksi.

Ada tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat (Muladno, 2000; Yuwono; 2006) :

a. Denaturasi

Di dalam proses PCR, denaturasi awal dilakukan sebelum enzim taq polimerase ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Hal ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktivitas enzim Taq polymerase. Aktivitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5; 95 dan 97,5°C.

b. Annealing (penempelan primer)

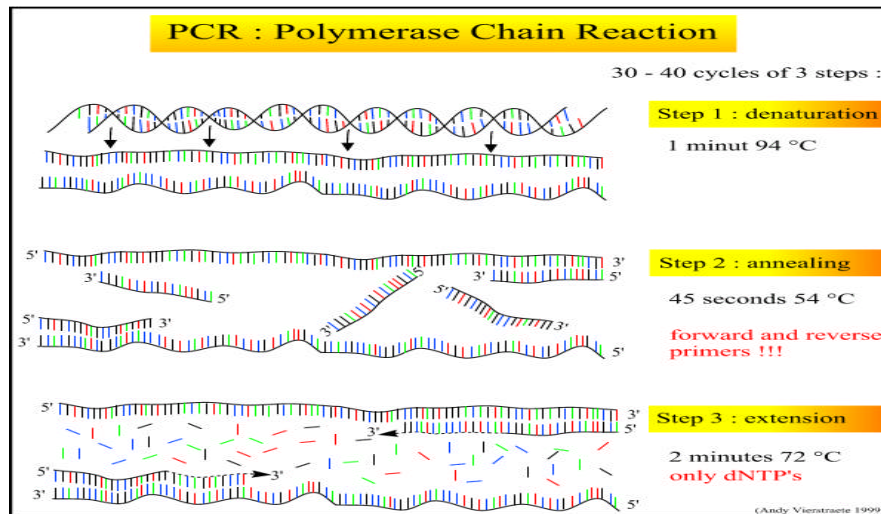
Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60 % G+C untuk kestabilan penempelan primer pada proses ini dan kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena

hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR.

Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30 – 45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan adalah antara 36°C sampai dengan 72°C, namun suhu yang biasa dilakukan itu adalah antara 50 – 60°C.

c. Pemanjangan Primer (Extention)

Selama tahap ini Taq polymerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan 35 – 100 nukleotida / detik. Hal ini bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda.

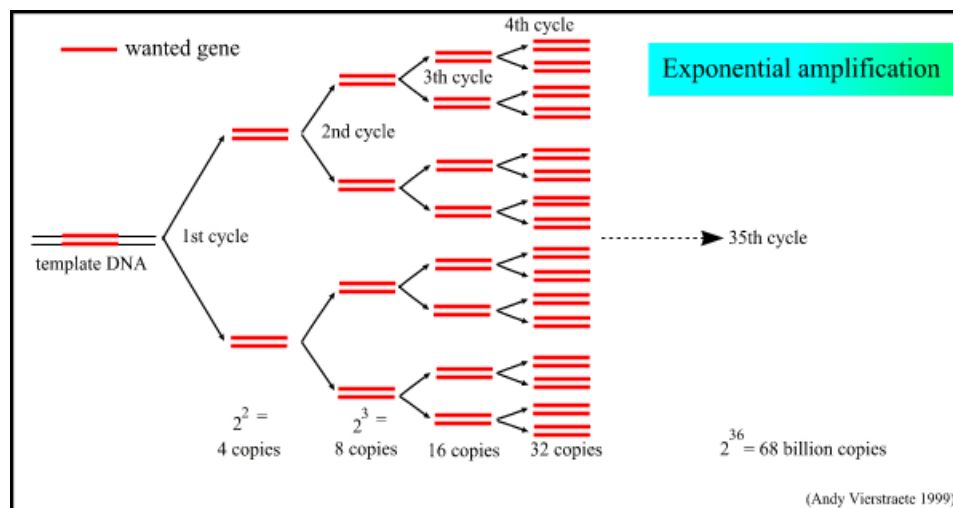


Gambar 7 : Proses Siklus PCR (Wikipedia, 2006)

Reaksi-reaksi tersebut di atas diulangi lagi dari 25 – 30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan diperoleh molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru yang merupakan hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi (Yuwono, 2006).

Metode PCR tersebut sangat sensitif. Sensitivitas tersebut membuatnya dapat digunakan untuk melipatgandakan satu molekul DNA. Metode ini juga sering digunakan untuk memisahkan gen-gen berkopi tunggal dari sekelompok sekuen genom. Dengan menggunakan metode PCR, dapat diperoleh pelipatgandaan suatu fragmen DNA (110 bp, 5×10^{19} mol) sebesar 200.000 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit seperti Gambar 8 Hal ini menunjukkan bahwa pelipatgandaan suatu fragmen DNA dapat dilakukan secara cepat. Kelebihan metode PCR

adalah bahwa reaksi ini dapat dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit, misalnya dengan DNA cetakan yang diperlukan hanya sekitar 5 µg, oligonukleotida yang diperlukan hanya sekitar 1 mM dan reaksi ini biasa dilakukan dalam volume 50-100 µl. DNA cetakan yang digunakan juga tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu sehingga metode PCR dapat digunakan untuk melipatgandakan suatu sekuen DNA dalam genom bakteri hanya dengan mencampurkan kultur bakteri di dalam tabung PCR (Yuwono, 2006).



Gambar 8. Eksponensial Amplifikasi Gen pada PCR (Wikipedia, 2006)

Teknik PCR dapat dimodifikasi ke dalam beberapa jenis, yaitu (Campbell, 2002; Wikipedia, 2006; Wisconsin, 2006) :

1. *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP); metode ini digunakan untuk membedakan organisme berdasarkan analisis model derivat dari perbedaan DNA.

2. *Inverse-PCR*; metode ini digunakan ketika hanya satu sekuen internal yang diketahui. Template dicerna dengan enzim restriksi yang memotong bagian luar daerah yang akan diamplifikasi, fragmen restriksi yang dihasilkan ditempelkan dengan ligasi dan diamplifikasi dengan menggunakan sekuens primer yang memiliki titik ujung yang memiliki jarak yang jauh satu sama lain dengan segmen eksternal yang telah tergabung. Metode ini khusus digunakan untuk mengidentifikasi "sekuens antara" dari beragam gen.
3. *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 ini yakni set kedua mengamplifikasi target kedua selama proses pertama berlangsung. Sekuens DNA target dari satu set primer yang disebut *primer inner* disimpan di antara sekuens target set kedua dari primer yang disebut sebagai *outer primer*. Pada prakteknya, reaksi pertama dari PCR menggunakan *outer primer*, lalu reaksi PCR kedua dilakukan dengan *inner primer* atau *nested primer* menggunakan hasil dari produk reaksi yang pertama sebagai target amplifikasi. *Nested primer* akan menyatu dengan produk PCR yang pertama dan menghasilkan produk yang lebih pendek daripada produk yang pertama.
4. *Quantitative-PCR*; digunakan untuk pengukuran berulang dari hasil produk PCR. Metode ini secara tidak langsung digunakan untuk

mengukur kuantitas mulai dari jumlah DNA, cDNA, atau RNA. Hasil dari metode ini juga menampilkan copi dari sampel

5. *Reverse Transcriptase (RT-PCR)*; metode ini digunakan untuk amplifikasi, isolasi atau identifikasi sekuen dari sel atau jaringan RNA. Metode ini dibantu oleh *reverse transcriptase* (mengubah RNA menjadi cDNA), mencakup pemetaan, menggambarkan kapan dan dimana gen diekspresikan.

J. Metode RFLP-PCR

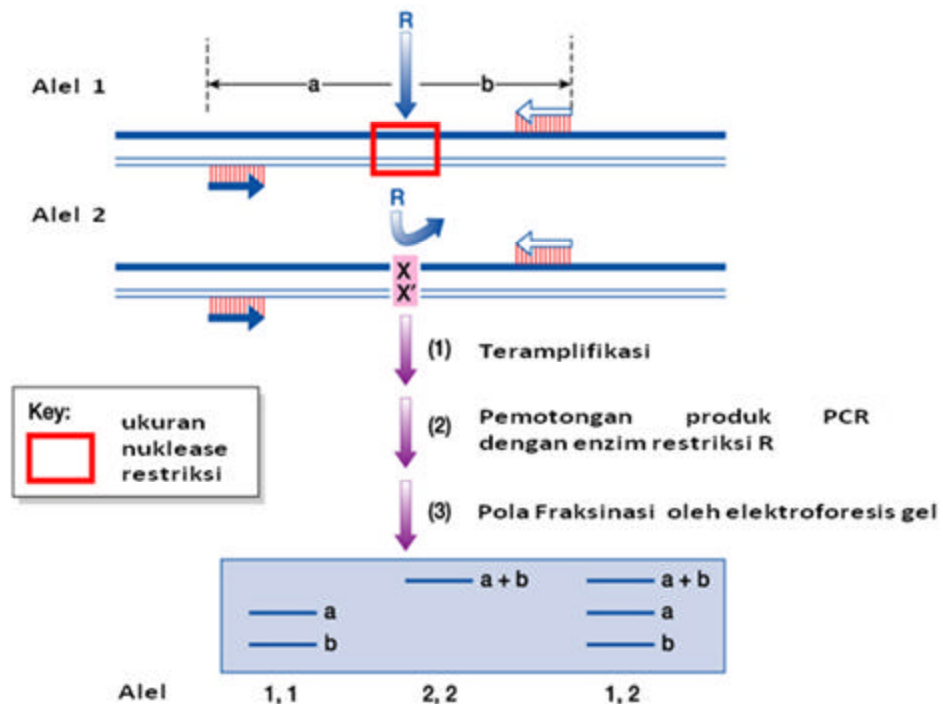
Restriction fragment length polymorphism - Polymerase chain reaction (PCR-RFLP) merupakan teknik yang digunakan untuk merestriksi untai DNA yang telah diamplifikasi oleh mesin PCR dengan menggunakan enzim restriksi. Teknik ini bermanfaat dalam area biomolekuler terutama dalam aplikasi teknik ini adalah pemetaan genom, lokalisasi dari gen penyakit, pengujian azas keturunan, tes sidik jari keturunan, tes garis keturunan dan identifikasi taxonomik antara organisme. Teknik ini didasarkan fragmentasi pada DNA genomik dengan penggunaan enzim restriksi. Dimana terjadi pemotongan fragmen DNA pada urutan pendek yang spesifik. Yang menghasilkan fragmen DNA yang panjang kemudian dipisahkan oleh proses elektroforesis gel agar untuk menghasilkan suatu gambaran berisi profil pita yang dapat digunakan analisa genetik (Llerena and Maciel, 2001).

RFLP-PCR merupakan kedua kombinasi teknik PCR yang kemampuan dipisahkan dengan menggunakan jumlah genomik DNA yang sedikit dan RFLP mempunyai kemampuan untuk membedakan genotypes yang ada atau tidak adanya lokasi pemotongan di dalam DNA yang di amplifikasi (Santoso, et.al., 2003).

Metode RFLP adalah analisis fragmen restriksi secara tidak langsung mendeteksi adanya perbedaan dalam urutan nukleotida molekul-molekul DNA. Dalam melihat hasil metode ini digunakan elektroforesis gel untuk mengetahui karakteristik DNA berdasarkan ukuran fragmen DNA yang dihasilkan dari perlakuan molekul DNA yang panjang dengan pemotongan menggunakan enzim restriksi endonuklease. Enzim yang dipakai berbeda untuk memotong setiap rangkaian DNA (Campbell, 2002).

Modifikasi sederhana metode RFLP-PCR untuk jenis SNP (single nucleotide polymorphisms). Dari informasi tentang jenis SNP diperoleh dari penelitian tentang kumpulan gen penyakit dan menganalisis struktur gen populasinya. Dalam beberapa tahun metode RFLP-PCR merupakan metode yang relatif sederhana dan murah dibandingkan dengan metode lain, seperti pengujian Taqman, reaksi deteksi ligase dan D-HPLC. Tetapi metode asli dari RFLP-PCR mempunyai beberapa keterbatasan, dimana kenyataannya sisi daerah sebagian besar loci SNP tidak mempunyai kecocokan dengan tampak pengenalan restriksi endonuklease (RER).

Metode tersebut diperbaharui dengan mengubah satu atau dua basa pada sekuens yang berdekatan pada SNP dengan primer yang tidak sesuai untuk membentuk tapak RER, tetapi penambahan satu atau dua basa tidak cukup kompeten untuk mengenali sekuens RER, biasanya dengan panjang 4–6 bp. Oleh karena itu, metode ini masih perlu ditingkatkan dan tidak bisa diterapkan untuk kebanyakan jenis SNP dan kadang-kadang lokasi RER hanya dapat dikenali oleh sedikitnya pemotongan endonukleosis. Adapun keuntungan dari RFLP dapat memperoleh sampel DNA yang murah tanpa membutuhkan alat yang khusus (Xiao, et.al., 2006).



Gambar 9: Proses genotyping RFLP (Garland, 2004)

Proses genotyping RFLP tersebut merupakan analisis fragmen restriksi pada urutan molekul DNA yakni membandingkan dua molekul DNA yang berbeda. Kedua molekul DNA homolog yang membawa alel suatu gen yang berbeda. Molekul DNA tersebut memiliki perbedaan pasangan basa tunggal yang menghasilkan alel 2 yang memiliki satu urutan pengenalan (tempat restriksi) untuk enzim restriksi R. Pada alel 1 terdapat ukuran pemotongan produk DNA dengan enzim restriksi R selanjutnya enzim ini memotong alel 2. Setelah elektroforesis gel untuk memisahkan fragmen restriksi yang terbentuk setiap alel. Hasil elektroforesis membentuk pola potongan yang mempunyai perbedaan yang jelas antara kedua alel seperti yang diperlihatkan oleh pita pada gel tersebut.

K. Elektroforesis Gel Agarosa

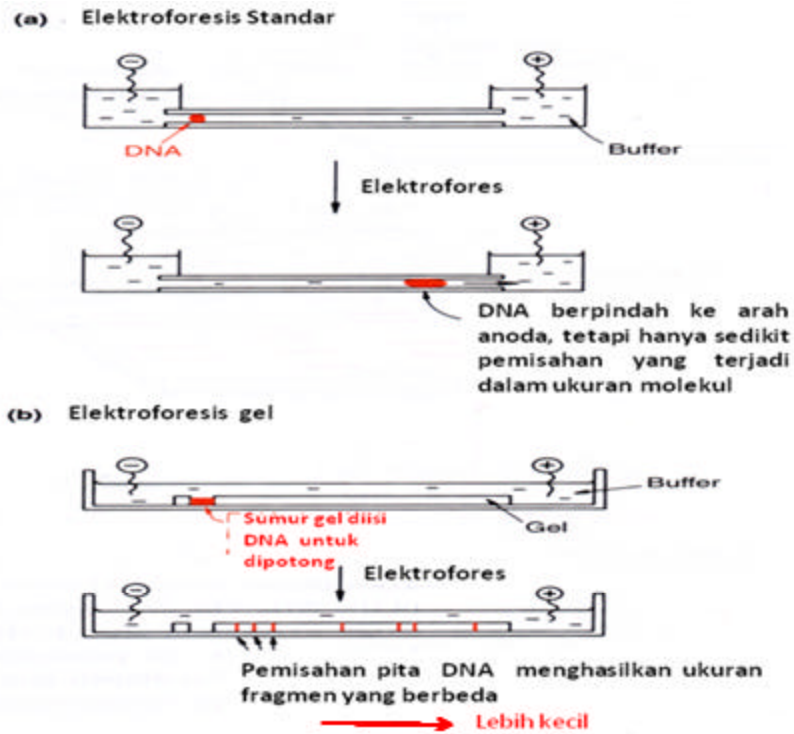
Proses elektroforesis gel merupakan salah satu teknik utama dalam biologi molekular. Pada prinsipnya elektroforesis gel memisahkan makromolekul berdasarkan laju perpindahannya melewati suatu gel di bawah pengaruh medan listrik. Laju perpindahan tersebut bergantung pada ukuran molekul bersangkutan. Campuran DNA, RNA atau protein ditempatkan dalam sumur di dekat satu ujung lempeng tipis gel polimetrik. Gel ini ditahan oleh pelat kaca dan direndam dalam larutan aqueous (dengan pelarut air). Elektroda dilekatkan pada kedua ujung dan diberikan tegangan. Setiap makromolekul kemudian bermigrasi ke arah

elektroda yang bermuatan berlawanan pada laju yang sebagian besar ditentukan oleh muatan dan ukuran molekulnya. Metode ini 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 (Campbell, 2002; Wikipedia, 2006).

Gel yang biasa digunakan adalah polimer bertautan silang (*crosslinked*) yang porositasnya dapat diatur sesuai dengan kebutuhan. Pemisahan asam nukleat yang ukuran molekulnya lebih besar (lebih besar dari beberapa ratus basa), digunakan gel agarosa (dari ekstrak rumput laut) yang sudah dimurnikan.

Dalam proses elektroforesis, sampel DNA ditempatkan ke dalam sumur (*well*) pada gel yang direndam dalam larutan buffer dengan konsentrasi rendah dan dialirkan listrik. Molekul-molekul DNA tersebut akan bergerak di dalam cairan gel ke arah salah satu kutub listrik sesuai dengan muatannya. Untuk asam nukleat, arah pergerakannya adalah menuju elektroda positif disebabkan oleh muatan negatif alami pada rangka gula-fosfat yang dimilikinya dengan muatan negatif. Untuk menjaga agar laju perpindahan asam nukleat benar-benar hanya berdasarkan ukuran atau panjangnya, zat seperti natrium hidroksida atau formamida digunakan untuk menjaga agar asam nukleat berbentuk lurus. Dengan prinsip yang sama protein didenaturasi dengan deterjen

(misalnya natrium dodesil sulfat, SDS) untuk membuat protein tersebut berbentuk lurus dan bermuatan negatif. Setelah proses ini selesai, dilakukan proses pewarnaan (*staining*) agar molekul sampel yang telah terpisah dapat dilihat. Etidium bromida, perak, atau pewarna "biru Coomassie" (*Coomassie blue*) dapat digunakan untuk keperluan ini. Jika molekul sampel berpendar dalam sinar ultraviolet (misalnya setelah "diwarnai" dengan etidium bromida), gel difoto di bawah sinar ultraviolet. 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 (Campbell, 2002; Wikipedia, 2006).



Gambar 10: Diagram prinsip analisis DNA dengan metode elektroforesis (Wikipedia, 2006)

L. Kerangka Konsep

Beberapa hasil penelitian dan teori yang dapat mendukung kerangka teori penelitian dapat dilihat secara berturut-turut sebagai berikut:

1. **Rasmilah, 2001:** Mengemukakan bahwa menurut data WHO 2003 umur penderita demam tifoid yang sering terkena di Indonesia dilaporkan antara 3 – 9 tahun pada 91% kasus.

2. **Karim, 2005:** Ahli A. Pfeifer berhasil menemukan *Salmonella* dalam feses penderita demam tifoid kemudian dalam urin oleh Hueppe dan dalam darah oleh R. Neuhaus s.
3. **Hatta, et.al., 2007:** Mendeteksi *Salmonella typhi* dengan menggunakan kultur darah, tes widal dan Nested-PCR pada darah, urin dan tinja. Hasil menunjukkan bahwa pemeriksaan dengan Nested-PCR pada darah adalah metode yang sensitif untuk mendiagnosa demam tifoid dan PCR pada urin dan feses dapat digunakan untuk tes lengkap.
4. **Hatta, et.al., 2002:** Hasil penelitian diperoleh tes dipstik merupakan uji yang cepat dan mudah digunakan untuk diagnosis demam tifoid serta tidak memerlukan keterampilan khusus yang memiliki sensitivitas dan spesifitas yang lebih tinggi dibanding dengan tes widal. Selain itu membandingkan hasil serologi dipstik terhadap kultur pada rata-rata onset demam 6,6 hari menunjukkan hasil dipstik 76,6% dan hasil kultur 65,9%.
5. **House, dkk., 2001:** Hasil penelitian yang dilakukan di Vietnam dan di Semarang, Indonesia menyatakan bahwa pengujian dipstik untuk deteksi *S. typhi* terutama antibodi IgM dalam serum sampel-sampel darah sebelumnya memiliki sensitivitas serta spesifitas yang tinggi.
6. **Song, et.al., 1993:** Kultur darah hanya dapat mendeteksi 45 – 70% pada pasien dengan demam tifoid tergantung pada jumlah sampel darah, tingkatan bakterimia pada *S. typhi*, tipe medium kultur yang

digunakan dan panjang periode inkubasi. Di Korea, dimana demam tifoid masih sering terjadi tidak dapat ditegakkan diagnosis pada banyak kasus yang diduga (*suspected cases*) berdasarkan diagnosis klinis karena hasil kulturnya negatif.

7. **Sabir, dkk., 2003:** melaporkan sensitifitas dan spesifitas tes dpstik masing-masing sebesar 96,7% dan 85,5% lebih tinggi dibandingkan dengan sensitivitas dan spesifitas dari tes widal yaitu masing-masing sebesar 91,7% dan 84,1%.
8. **Blackwell, et.al., 1995:** melaporkan gen NRAMP-1 menyandi suatu divalen kation pengangkut protein yang dilibatkan dalam kendali replikasi *intraphagosomal* jasad renik dan aktivasi makrofag.
9. **Dunstan, et.al., 2001:** melakukan penelitian di Vietnam Selatan yaitu pemeriksaan downstream gen NRAMP-1 terdapat 4 alel/genotipe single base-pair polymorphisms (274 C/T, 469+14 G/C, 1465-85 G/A dan D543N), (GT)_n sebagai pengulangan bagian promotor dan D2S1471. Gabungan alel tersebut hasilnya tidak teridentifikasi antara alel gen NRAMP-1 dengan suspek demam tifoid dengan menggunakan PCR untuk mendeteksi polimorfisme gen NRAMP-1 yang homolog terhadap manusia yang resistensi pada penderita demam tifoid.
10. **Ngili, et.al., 2003:** Terdapat teknik *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) memiliki beberapa keunggulan yang lebih dibandingkan dengan isozym sebagai penanda molekuler karena

jumlah dari penanda RFLP efektifitasnya tidak terbatas serta memiliki tingkat akurasi yang paling tinggi.

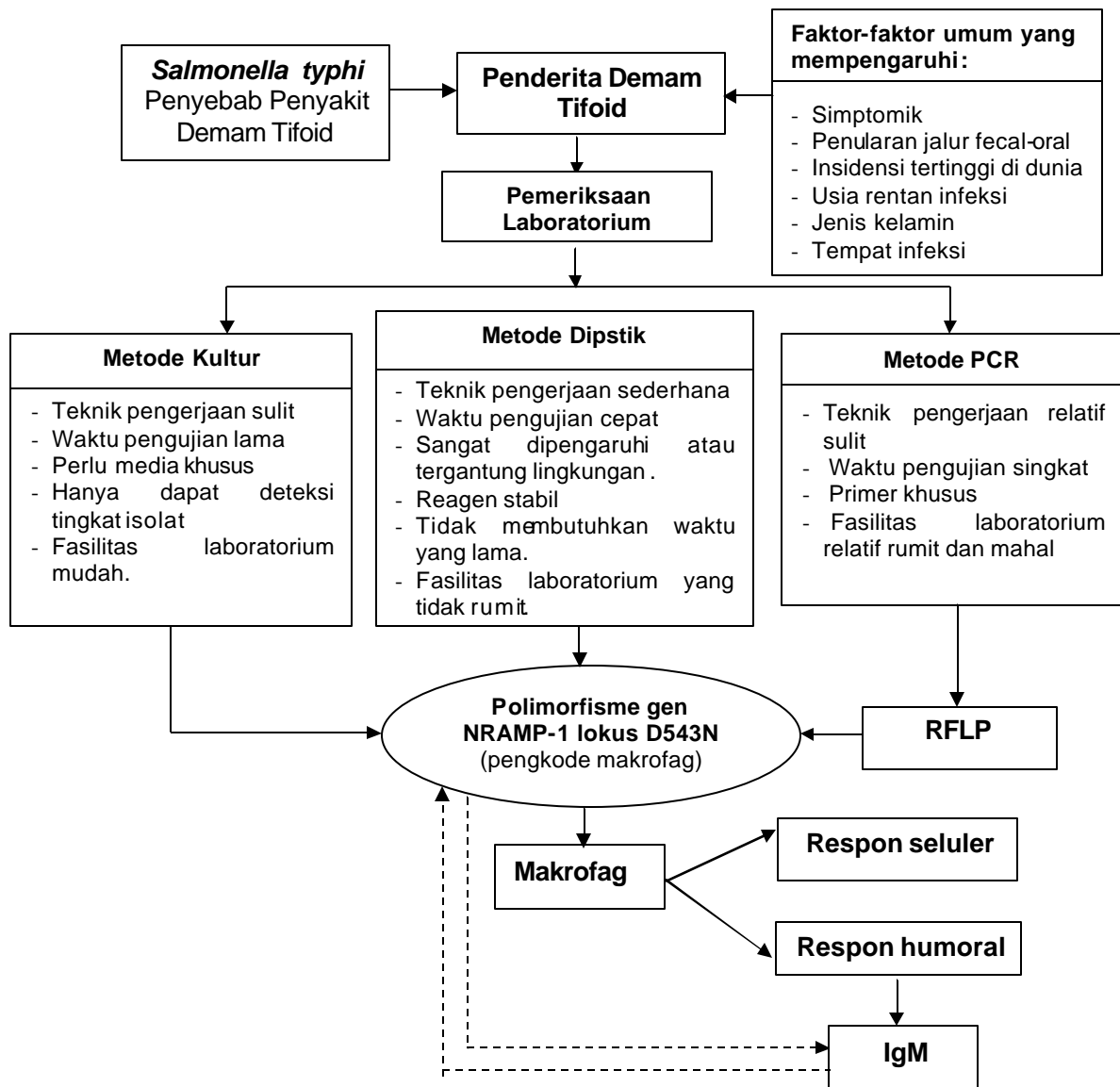
11. **Campbell, et.al., 2000:** Teknik analisis *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) memiliki spesifitas sampai tingkat interspesies karena adanya mutasi pada daerah *non-coding* DNA yang terjadi secara acak sehingga menyebabkan perbedaan tempat pemotongan oleh enzim restriksi tertentu .
12. **Mandar, 2007:** melakukan penelitian polimorfisme gen NRAMP-1 yang menggunakan sampel tuberculosi paru dengan menggunakan metode RFLP-PCR didapatkan hasil yaitu terdapat perbedaan polimorfisme penderita tuberculosi dengan orang normal

Berdasarkan atas kajian referensi ini, kami dapat melakukan abstraksi dan ekstrapolasi yang dapat menjadi dasar dalam menyusun kerangka konseptual sebagai berikut:

Gen NRAMP-1 lokus D543N merupakan salah satu gen spesifik yang menyandi makrofag, gen ini peka terhadap infeksi berbagai agen penyakit seperti demam tifoid. Adapun agen penyakit demam tifoid yaitu bakteri *Salmonella typhi*. Penyakit ini diagnosis dengan metode kultur darah, dipstik dan RFLP-PCR. Metode dipstik untuk mengetahui peningkatan titer antibodi, sedangkan metode RFLP-PCR digunakan untuk dapat melihat polimorfisme gen NRAMP-1 lokus D543N. Prinsip dasar metode RFLP-PCR menggunakan enzim restriksi untuk pemotongan fragmen-fragmen DNA sehingga dapat melihat pola potongan gen ini.

Analisis mutasi gen lokus D543N dapat dihubungkan dengan beberapa penyakit yang berkaitan dengan respon imun yang disebabkan oleh *S. typhi* terhadap penderita demam tifoid di Sulawesi Selatan.

Untuk lebih memudahkan pemahaman terhadap kerangka konsep penelitian ini dapat diterangkan secara skematik sebagai berikut:



Gambar 11: Kerangka konsep penelitian

M. Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah:

1. Ada perbedaan polimorfisme gen NRAMP-1 lokus D543N antara penderita demam tifoid dengan orang normal.
2. Ada hubungan antara titer antibodi dengan mutasi gen NRAMP-1 D543N pada penderita demam tifoid.