

**PERBANDINGAN TES SEROLOGI DRI-DOT
DENGAN TEKNIK
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)
PADA PENDERITA SUSPEK DEMAM TIFOID**

**NIRMAWATI ANGRIA
N121 05 001**



| | |
|-------------|-----------------------|
| Tgl. Terbit | 19-11-09 |
| Asal Data | far mudi |
| Banyak | 1 shg |
| Sarga | Hydris |
| No. Inven | - |
| No. Kios | SKR - F09 ANG P |

**PROGRAM KONSENTRASI
TEKNOLOGI LABORATORIUM KESEHATAN
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2009**



**PERBANDINGAN TES SEROLOGI *DRI-DOT* DENGAN TEKNIK
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)
PADA PENDERITA SUSPEK DEMAM TIFOID**

SKRIPSI

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

**NIRMAWATI ANGRIA
N121 05 001**

**PROGRAM KONSENTRASI
TEKNOLOGI LABORATORIUM KESEHATAN
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2009**

PERBANDINGAN TES SEROLOGI *DRI-DOT* DENGAN TEKNIK
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) PADA PENDERITA
SUSPEK DEMAM TIFOID



NIRMAWATI ANGRIA

N121 05 001

Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama,

Prof.Dr.rer-nat Marianti A.Manggau, Apt.
NIP. 196703191992032002

Pembimbing Pertama,

Prof.DR.Moch.Hatta, PhD
NIP. 131 468 462

Pembimbing Kedua,

dr.Uleng Bahrun, Ph.D, Sp.PK.
NIP. 196805181998022001

Pada Tanggal: November 2009

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur ke hadirat Allah Yang Maha Kuasa atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga penelitian dan penulisan karya akhir yang merupakan syarat untuk mencapai gelar sarjana pada program konsentrasi Teknologi Laboratorium Kesehatan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Dalam kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada: Prof.Dr.rer-nat Marianti A. Manggau, Apt; Prof. Dr. Mochammad Hatta, Sp.MK, MD,Ph.D dan dr.Uleng Bahrn, Ph.D, Sp.PK sebagai pembimbing dan atas bimbingan dan arahnya dalam membantu dalam menyelesaikan penelitian dan penyusunan tugas akhir ini.

Rasa terima kasih juga penulis haturkan kepada Prof.Elly Wahyudin sebagai Dekan Fakultas Farmasi, Drs.Syahrudin Kasim, S.Si, M.Si, Apt sebagai ketua program Konsentrasi Teknologi Laboratorium Fakultas Farmasi, Dra.Aliyah Putranto, MS, Apt sebagai sekretaris konsentrasi Teknologi Laboratorium Kesehatan Fakultas Farmasi, dosen-dosen Fakultas Farmasi beserta seluruh staf atas segala fasilitas yang diberikan selama penulis menempuh studi hingga menyelesaikan penelitian ini.

Terima kasih pada Direktur RS. Bhayangkara Makassar dan Kepala Instalasi Laboratorium RS.Bhayangkara beserta seluruh staf dan analisnya, Direktur RS. Pelamonia Makassar dan Kepala Instalasi

Laboratorium RS. Pelamonia beserta staf dan analisnya, Direktur RSA. Jaury Yusuf dan Kepala Instalasi Laboratorium beserta seluruh staf dan analisnya dan Kepala Laboratorium Imunologi dan Biologi Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf yang telah banyak membantu selama penelitian berlangsung.

Terimakasih yang setinggi-tingginya kepada pihak-pihak yang membantu dalam penyelesaian penelitian dan penyusunan karya ilmiah :

1. Kepada Andi Asniati dan Hasmawati teman se-tim dalam penelitian dan penyusunan karya akhir ini .
2. Kepada sahabat-sahabatku Desy Kusumayati, A.tenri Silfa Sari Atma, dan A. Sri Yuliani Rani, atas kekompakan dan kebersamaannya selama ini.
3. Kepada Khaedir Ali, terimakasih atas perhatian, motivasi dan semangatnya, setia mendengar keluh kesahku selama studi dan penyusunan karya akhir ini.
4. Teman-teman seangkatan Serum'05, terkhusus untuk A. Ayu Marisa Sari , A.Maya Kesrianti, Hasmawati, Nurul Hidayah, Sri Wahyuni Azis, A. Tenri Commeng, A. Yuli Rochma, Hafsah, Dian Sadriah, dan Yusran Yunus. Kepada Adik-adik TLK Virus 06, Spoit 07, dan kakak-kakak D3 07.
5. Kepada teman-teman di Nurul Eski (Eka Fatmasari, Andriani, Musfira, Indri Pratiwi, Wahdaniah, Rahmadani, Hutbayanti, Fitriah, Asrini, Hardianti, dan Inci)

6. Kepada Andi Haryadi , Yulvina, Wida, Sukma, Fahrullah, Ikhsan, Andita dan Andira.

Kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang secara langsung maupun tidak langsung telah memberikan bantuan moril maupun materil, tak lupa penulis sampaikan terima kasih.

Rasa hormat, penghargaan dan terima kasih yang tak terhingga penulis haturkan kepada ayahanda tercinta Mapped.K, S.Sos dan ibunda tercinta Hj. St. Nurhayati, S.Pd , adinda Rahmat Attaufiq, adinda Nur Agung dan seluruh keluarga atas doa restu, dukungan dan semangat yang ditanamkan dalam menuntut ilmu untuk senantiasa bertakwa kepada Allah SWT.

Penulis menyadari sepenuhnya atas kekurangan dan keterbatasan mulai dari awal penelitian sampai penulisan karya akhir ini, untuk itu semua saran dan kritikan dalam penyempurnaannya akan penulis terima dengan segala kerendahan hati. Semoga karya akhir ini dapat bermanfaat bagi kita semua dan kiranya Allah SWT senantiasa memberkati dan melindungi setiap langkah dan pengabdian kita, Amin.

Akhirnya perkenankan penulis memohon maaf atas segala kekhilafan dan kesalahan selama pendidikan sampai selesainya karya akhir ini.

Makassar, Juni 2009

Nirmawati Angria

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian mengenai perbandingan tes serologi *dri-dot* dengan teknik PCR pada penderita suspek demam tifoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sensitivitas dan spesifitas tes serologi *Dri-dot* terhadap PCR berdasarkan jenis kelamin, usia, lama demam dan suhu demam dalam mendiagnosa demam tifoid. Subjek penelitian adalah penderita yang telah menjalani pemeriksaan fisik dan dinyatakan sebagai suspek demam tifoid. Jumlah sampel yang diuji adalah 30 sampel. Sampel yang digunakan adalah darah vena yang diambil dari penderita suspek demam tifoid kemudian disentrifus untuk mendapatkan serumnya, serum digunakan untuk mendeteksi antibodi IgM spesifik *Salmonella typhi* dengan menggunakan tes serologi *dri-dot* dan endapannya digunakan untuk mendeteksi DNA kuman *Salmonella typhi* dengan teknik PCR. Analisis data menunjukkan bahwa pada tes serologi *Dri-dot* ditemukan persentase tertinggi hasil positif pada penderita berusia 11-20 tahun (39%) dengan lama demam < 7 hari (83,33 %) dan suhu demam $\geq 38^{\circ}\text{C}$ (83,33%). Sedangkan pada tes PCR ditemukan persentase tertinggi hasil positif pada penderita dengan jenis kelamin laki-laki (54 %), usia 11-20 tahun (32%), dengan lama demam < 7 hari (88%) dan suhu demam $\geq 38^{\circ}\text{C}$ (68%). Tes serologi *dri-dot* mempunyai sensitivitas dan spesifitas *dri-dot* terhadap PCR berturut-turut 68% dan 80% terhadap PCR.

ABSTRACT

A study comparison of *dri-dot* serology test and PCR has been done in suspect typhoid fever patient. The aim of this study is to find out the sensitivity and specificity of *dri-dot* serology compare to PCR based on sex, age, period of fever and body temperature in diagnosing typhoid fever. The subject of study is the patient who has under taken a physical examination and they are diagnosed as typhoid fever suspect. The number of tested samples are 30 samples. Sample used is venous blood taken from people with typhoid fever suspect, then centrifuged to obtain the serum, the serum is used for detecting *Salmonella typhi* specific IgM antibody by *dri-dot* serology test and its used for detecting DNA of microbe of *Salmonella typhi* with PCR technical. The data analysis shows that in *dri-dot* serology is found the highest positive result percentage to the sufferer in 11 – 20 years of age (39%) with fever period <7 days (83.33%) and fever temperature 7.83°C (83.33%). While in PCR test is found the highest positive result to sufferer from man (54%), 11 – 20 years of age (32%) with fever period is < 7 days (88%) and fever temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$ (68%). *Dri-dot* serology test has sensitivity of 68% and specificity of 80% .

DAFTAR ISI

| | halaman |
|--|---------|
| UCAPAN TERIMAKASIH..... | iv |
| ABSTRAK | vii |
| ABSTRACT..... | viii |
| DAFTAR ISI..... | ix |
| DAFTAR TABEL..... | xii |
| DAFTAR GAMBAR..... | xiii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiv |
| DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN | xv |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | 4 |
| II.1 Demam Tifoid..... | 4 |
| II.2 Morfologi dan Klasifikasi <i>Salmonella</i> | 5 |
| II.3 Struktur Antigen <i>Salmonella Typhi</i> | 6 |
| II.4.Patogenesis dan Patologi Demam tifoid | 9 |
| II.5 Manifestasi Klinik | 12 |
| II.6 Diagnosis..... | 13 |
| II.7 Tes Laboratorium..... | 14 |
| II.7.1 Pemeriksaan Darah tepi | 15 |

| | |
|--|-----------|
| II.7.2 Tes Kultur..... | 15 |
| II.7.3 Tes Serologi | 17 |
| II.7.4 Teknik PCR | 25 |
| II.7.4.1 Prinsip kerja PCR..... | 27 |
| II.7.4.2 Elektroforesis..... | 29 |
| II.8 Spesifisitas dan Sensitivitas | 31 |
| BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN | 33 |
| III.1 Desain penelitian | 33 |
| III.2 Tempat dan waktu penelitian | 33 |
| III.3 Populasi penelitian..... | 33 |
| III.4 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel | 34 |
| III.5 Kriteria Sampel | 34 |
| III.6 Ijin Subyek Penelitian | 34 |
| III.7 Kerangka Konsep | 35 |
| III.8 Definisi Operasional..... | 36 |
| III.9 Alat dan Bahan..... | 37 |
| III.10 Prosedur Kerja. | 38 |
| III.11 Pembacaan Hasil..... | 42 |
| III.12 Analisis Data..... | 43 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN | 44 |
| IV.1 Hasil Penelitian..... | 44 |

| | |
|----------------------------------|----|
| IV.2 Perhitungan | 48 |
| IV.2 Pembahasan..... | 50 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN | 55 |
| V.1 Kesimpulan | 55 |
| V.2 Saran | 55 |
| DAFTAR PUSTAKA | 56 |
| LAMPIRAN | 59 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | halaman |
|--|---------|
| 1. Karakteristik Subjek penelitian berdasarkan jenis kelamin, umur, lama demam dan suhu demam..... | 44 |
| 2. Perbandingan hasil serologi Dri-dot dan PCR | 46 |
| 3. Persentase Hasil Positif Serologi <i>Dri-dot</i> Pada Suspek Demam Tifoid Berdasarkan Karakteristik Jenis Kelamin, Umur, Lama demam dan Suhu deman..... | 46 |
| 4. Persentase Hasil Positif Serologi PCR Pada Suspek Demam Tifoid Berdasarkan Karakteristik Jenis Kelamin, Umur, Lama demam dan Suhu deman..... | 47 |
| 5. Sensitivitas, Spesifisitas, Nilai Prediksi Positif dan Nilai Prediksi Negatif Tes Serologis Dri-dot terhadap PCR pada Suspek Demam Tifoid | 49 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | halaman |
|---|---------|
| 1. Struktur anatomi famili <i>enterobacteriaceae</i> | 8 |
| 2. Patogenesis Infeksi Demam Tifoid | 10 |
| 3. Respon Imunitas | 12 |
| 4. Mekanisme Kerja PCR | 28 |
| 5. Proses elektroforesis DNA pada Media agarose | 31 |
| 6. Hasil Tes Serologi Dri-dot | 42 |
| 7. Hasil elektroforesis tampak pita pada posisi 343 bp dengan nPCR M=Marker; S1-S12 = sampel Suspek DT ; S7 = sampel negative ; N = control negative;P=control positif;BL=blanko..... | 45 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | halaman |
|--|---------|
| 1. Skema Alur Penelitian | 59 |
| 2. Skema Kerja tes serologi dri-dot..... | 60 |
| 3. Skema Kerja Ekstraksi Salmonella typhi dengan metode Boom..... | 61 |
| 4. Skema Kerja Deteksi DNA Salmonella typhi dengan teknik nPCR..... | 62 |
| 5. Hasil Pemeriksaan Dri-dot dan PCR pada penderita suspek demam tifoid | 63 |

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

| Lambang/singkatan | Arti |
|-------------------|----------------------------------|
| Ab | Antibodi |
| Ag | Antigen |
| bp | base pairs |
| C | Citosin |
| DNA | Deoxribonuleic Acid |
| dNTP | denucleotidetriphosphat |
| Dot EIA | Dot Enzim Immunoassay |
| dsDNA | double stranded DNA |
| DT | Demam Tifoid |
| ELISA | Enzym Linked Immunosorbent Assay |
| HSP | Heat Shock Protein |
| ICT | Imunochromatografi |
| Ig | Imunoglobulin |
| IL 1 | Inter Leukin 1 |
| LPS | Lipopolisakarida |
| mRNA | Massenger Ribonucleic Acid |
| nPCR | nested PCR |
| OMP | Outer Membrane Protein |
| PCR | Polimerase Chain Reaction |
| RNA | Ribonucleic Acid |

| | |
|---------------------|-----------------------------|
| <i>S. paratyphi</i> | <i>Salmonella paratyphi</i> |
| <i>S. typhi</i> | <i>Salmonella typhi</i> |
| <i>S. Muenchen</i> | <i>Salmonella Muenchen</i> |
| sDT | suspek DT |
| <i>Typhoid F</i> | Typhoid Fever |
| UV | ultra violet |
| Vi | Virulens |

BAB I PENDAHULUAN

Diagnosis demam tifoid sukar ditegakkan hanya atas dasar beberapa gejala klinis, sebab gambaran klinis penyakit ini sangat bervariasi dan umumnya tidak khas untuk demam tifoid. Atas dasar ini, peranan laboratorium dalam membantu menegakkan diagnosis demam tifoid sangat penting (1).

Cara yang terbaik untuk memastikan adanya infeksi dengan *Salmonella typhi*, yaitu bila dapat diisolasi kuman tersebut dari spesimen klinis yang berasal dari penderita yang dicurigai menderita demam tifoid, namun hal ini tak selalu dapat dicapai karena banyaknya faktor kesalahan yang dapat mempengaruhi isolasi kuman tersebut. Oleh karena itu, imunoassai untuk demam tifoid memegang peranan penting (1).

Pemeriksaan serologi yang banyak digunakan saat ini yaitu uji widal, tubex TF, dan yang terbaru dikembangkan adalah *lateks aglutinasi* untuk diagnosis serologi demam tifoid dengan menggunakan teknik *dri-dot*. Teknik ini dikembangkan oleh *Royal Tropical Institute* di Amsterdam sebagai tes skrining yang cepat untuk demam tifoid (2).

Dri-dot untuk demam tifoid adalah tes serologi sederhana untuk mendeteksi antibodi yang spesifik terhadap *Salmonella typhi* dalam serum manusia. *Dri-dot* mengandung partikel-partikel lateks berwarna yang diaktifasi dengan preparat antigen yang diambil dari *Salmonella typhi* yang dikeringkan pada kartu aglutinasi. *Dri-dot* memiliki banyak keuntungan

dibandingkan tes serologi lainnya antara lain : tes ini mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, alatnya sederhana, volume sampel yang digunakan hanya 10 µl, bahan-bahannya sangat stabil dan dapat disimpan dalam suhu ruangan. Selain itu, tes ini relatif murah dan tidak membutuhkan keahlian khusus serta tidak diperlukan peralatan listrik. Keuntungan-keuntungan tersebut membuat tes *dri-dot* ideal sebagai suatu *point of care* tes diagnostik demam tifoid (3).

Akhir-akhir ini telah dikembangkan teknik diagnostik biomolekuler, yaitu *Polimerase Chain Reaction* (PCR), yang diharapkan dapat membantu mengatasi masalah kesehatan secara global, terutama dalam bidang diagnosis yang sulit diatasi dengan pemeriksaan mikrobiologi konvensional (4). PCR adalah suatu teknik amplifikasi fragmen genetik (DNA atau RNA) secara invitro, yang dalam prosesnya melibatkan beberapa rangkaian siklus yang berulang-ulang, masing-masing siklus terdiri dari 3 macam reaksi berurutan yaitu: *denaturasi* (pemecahan), *annealing* (penempelan), *polimerisasi* (pemanjangan) dalam suatu alat semi otomatis, yang dalam waktu beberapa jam saja dapat mengadakan satu rantai DNA atau RNA menjadi jutaan(4). Namun teknik ini mempunyai berbagai keterbatasan baik dalam teknik pemeriksaan yang harus membutuhkan tenaga dan ruangan khusus, serta fasilitas pemeriksaan yang masih relatif mahal.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka akan dilakukan penelitian dengan rumusan masalah sebagai berikut :

"Seberapa besar sensitivitas dan spesifisitas yang dimiliki oleh tes serologi *dri-dot* jika dibandingkan dengan teknik *Polimerase Chain Reaction* (PCR)?"

Manfaat dilakukan penelitian ini yaitu untuk menambah informasi ilmiah tentang nilai sensitivitas dan spesifisitas tes serologi *dri-dot* dibandingkan dengan teknik *Polimerase Chain Reaction* (PCR) sebagai pengembangan ilmu laboratorium kesehatan dan dapat menjadi pegangan dokter yang menangani penderita demam tifoid dalam memilih tes yang diperlukan sesuai kebutuhan.

Penelitian ini bertujuan untuk menilai sensitivitas dan spesifisitas tes serologi *dri-dot* dan *Polimerase Chain Reaction* (PCR) berdasarkan umur, jenis kelamin, lama demam dan suhu demam.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Demam Tifoid (DT)

Demam tifoid merupakan penyakit infeksi akut pada usus halus dengan gejala demam satu minggu atau lebih disertai gangguan pada saluran pencernaan dengan atau tanpa gangguan kesadaran (5).

Penyakit ini disebabkan oleh *Salmonella typhi* dan hanya didapatkan pada manusia. Penularan penyakit ini hampir selalu terjadi melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi (6).

Demam tifoid merupakan permasalahan kesehatan global yang penting di seluruh dunia dan harus mendapat perhatian khusus terutama di negara berkembang dengan kondisi sanitasi yang jelek. Di seluruh dunia diperkirakan 13 – 17 juta penderita Demam Tifoid pertahun dengan angka kematian mencapai 600.000 jiwa (3,7). Di Indonesia Demam Tifoid merupakan masalah kesehatan masyarakat yang berkaitan dengan sanitasi lingkungan yang buruk dan termasuk penyakit endemik dengan prevalensi 350-810/ 100.000 penduduk dan jumlah kematian lebih dari 20.000/tahun. Jumlah kasus demam tifoid yang dilaporkan oleh Departemen Kesehatan Republik Indonesia hingga akhir tahun 2005 tercatat sebanyak 25.270 kasus. Jumlah ini tentunya belum dapat menggambarkan jumlah kasus demam tifoid secara menyeluruh di Indonesia, namun demikian selalu tercatat peningkatan jumlah kasus dari tahun ke tahun. Hal ini menunjukkan bahwa permasalahan demam tifoid

tidak mudah untuk diselesaikan meskipun kuman penyebab demam tifoid telah berhasil diidentifikasi (8).

Klasifikasi kasus demam tifoid (3) :

- a. *Confirmed case of typhoid fever* : pasien dengan demam (38° C atau lebih) yang berlangsung ≥ 3 hari, dan dikonfirmasi oleh tes laboratorium kultur positif *S. Typhi*.
- b. *Probable case of typhoid fever* : pasien dengan demam (38° C atau lebih) yang berlangsung ≥ 3 hari, dan dikonfirmasi oleh tes laboratorium serodiagnosis positif atau deteksi antigen tanpa isolasi *S. Typhi*.
- c. *Chronic carrier* : Ekskresi kuman *S. Typhi* di urin atau feses (atau diulang dengan kultur empedu atau usus duodenal tetap positif) selama lebih dari 1 tahun setelah terjangkit demam tifoid akut.

II.2. Morfologi dan Klasifikasi *Salmonella Typhi*

Genus *Salmonella* lebih kompleks dan terdiri dari bermacam-macam grup. *Salmonella* mempunyai spesies paling banyak dan tipe antigen lebih dari 1.500, oleh karena itu klasifikasi *Salmonella* didasarkan pada susunan antigennya (9). *Salmonella* adalah salah satu spesies dari famili *Enterobacteriaceae* mempunyai 4 macam antigen (10).

Salmonella typhi berbentuk batang pendek gemuk dengan diameter 0,5-0,8 mikron dan panjang 1-3 mikron. Bergerak dengan flagella peritrika tidak berselubung, tidak berspora dan gram negatif (11).

Ada tiga spesies utama Salmonella yaitu *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis*, dan *Salmonella enteritidis*. Infeksi Salmonella mencakup satu dari tiga jenis utama ini : demam enteric, bakteremia, atau gastroenteritis. Demam tifoid adalah prototip demam enterik berat dan secara klasik diasosiasikan dengan *Salmonella typhi*. Demam paratifoid adalah bentuk demam enterik yang lebih ringan, paling sering disebabkan *S. enteritidis var paratyphi A* atau *B* (12).

II.3. Struktur Antigen *Salmonella Typhi* (1)

Salmonella merupakan kuman berbentuk batang gram negatif yang umumnya bergerak dengan flagella dan bersifat aerobik. Salmonella memiliki sedikitnya 5 macam antigen.

1. Antigen O (Antigen somatik), yang terletak pada lapisan luar dari tubuh kuman . Bagian ini mempunyai struktur kimia lipopolisakarida atau disebut juga endotoksin. Antigen ini tahan terhadap panas dan alkohol tetapi tidak tahan terhadap formaldehid. Lipopolisakarida dari anrigen o terdiri dari 3 regio sebagai berikut :
 - a. Regio I, mengandung antigen O spesifik atau antigen dinding sel dan merupakan polimer dari unit oligosakarida yang berulang-ulang. Antigen O ini berguna untuk pengelompokan serologis.
 - b. Regio II, terikat pada antigen O dan terdiri dari *core polysaccharide* serta merupakan sifat yang konstan dalam suatu genus *Enterobacteriaceae* perbedaan antara *gen*.

- c. Regio III, mengandung lipid A yang terikat pada *core polysaccharide* yang merupakan bagian yang toksik dari molekul. Lipid A ini menempelkan lipopolisakarida pada membran permukaan sel (*outer membrane*).
2. Antigen H (Antigen Flagela), yang terletak pada flagela, fimbriae atau pili dari kuman. Antigen ini mempunyai struktur kimia suatu protein dan tahan terhadap formaldehid tetapi tidak tahan terhadap panas dan alkohol.
 3. Antigen Vi, yang terletak pada kapsel (envelope) dari kuman yang dapat melindungi kuman terhadap fagositosis. Ketiga macam antigen tersebut ciri atas, di dalam tubuh penderita akan menimbulkan pula pembentukan 3 macam antibodi yang lazim disebut aglutinin.
 4. *Outer Membrane Protein (OMP)*

Antigen OMP *S. typhi* merupakan fragmen dari dinding sel yang terletak di luar membran sitoplasma dan lapisan peptidoglikan yang membatasi sel terhadap lingkungan sekitarnya. OMP berfungsi sebagai barier fisik yang mengendalikan masuknya zat dan cairan ke dalam membran sitoplasma. Di samping itu OMP juga berfungsi sebagai reseptor untuk bakteriofag dan bakteriosin.

OMP dibagi menjadi 2 bagian ;

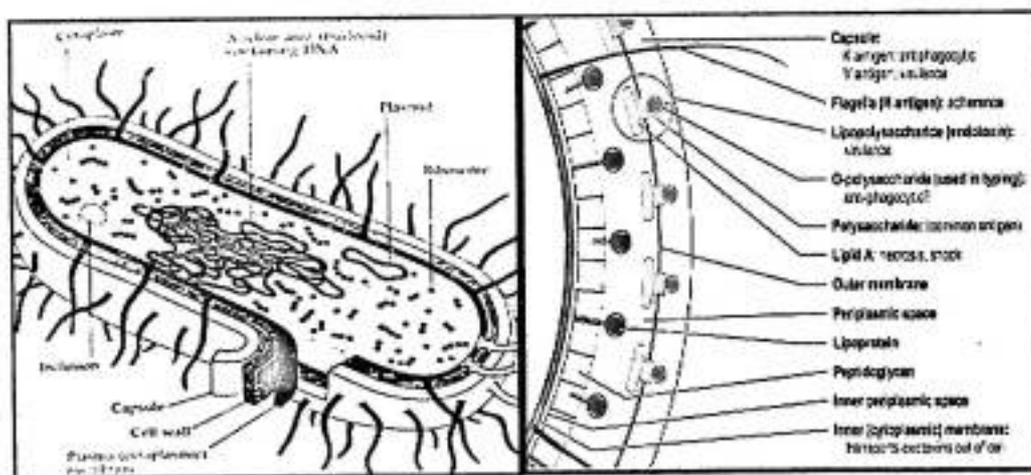
- a. Porin merupakan komponen utama dari OMP terdiri dari protein Omp C, Omp D, dan Omp E. Porin merupakan saluran hidrofitik yang berfungsi untuk difusi solut dengan berat molekul lebih kecil

dari 6000. Porin mempunyai sifat resisten terhadap proteolisis dan denaturasi pada suhu di bawah 85-100°C .

- b. Protein non porin terdiri dari protein Omp A, protein A, dan lipoprotein, mempunyai sifat sensitif terhadap protease. Fungsi dari protein nonporin masih belum diketahui dengan jelas.

5. Heat Shock Protein (HSP)

Heat Shock protein atau *stress protein* adalah protein yang diproduksi oleh jasad renik dalam lingkungan yang terus berubah, terutama yang menimbulkan stress pada jasad renik tersebut dalam usahanya untuk dapat mempertahankan hidupnya. Di samping potensi biologisnya, HSP mempunyai data imunogenik yang cukup besar sehingga dapat membangkitkan respons imun, baik seluler maupun humoral, baik protektif maupun nonprotektif. Atas dasar ini, maka HSP dapat dipakai baik untuk keperluan diagnostik (sebagai antigen dari immunoasai) maupun untuk keperluan preventif (untuk vaksin).



Gambar 1. Struktur anatomi famili *enterobacteriaceae* (Sumber : Bahrn, U. *Diagnosis Demam Tifoid dengan Tes Anti-Salmonella typhi IgM*. Disampaikan dalam Simposium Prodia. Makassar. 2009)

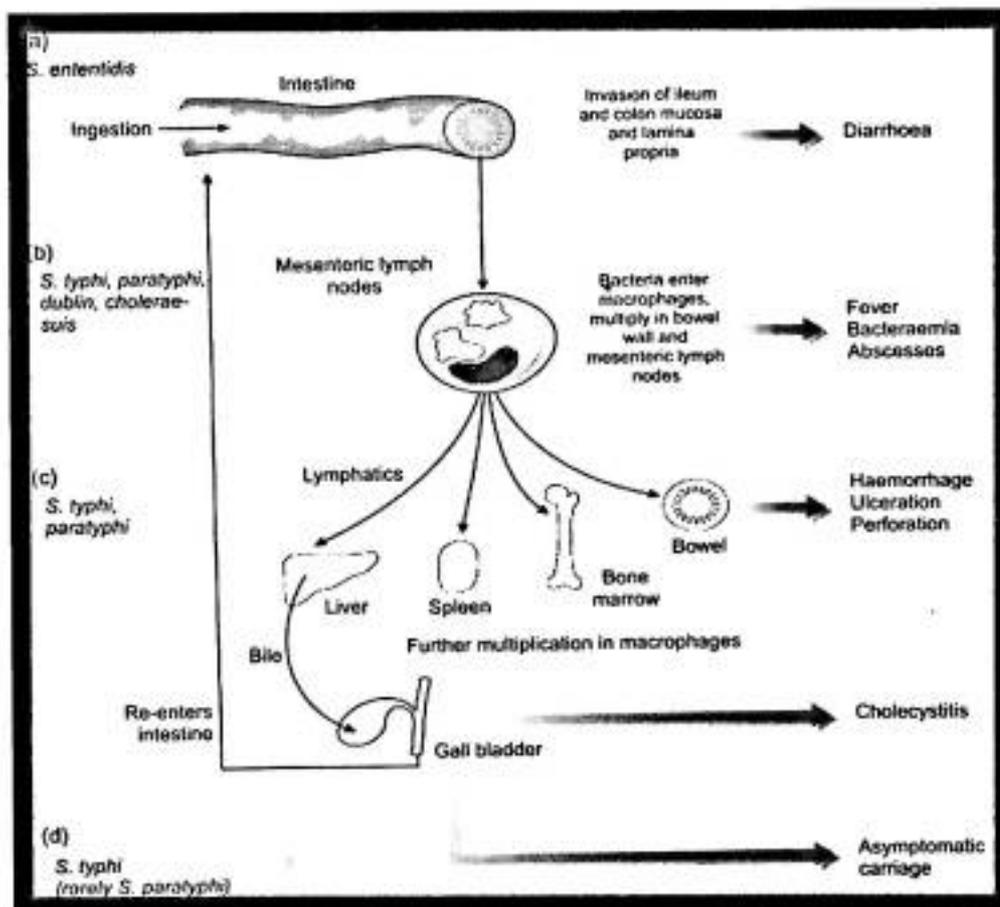
II.4 Patogenesis dan Patologi Demam Tifoid

Masuknya kuman *Salmonella thypi* ke dalam tubuh manusia terjadi melalui makanan yang sebagian. Sebagian kuman dimusnahkan dalam lambung, sebagian lolos masuk ke dalam usus dan selanjutnya berkembang biak. Bila respons imunitas humoral mukosa (IgA) usus kurang baik maka kuman akan menembus sel-sel epitel (terutama sel-M). Kuman dapat hidup dan berkembang biak di dalam makrofag dan selanjutnya dibawa ke *plaque Peyer* ileum distal dan kemudian ke kelenjar getah bening mesenterika. Selanjutnya melalui duktus torasikus kuman yang terdapat di dalam makrofag ini masuk ke dalam sirkulasi darah (mengakibatkan bakteremia pertama yang asimptomatik) dan menyebar ke seluruh organ retikuloendotelial tubuh terutama hati dan limpa. Di organ-organ ini kuman meninggalkan sel-sel fagosit dan kemudian berkembang biak di luar sel atau sinusoid dan selanjutnya masuk ke dalam sirkulasi darah lagi dan mengakibatkan bakteremia yang kedua kalinya dengan disertai tanda-tanda dan gejala penyakit infeksi sistemik (14).

Di dalam hati, kuman masuk ke dalam kantung empedu, berkembang biak, dan bersama cairan empedu diekskresikan secara "*intermittent*" ke dalam lumen usus. Sebagian kuman dikeluarkan melalui feses dan sebagian masuk lagi ke dalam sirkulasi setelah menembus usus. Proses yang sama terulang kembali, berhubung makrofag telah teraktivasi dan hiperaktif maka saat fagositosis kuman *Salmonella* terjadi pelepasan

beberapa mediator inflamasi yang selanjutnya akan menimbulkan gejala reaksi inflamasi sistemik seperti demam, malaise, mialgia, sakit kepala, sakit perut, instabilitas vaskular, gangguan mental dan koagulasi (14).

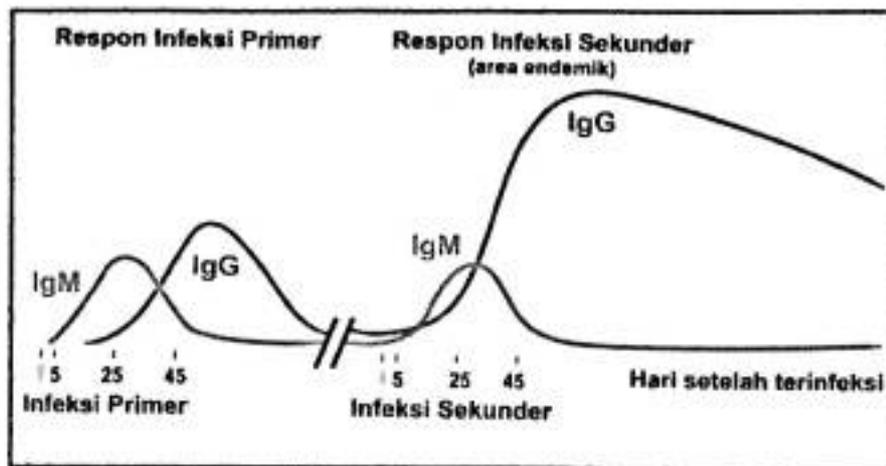
Di dalam *plaque Peyer* makrofag hiperaktif menimbulkan reaksi hiperlasia jaringan (*S.typhi* intra makrofag menginduksi reaksi hipersensitivitas tipe lambat, hiperplasia jaringan dan nekrosis organ). Perdarahan saluran cerna dapat terjadi akibat erosi pembuluh darah sekitar *plaque Peyer* yang sedang mengalami nekrosis dan hiperplasia akibat akumulasi sel-sel mononuklear di dinding usus.



Gambar 2. Patogenesis Infeksi Demam Tifoid (Sumber : Bahrun, U. *Diagnosis Demam Tifoid dengan Tes Anti-Salmonella typhi IgM*. Disampaikan dalam Simposium Prodia. Makassar, 2009)

Proses patologi jaringan limfoid dapat berkembang hingga ke lapisan otot, serosa usus dan dapat mengakibatkan perforasi. Demam tifoid disebabkan oleh *Salmonella typhi* dan endotoksinya yang merangsang sintesis dan pelepasan zat pirogen oleh leukosit pada jaringan yang meradang. Selanjutnya zat pirogen yang beredar di darah mempengaruhi pusat termoregulator di hipotalamus yang mengakibatkan timbulnya gejala demam. Endotoksin akan menempel di reseptor sel endotel kapiler dengan akibat timbulnya komplikasi timbulnya seperti gangguan neuropsikiatrik, kardiovaskuler, pernapasan, dan gangguan organ lainnya. Peran endotoksin dalam patogenesis demam tifoid tidak jelas, hal tersebut terbukti dengan tidak terdeteksinya endotoksin dalam sirkulasi penderita melalui pemeriksaan. Diduga endotoksin dari *Salmonella typhi* menstimulasi makrofag di dalam hati, limpa, folikel limfoma usus halus dan kelenjar limfe mesentrika untuk memproduksi sitokin dan zat-zat lain. Produk dari makrofag inilah yang dapat menimbulkan nekrosis sel, sistem vaskular yang tidak stabil, demam, depresi sumsum tulang, kelainan pada darah dan juga menstimulasi sistem imunologis (6,15).

Pada demam tifoid terjadi respon humoral maupun seluler, baik ditingkat lokal (gastrointestinal) maupun sistemik. Akan tetapi, bagaimana mekanisme ini dalam menimbulkan kekebalan ataupun eliminasi terhadap *Salmonella typhi* tidak diketahui dengan pasti. Diperkirakan bahwa imunitas selular lebih berperan (6).



Gambar 3. Respon Imunitas pada DT (Sumber : Bahrun, U. *Diagnosis Demam Tifoid dengan Tes Anti-Salmonella typhi IgM*. Disampaikan dalam Simposium Prodia, Makassar, 2009)

II.5 Manifestasi Klinik

Masa tunas demam tifoid berlangsung 10-14 hari. Gejala-gejala klinis yang timbul sangat bervariasi dari ringan sampai berat dan asimtomatik. Perbedaan ini tidak saja antara berbagai bagian dunia, tetapi juga di daerah yang sama dari waktu ke waktu. Selain itu, gambaran penyakit bervariasi dari penyakit ringan yang tidak terdiagnosis, sampai gambaran penyakit yang khas disertai komplikasi dan kematian. Hal ini menyebabkan bahwa seorang ahli yang sudah sangat berpengalaman pun dapat mengalami kesulitan untuk membuat diagnosis klinis demam tifoid (13,16).

Dalam minggu pertama, keluhan dan gejala serupa dan gejala serupa dengan penyakit infeksi akut pada umumnya, yaitu demam, nyeri kepala, pusing, nyeri otot, anoreksia, mual, muntah, obstipasi atau diare,

- a. Isolasi kuman penyebabnya *Salmonella typhi* dari spesimen klinis seperti darah, sumsum tulang, urine, tinja, dan cairan duodenum.
- b. Imunoassai untuk melacak kenaikan kadar antibodi terhadap antigen *Salmonella typhi* dan menentukan adanya antigen spesifik dari *Salmonella typhi*.
- c. Uji *Polimerase Chain Reaction* (PCR) untuk melacak DNA spesifik dari *Salmonella typhi*.

Cara yang terbaik untuk memastikan adanya infeksi dengan *Salmonella typhi*, yaitu bila dapat diisolasi kuman tersebut dari spesimen klinis yang berasal dari penderita yang dicurigai menderita demam tifoid, namun hal ini tak selalu dapat dicapai karena banyaknya faktor kesalahan yang bisa terjadi. Dalam hal ini imunoassai dan PCR untuk demam tifoid memegang peranan yang penting.

II.7 Tes laboratorium (17)

Pemeriksaan laboratorium untuk membantu menegakkan diagnosis demam tifoid dibagi dalam empat kelompok, yaitu :

1. Pemeriksaan darah tepi
2. Pemeriksaan bakteriologis dengan isolasi dan biakan kuman
3. Tes serologis, dan
4. Pemeriksaan kuman secara molekuler dengan PCR

II.7.1 Pemeriksaan darah tepi (18)

Pada penderita demam tifoid bisa didapatkan anemia, jumlah leukosit normal, bisa menurun atau meningkat, mungkin didapatkan

trombositopenia dan hitung jenis biasanya normal atau sedikit bergeser ke kiri, mungkin didapatkan aneosinofilia dan limfositosis relatif, terutama pada fase lanjut. Penelitian oleh beberapa ilmuwan mendapatkan bahwa hitung jumlah dan jenis leukosit serta laju endap darah tidak mempunyai nilai sensitivitas, spesifisitas dan nilai ramal yang cukup tinggi untuk dipakai dalam membedakan antara penderita demam tifoid atau bukan, akan tetapi adanya leukopenia dan limfositosis relatif menjadi dugaan kuat diagnosis demam tifoid.

II.7.2 Tes Kultur (18)

Diagnosis pasti demam tifoid dapat ditegakkan bila ditemukan bakteri *S. typhi* dalam biakan dari darah, urine, feses, sumsum tulang, cairan duodenum atau dari rose spots. Berkaitan dengan patogenesis penyakit, maka bakteri akan lebih mudah ditemukan dalam darah dan sumsum tulang pada awal penyakit, sedangkan pada stadium berikutnya di dalam urine dan feses.

Hasil biakan yang positif memastikan demam tifoid akan tetapi hasil negatif tidak menyingkirkan demam tifoid, karena hasilnya tergantung pada beberapa faktor. Faktor-faktor yang mempengaruhi hasil biakan meliputi :

1. Jumlah darah yang diambil
2. Perbandingan volume darah dari media empedu; dan
3. Waktu pengambilan darah.

Volume 10-15 ml dianjurkan untuk anak besar, sedangkan pada anak kecil dibutuhkan 2-4 ml. Sedangkan volume sumsum tulang yang dibutuhkan untuk kultur hanya sekitar 0.5-1 mL. Bakteri dalam sumsum tulang ini juga lebih sedikit dipengaruhi oleh antibiotika daripada bakteri dalam darah. Hal ini dapat menjelaskan teori bahwa kultur sumsum tulang lebih tinggi hasil positifnya bila dibandingkan dengan darah walaupun dengan volume sampel yang lebih sedikit dan sudah mendapatkan terapi antibiotika sebelumnya. Media pembiakan yang direkomendasikan untuk *S.typhi* adalah media empedu (gall) dari sapi dimana dikatakan media Gall ini dapat meningkatkan positività hasil karena hanya *S. typhi* dan *S. paratyphi* yang dapat tumbuh pada media tersebut.

Biakan darah terhadap *Salmonella* juga tergantung dari saat pengambilan pada perjalanan penyakit. Beberapa peneliti melaporkan biakan darah positif 40-80% atau 70-90% dari penderita pada minggu pertama sakit dan positif 10-50% pada akhir minggu ketiga. Sensitivitasnya akan menurun pada sampel penderita yang telah mendapatkan antibiotika dan meningkat sesuai dengan volume darah dan rasio darah dengan media kultur yang dipakai. Bakteri dalam feses ditemukan meningkat dari minggu pertama (10-15%) hingga minggu ketiga (75%) dan turun secara perlahan. Biakan urine positif setelah minggu pertama. Biakan sumsum tulang merupakan metode baku emas karena mempunyai sensitivitas paling tinggi dengan hasil positif didapat pada 80-95% kasus dan sering tetap positif selama perjalanan penyakit

dan menghilang pada fase penyembuhan. Metode ini terutama bermanfaat untuk penderita yang sudah pernah mendapatkan terapi atau dengan kultur darah negatif sebelumnya. Prosedur terakhir ini sangat invasif sehingga tidak dipakai dalam praktek sehari-hari. Pada keadaan tertentu dapat dilakukan kultur pada spesimen empedu yang diambil dari duodenum dan memberikan hasil yang cukup baik akan tetapi tidak digunakan secara luas karena adanya risiko aspirasi terutama pada anak. Salah satu penelitian pada anak menunjukkan bahwa sensitivitas kombinasi kultur darah dan duodenum hampir sama dengan kultur sumsum tulang.

Kegagalan dalam isolasi/biakan 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.

II.7.3 Tes serologi

Tes serologis digunakan untuk membantu menegakkan diagnosis demam tifoid dengan mendeteksi antibodi spesifik terhadap komponen antigen *S. typhi* maupun mendeteksi antigen itu sendiri. Volume darah

yang diperlukan untuk uji serologis ini adalah 1-3 ml yang diinokulasikan ke dalam tabung tanpa antikoagulan (19).

Metode pemeriksaan serologis imunologis ini dikatakan mempunyai nilai penting dalam proses diagnostik demam tifoid. Akan tetapi masih didapatkan adanya variasi yang luas dalam sensitivitas dan spesifisitas pada deteksi antigen spesifik *S. typhi* oleh karena tergantung pada jenis antigen, jenis spesimen yang diperiksa, teknik yang dipakai untuk melacak antigen tersebut, jenis antibodi yang digunakan dalam uji (poliklonal atau monoklonal) dan waktu pengambilan spesimen (stadium dini atau lanjut dalam perjalanan penyakit) (19).

Uji Widal merupakan suatu metode serologi baku dan rutin digunakan sejak tahun 1896. Prinsip uji Widal adalah memeriksa reaksi 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 (18).

Teknik aglutinasi ini dapat dilakukan dengan menggunakan uji hapusan (slide test) atau uji tabung (tube test). Uji hapusan dapat dilakukan secara cepat dan digunakan dalam prosedur penapisan sedangkan uji tabung membutuhkan teknik yang lebih rumit tetapi dapat digunakan untuk konfirmasi hasil dari uji hapusan (18).

Penelitian pada anak oleh Choo dkk (1990) mendapatkan sensitivitas dan spesifisitas masing-masing sebesar 89% pada titer O atau H >1/40 dengan nilai prediksi positif sebesar 34.2% dan nilai prediksi negatif sebesar 99.2%. Beberapa penelitian pada kasus demam tifoid anak dengan hasil biakan positif, ternyata hanya didapatkan sensitivitas uji Widal sebesar 64-74% dan spesifisitas sebesar 76-83% (18).

Interpretasi dari uji Widal ini harus memperhatikan beberapa faktor antara lain sensitivitas, spesifisitas, stadium penyakit; faktor penderita seperti status imunitas dan status gizi yang dapat mempengaruhi pembentukan antibodi; gambaran imunologis dari masyarakat setempat (daerah endemis atau non-endemis); faktor antigen; teknik serta reagen yang digunakan (18).

Kelemahan uji Widal yaitu rendahnya sensitivitas dan spesifisitas serta sulitnya melakukan interpretasi hasil membatasi penggunaannya dalam penatalaksanaan penderita demam tifoid akan tetapi hasil uji Widal yang positif akan memperkuat dugaan pada tersangka penderita demam tifoid (penanda infeksi). Saat ini walaupun telah digunakan secara luas di seluruh dunia, manfaatnya masih diperdebatkan dan sulit dijadikan pegangan karena belum ada kesepakatan akan nilai standar aglutinasi (cut-off point). Untuk mencari standar titer uji Widal seharusnya ditentukan titer dasar (baseline titer) pada anak sehat di populasi dimana pada daerah endemis seperti Indonesia akan didapatkan peningkatan titer antibodi O dan H pada anak-anak sehat. Penelitian oleh Darmowandowo

di RSUD Dr. Soetomo Surabaya (1998) mendapatkan hasil uji Widal dengan titer $>1/200$ pada 89% penderita (18).

Tes TUBEX merupakan tes aglutinasi kompetitif semi kuantitatif yang sederhana dan cepat (kurang lebih 2 menit) dengan menggunakan partikel yang berwarna untuk meningkatkan sensitivitas. Spesifisitas ditingkatkan dengan menggunakan antigen O9 yang benar-benar spesifik yang hanya ditemukan pada *Salmonella* serogrup D. Tes ini sangat akurat dalam diagnosis infeksi akut karena hanya mendeteksi adanya antibodi IgM dan tidak mendeteksi antibodi IgG dalam waktu beberapa menit (18).

Walaupun belum banyak penelitian yang menggunakan tes TUBEX ini, beberapa penelitian pendahuluan menyimpulkan bahwa tes ini mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang lebih baik daripada uji Widal. Penelitian oleh Lim dkk (2002) mendapatkan hasil sensitivitas 100% dan spesifisitas 100%. Penelitian lain mendapatkan sensitivitas sebesar 78% dan spesifisitas sebesar 89%. Tes ini dapat menjadi pemeriksaan yang ideal, dapat digunakan untuk pemeriksaan secara rutin karena cepat, mudah dan sederhana, terutama di negara berkembang (18).

Uji serologi EIA (*Enzyme Immunoassay*) didasarkan pada metode untuk melacak antibodi spesifik IgM dan IgG terhadap antigen OMP 50 kD *S. typhi*. Deteksi terhadap IgM menunjukkan fase awal infeksi pada demam tifoid akut sedangkan deteksi terhadap IgM dan IgG menunjukkan demam tifoid pada fase pertengahan infeksi. Pada daerah endemis dimana didapatkan tingkat transmisi demam tifoid yang tinggi akan terjadi

peningkatan deteksi IgG spesifik akan tetapi tidak dapat membedakan antara kasus akut, konvalesen dan reinfeksi. Pada metode Typhidot-M yang merupakan modifikasi dari metode Typhidot telah dilakukan inaktivasi dari IgG total sehingga menghilangkan pengikatan kompetitif dan memungkinkan pengikatan antigen terhadap Ig M spesifik (18).

Penelitian oleh Purwaningsih dkk (2001) terhadap 207 kasus demam tifoid bahwa spesifisitas uji ini sebesar 76.74% dengan sensitivitas sebesar 93.16%, nilai prediksi positif sebesar 85.06% dan nilai prediksi negatif sebesar 91.66%. Sedangkan penelitian oleh Gopalakhrisnan dkk (2002) pada 144 kasus demam tifoid mendapatkan sensitivitas uji ini sebesar 98%, spesifisitas sebesar 76.6% dan efisiensi uji sebesar 84%. Penelitian lain mendapatkan sensitivitas sebesar 79% dan spesifisitas sebesar 89% (18).

Uji dot EIA tidak mengadakan reaksi silang dengan salmonellosis non-tifoid bila dibandingkan dengan Widal. Dengan demikian bila dibandingkan dengan uji Widal, sensitivitas uji dot EIA lebih tinggi oleh karena kultur positif yang bermakna tidak selalu diikuti dengan uji Widal positif. Dikatakan bahwa Typhidot-M ini dapat menggantikan uji Widal bila digunakan bersama dengan kultur untuk mendapatkan diagnosis demam tifoid akut yang cepat dan akurat (18).

Beberapa keuntungan metode ini adalah memberikan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dengan kecil kemungkinan untuk terjadinya reaksi silang dengan penyakit demam lain, murah (karena menggunakan

peningkatan deteksi IgG spesifik akan tetapi tidak dapat membedakan antara kasus akut, konvalesen dan reinfeksi. Pada metode Typhidot-M yang merupakan modifikasi dari metode Typhidot telah dilakukan inaktivasi dari IgG total sehingga menghilangkan pengikatan kompetitif dan memungkinkan pengikatan antigen terhadap Ig M spesifik (18).

Penelitian oleh Purwaningsih dkk (2001) terhadap 207 kasus demam tifoid bahwa spesifisitas uji ini sebesar 76.74% dengan sensitivitas sebesar 93.16%, nilai prediksi positif sebesar 85.06% dan nilai prediksi negatif sebesar 91.66%. Sedangkan penelitian oleh Gopalakhrisnan dkk (2002) pada 144 kasus demam tifoid mendapatkan sensitivitas uji ini sebesar 98%, spesifisitas sebesar 76.6% dan efisiensi uji sebesar 84%. Penelitian lain mendapatkan sensitivitas sebesar 79% dan spesifisitas sebesar 89% (18).

Uji dot EIA tidak mengadakan reaksi silang dengan salmonellosis non-tifoid bila dibandingkan dengan Widal. Dengan demikian bila dibandingkan dengan uji Widal, sensitivitas uji dot EIA lebih tinggi oleh karena kultur positif yang bermakna tidak selalu diikuti dengan uji Widal positif. Dikatakan bahwa Typhidot-M ini dapat menggantikan uji Widal bila digunakan bersama dengan kultur untuk mendapatkan diagnosis demam tifoid akut yang cepat dan akurat (18).

Beberapa keuntungan metode ini adalah memberikan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dengan kecil kemungkinan untuk terjadinya reaksi silang dengan penyakit demam lain, murah (karena menggunakan

antigen dan membran nitroselulosa sedikit), tidak menggunakan alat yang khusus sehingga dapat digunakan secara luas di tempat yang hanya mempunyai fasilitas kesehatan sederhana dan belum tersedia sarana biakan kuman. Keuntungan lain adalah bahwa antigen pada membran lempengan nitroselulosa yang belum ditandai dan diblok dapat tetap stabil selama 6 bulan bila disimpan pada suhu 4°C dan bila hasil didapatkan dalam waktu 3 jam setelah penerimaan serum pasien (18).

Uji *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dipakai untuk melacak antibodi IgG, IgM dan IgA terhadap antigen LPS O9, antibodi IgG terhadap antigen flagella d (Hd) dan antibodi terhadap antigen Vi *S. typhi*. Uji ELISA yang sering dipakai untuk mendeteksi adanya antigen *S. typhi* dalam spesimen klinis adalah double antibody sandwich ELISA. Chaicumpa dkk (1992) mendapatkan sensitivitas uji ini sebesar 95% pada sampel darah, 73% pada sampel feses dan 40% pada sampel sumsum tulang (18).

Pada penderita yang didapatkan *S. typhi* pada darahnya, uji ELISA pada sampel urine didapatkan sensitivitas 65% pada satu kali pemeriksaan dan 95% pada pemeriksaan serial serta spesifisitas 100%. Penelitian oleh Fadeel dkk (2004) terhadap sampel urine penderita demam tifoid mendapatkan sensitivitas uji ini sebesar 100% pada deteksi antigen Vi serta masing-masing 44% pada deteksi antigen O dan antigen Hd. Pemeriksaan terhadap antigen Vi urine ini masih memerlukan penelitian lebih lanjut akan tetapi tampaknya cukup menjanjikan, terutama

antigen dan membran nitroselulosa sedikit), tidak menggunakan alat yang khusus sehingga dapat digunakan secara luas di tempat yang hanya mempunyai fasilitas kesehatan sederhana dan belum tersedia sarana biakan kuman. Keuntungan lain adalah bahwa antigen pada membran lempengan nitroselulosa yang belum ditandai dan diblok dapat tetap stabil selama 6 bulan bila disimpan pada suhu 4°C dan bila hasil didapatkan dalam waktu 3 jam setelah penerimaan serum pasien (18).

Uji *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dipakai untuk melacak antibodi IgG, IgM dan IgA terhadap antigen LPS O9, antibodi IgG terhadap antigen flagella d (Hd) dan antibodi terhadap antigen Vi *S. typhi*. Uji ELISA yang sering dipakai untuk mendeteksi adanya antigen *S. typhi* dalam spesimen klinis adalah double antibody sandwich ELISA. Chaicumpa dkk (1992) mendapatkan sensitivitas uji ini sebesar 95% pada sampel darah, 73% pada sampel feses dan 40% pada sampel sumsum tulang (18).

Pada penderita yang didapatkan *S. typhi* pada darahnya, uji ELISA pada sampel urine didapatkan sensitivitas 65% pada satu kali pemeriksaan dan 95% pada pemeriksaan serial serta spesifisitas 100%. Penelitian oleh Fadeel dkk (2004) terhadap sampel urine penderita demam tifoid mendapatkan sensitivitas uji ini sebesar 100% pada deteksi antigen Vi serta masing-masing 44% pada deteksi antigen O dan antigen Hd. Pemeriksaan terhadap antigen Vi urine ini masih memerlukan penelitian lebih lanjut akan tetapi tampaknya cukup menjanjikan, terutama

bila dilakukan pada minggu pertama sesudah panas timbul, namun juga perlu diperhitungkan adanya nilai positif juga pada kasus dengan *Brucellosis* (18).

Uji serologis dengan pemeriksaan *dipstick* dikembangkan di Belanda dimana dapat mendeteksi antibodi IgM spesifik terhadap antigen LPS *S. typhi* dengan menggunakan membran nitroselulosa yang mengandung antigen *S. typhi* sebagai pita pendeteksi dan antibodi IgM anti-human immobilized sebagai reagen kontrol. Pemeriksaan ini menggunakan komponen yang sudah distabilkan, tidak memerlukan alat yang spesifik dan dapat digunakan di tempat yang tidak mempunyai fasilitas laboratorium yang lengkap (18).

Penelitian oleh Gasem dkk (2002) mendapatkan sensitivitas uji ini sebesar 69.8% bila dibandingkan dengan kultur sumsum tulang dan 86.5% bila dibandingkan dengan kultur darah dengan spesifisitas sebesar 88.9% dan nilai prediksi positif sebesar 94.6%. Penelitian lain oleh Ismail dkk (2002) terhadap 30 penderita demam tifoid mendapatkan sensitivitas uji ini sebesar 90% dan spesifisitas sebesar 96%. Penelitian oleh Hatta dkk (2002) mendapatkan rerata sensitivitas sebesar 65.3% yang makin meningkat pada pemeriksaan serial yang menunjukkan adanya serokonversi pada penderita demam tifoid. Uji ini terbukti mudah dilakukan, hasilnya cepat dan dapat diandalkan dan mungkin lebih besar manfaatnya pada penderita yang menunjukkan gambaran klinis tifoid



dengan hasil kultur negatif atau di tempat dimana penggunaan antibiotika tinggi dan tidak tersedia perangkat pemeriksaan kultur secara luas (18).

Royal Tropical Institute di Amsterdam telah mengembangkan pemeriksaan lateks aglutinasi yang disebut *Typhoid F Dri-Dot* untuk skrining cepat demam tifoid. Pemeriksaan tersebut ditujukan bagi deteksi antibodi-antibodi yang spesifik terhadap *S.Typhi* dalam serum manusia (2).

Typhoid F Dri-Dot adalah pemeriksaan sederhana untuk mendeteksi antibodi yang spesifik terhadap *S.Tifi* dalam sera manusia. Pemeriksaan tersebut tidak memerlukan perlengkapan khusus dan hasilnya diamati dalam 30 detik. Bahan-bahannya sangat stabil dan dapat disimpan dalam suhu ruangan. Pemeriksaan *Typhoid F Dri-Dot* memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi bagi para pasien demam tifoid yang terkonfirmasi dengan kultur darah (2).

Typhoid F Dri-Dot mengandung partikel-partikel lateks berwarna yang diaktifasi dengan preparat antigen yang diambil dari *S. Tifi* yang dikeringkan pada kartu agglutinasi. Pemeriksaan tersebut didasarkan pada pengikatan antibodi-antibodi spesifik, yang ada dalam sampel serum, pada antigen yang menyebabkan agglutinasi granular yang bagus yang cenderung berada pada tepian droplet (hasil positif). Ketika tidak dijumpai antibodi spesifik, maka suspensi berwarna biru akan tetap homogen (hasil negatif) (2).

Penggunaan pemeriksaan lateks lebih tepat dibanding tes Widal. Tes Widal memerlukan persiapan hati-hati sampel yang dilarutkan berseri dua kali lipat dan dibaca setelah periode inkubasi sekurang-kurangnya 4 jam. Sebaliknya, pemeriksaan lateks dilakukan dengan menggunakan 10 μ l sampel serum murni dan dibaca dalam 60 detik. Perbedaan-perbedaan tersebut penting saat pemilihan tes untuk penggunaan di berbagai fasilitas yang miskin akan sumber daya yang tidak memiliki laboratorium. Lebih jauh lagi, kartu agglutinasi secara individual dikemas untuk penggunaan tunggal dan reagenya distabilkan; kartu yang terbungkus dapat disimpan selama lebih dari 2 tahun pada suhu 55°C tanpa kehilangan aktifitasnya dan penggunaan kartu tidak mempengaruhi tampilan dan rentang waktu kartu-kartu yang tersisa. Selain pemeriksaan tersebut tidak memerlukan tempat yang dingin untuk transportasi dan penyimpanan, pemeriksaan tersebut dapat dilakukan tanpa latihan oleh seorang yang relatif tidak terlatih, dan tidak diperlukan peralatan listrik dan yang mahal. Keuntungan-keuntungan tersebut membuat pemeriksaan lateks tersebut ideal sebagai suatu poin perawatan tes diagnostik demam tifoid (3).

II.7.4 Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial sekuen nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*. Metode ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis. Pada

awal perkembangannya metode ini hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA, tetapi kemudian dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat digunakan pula untuk melipatgandakan dan melakukan kuantitasi molekul mRNA (20).

PCR adalah suatu teknik sintesis amplifikasi sekuen DNA secara *in vitro*. Mampu mengamplifikasi sekuen DNA dari suatu spesies yang spesifik untuk suatu mikroorganisme, yang jumlahnya mencapai jutaan kali dalam waktu beberapa jam (21).

Salah satu modifikasi *PCR* yang populer adalah *PCR* yang menggunakan *nested sets* primer dan dikenal sebagai *nested amplification*. Dalam suatu protokol *nested amplification*, pada putaran pertama amplifikasi digunakan sepasang primer dan amplifikasi dilakukan sebanyak 15-30 siklus. Produk dari amplifikasi putaran pertama ini dipindahkan ke tabung lain dan *PCR* ke dua dijalankan dengan menggunakan sepasang primer yang spesifik terhadap internal sequence data produk *PCR* yang dihasilkan pada putaran pertama. *PCR* putaran kedua ini juga dilakukan sebanyak 15-30 siklus, kemudian produk dari *PCR* putaran kedua ini dideteksi dengan menggunakan elektroforesis gel (22).

Nested PCR dalam mendeteksi gen flagellin *S. typhi* dua *PCR-mix* dengan pasangan primer yang berbeda yaitu (21) :

1. *PCR Mix1* : Didalamnya terdapat pasangan primer oligonukleotida pertama yaitu: 25 pmol ST1 (5'-ACT GCT AAA ACC ACT ACT-'3) dan

2,200 μ M ST2 (5'-TTA ACG CAG TAA AGA GAG-3') yang digunakan pada siklus pertama dari PCR dapat mengamplifikasi fragmen 458 base pairs (bp) dari gen flagellin *S. typhi*.

2. *PCR Mix2*: Didalamnya terdapat pasangan primer oligonukleotida kedua yaitu: ST3 (5'-AGA TGG TAC TGG CGT TGC TC-3') dan ST4 (5'-TGG AGA CTT CGG TCG CGT AG-3') yang digunakan untuk mengamplifikasi produk dari PCR pertama dan produk akhir dirancang untuk mengamplifikasi fragmen 343 bp dari gen flagellin *S.typhi*. PCR tahap pertama dengan primer PCR Mix 1 mempunyai sensitivitas yang sangat tinggi sehingga dapat menimbulkan hasil yang positif palsu. Untuk menghindari hasil positif palsu tersebut, maka dapat dilakukan PCR tahap kedua dengan menggunakan primer PCR Mix 2 yang juga spesifik untuk *S. typhi* dan *S. Muenchen*

II.7.4.1 Prinsip Kerja PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

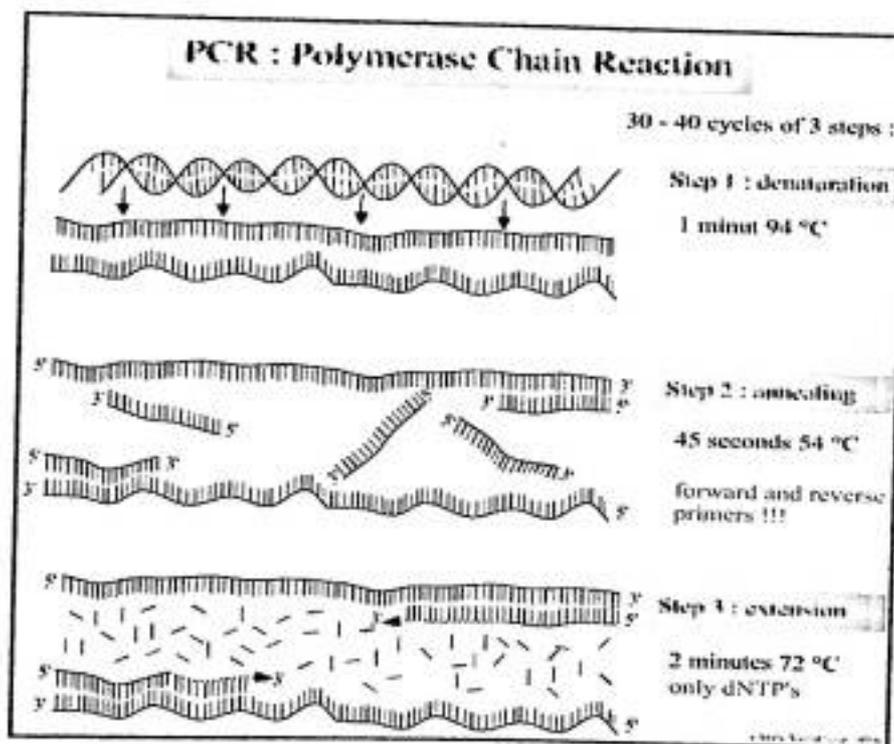
Empat komponen utama pada proses PCR adalah (1) DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, (2) oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, (3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri atas dATP,dCTP,dGTP,dTTP, dan (4) enzim DNA polymerase, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Komponen lain yang juga penting adalah senyawa buffer (20).

Proses PCR melibatkan siklus (sampai 30 siklus) yang masing-masing terdiri dari 3 tahap yang berurutan yang tahap denaturasi, tahap

penempelan (annealing pasangan primer pada rantai ganda DNA target), dan tahap pemanjangan (extension atau polimerisasi) (4).

Apabila ketiga tahap dalam proses PCR ini telah lengkap dilakukan, maka setiap satu segmen DNA pita ganda diamplifikasi menjadi dua segmen DNA pita ganda yang identik, sehingga jumlahnya dua kali lebih banyak dari jumlah semula (25).

Siklus diulangi kembali, dimulai lagi dengan denaturasi, annealing dan elongating primer. Produk hasil sintesis pada akhir tahap setiap siklus untuk setiap untai DNA, berfungsi sebagai *templat* untuk pembentukan molekul DNA yang baru dalam siklus selanjutnya sehingga fragmen DNA akan diamplifikasi secara eksponensial (25).



Gambar.4. Mekanisme Kerja PCR (24) Tahapan Siklus Amplifikasi DNA Secara Umum (Anonim. *Principle PCR*. 2009. [dikutip 24 Maret 2006]. Available from : <http://www.users.uqent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.)

II.7.4.2 Elektroforesis (25)

Elektroforesis dengan *agarose* atau *acrylamid* merupakan metode standar untuk memisahkan, mengidentifikasi, mengkarakterisasi dan purifikasi molekul DNA atau RNA.

Elektroforesis merupakan alat pendukung yang sangat pokok dalam teknologi rekombinan dengan aplikasi yang luas, baik untuk fraksinasi untai tunggal ataupun untai ganda molekul DNA.

Pada pH mendekati netral, DNA bermuatan negatif yang akan bermigrasi dari katode ke anode dengan mobilitas yang terutama ditentukan oleh ukuran serta konformasi fragmen DNA, elektron buffer dan gradien voltage yang diberikan.

Polyacrylamid gel (tanpa denaturasi) dapat digunakan untuk memisahkan fragmen DNA (untai ganda) mulai dari 6 bp (20% *acrylamid*) sampai 1000 bp (3% *acrylamid*), sedangkan penggunaan *agarose* gel mempunyai kemampuan pemisahan dengan range yang lebih luas, yaitu fragmen DNA antara 70 bp (3% *agarose*) dan 800.000 bp (0,1% *agarose*).

Elektroforesis dengan *agarose* gel termasuk teknik yang sederhana, mudah penanganannya, cepat dikerjakan, murah dan memerlukan sampel yang relatif sedikit (1 ng DNA). Keuntungan lain penggunaan *agarose* gel, yaitu lokasi DNA (*DNA fragmen*) dalam gel bisa diamati langsung secara 'in situ' dengan menggunakan *ethidium bromida*, baik dengan mencampur langsung dalam gel buffer ataupun setelah elektroforesis berakhir. Pemakaian *ethidium bromide* dengan melarutkan langsung dalam buffer

II.7.4.2 Elektroforesis (25)

Elektroforesis dengan *agarose* atau *acrylamid* merupakan metode standar untuk memisahkan, mengidentifikasi, mengkarakterisasi dan purifikasi molekul DNA atau RNA.

Elektroforesis merupakan alat pendukung yang sangat pokok dalam teknologi rekombinan dengan aplikasi yang luas, baik untuk fraksinasi untai tunggal ataupun untai ganda molekul DNA.

Pada pH mendekati netral, DNA bermuatan negatif yang akan bermigrasi dari katode ke anode dengan mobilitas yang terutama ditentukan oleh ukuran serta konformasi fragmen DNA, elektron buffer dan gradien voltage yang diberikan.

Polyacrylamid gel (tanpa denaturasi) dapat digunakan untuk memisahkan fragmen DNA (untai ganda) mulai dari 6 bp (20% *acrylamid*) sampai 1000 bp (3% *acrylamid*), sedangkan penggunaan *agarose* gel mempunyai kemampuan pemisahan dengan range yang lebih luas, yaitu fragmen DNA antara 70 bp (3% *agarose*) dan 800.000 bp (0,1% *agarose*).

Elektroforesis dengan *agarose* gel termasuk teknik yang sederhana, mudah penanganannya, cepat dikerjakan, murah dan memerlukan sampel yang relatif sedikit (1 ng DNA). Keuntungan lain penggunaan *agarose* gel, yaitu lokasi DNA (*DNA fragmen*) dalam gel bisa diamati langsung secara 'in situ' dengan menggunakan *ethidium bromida*, baik dengan mencampur langsung dalam gel buffer ataupun setelah elektroforesis berakhir. Pemakaian *ethidium bromide* dengan melarutkan langsung dalam buffer

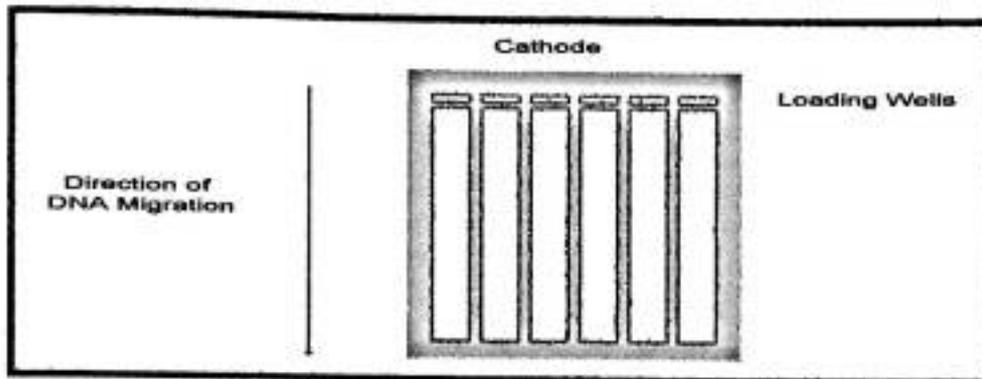
dapat mempengaruhi mobilitas DNA dalam gel. Warna ini berinteraksi dengan basa molekul DNA dengan memberikan warna orange fluorescence di bawah lampu ultra violet (UV). Di samping faktor-faktor yang telah disebutkan di atas kecepatan migrasi DNA dalam *agarose gel* ditentukan pula oleh konsentrasi agar, komposisi basa DNA dan temperatur.

Molekul DNA dalam bentuk linier ataupun duplek akan bermigrasi sepanjang gel matrik yang proporsional dengan logaritma dari berat molekul. Dengan demikian penggunaan molekul standar DNA (DNA yang sudah diketahui ukurannya) dapat dipakai sebagai pembanding dari DNA-*probe* atau DNA hasil isolasi (retriaksi dan ligasi) dalam penentuan besar molekul. Sebagai DNA standar biasanya digunakan fragmen hasil retriaksi bakteriofag dari lambda (*Hind III/Hind III + Eco R I*) atau plasmid BR 322 (*Sau 3 A*) ataupun fragmen DNA tertentu yang sudah diketahui ukurannya.

Untuk mendapatkan resolusi yang optimal dalam pemisahan fragmen DNA, sesuai dengan fragmen yang hendak dipisahkan diperlukan konsentrasi *agarose* yang tepat. Konsentrasi *agarose* menentukan besar pori-pori dari matrik gel, makin tinggi konsentrasi *agarose* maka pori yang telah terbentuk makin kecil.

Network pori-pori gel ini berfungsi sebagai saringan molekul DNA dengan fragmen kecil bermigrasi lebih cepat dari pada fragmen besar. Disamping itu fragmen DNA bermigrasi dengan kecepatan berlainan pada konsentrasi *agarose* yang berbeda dan mobilitas elektroforesis molekul

DNA menunjukkan adanya korelasi logaritma dengan konsentrasi agarose.



Gambar 5. Proses elektroforesis DNA pada Media agarose (Sumber : Nikmawati A. Perbandingan Tes Imunoserologi, Tes Kultur dan Polimerase Chain Reaction pada Penderita Suspek Demam Tifoid. Tesis. Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Makassar 2007. hal 38)

II.8 Spesifisitas dan Sensitivitas (29)

Spesifisitas berarti seberapa baik suatu tes dalam mendeteksi hanya individu yang berpenyakit dibanding salah mengelompokkan beberapa orang sehat sebagai individu berpenyakit. Dalam istilah yang lebih teknis, spesifisitas suatu tes mencerminkan kemampuannya untuk mendeteksi *negatif sejati* dengan sangat sedikit hasil *positif palsu*. Secara matematis dapat dirumuskan sebagai :

$$\text{Spesifisitas} = \frac{\text{negatif-sejati}}{\text{negatif-sejati} + \text{positif-palsu}} \times 100\%$$

Hasil negatif dan positif ini mengacu pada nilai yang didapat pada individu-individu dengan penyakit tertentu yang diperiksa. Spesifisitas yang tinggi secara ideal berarti hanya pasien dengan penyakit tersebut akan menunjukkan nilai positif dengan tes tersebut.

Sensitivitas berarti seberapa baik suatu tes mendeteksi penyakit tanpa melewatkan beberapa individu berpenyakit yang salah klasifikasi sebagai individu dengan suatu penyakit, sehingga sensitivitas mengukur proporsi dari individu dengan suatu penyakit. Dalam istilah teknis, sensitivitas suatu tes menunjukkan kemampuannya untuk menghasilkan lebih banyak hasil positif-sejati dan sedikit hasil negatif palsu. Secara matematis dirumuskan sebagai :

$$\text{Sensitivitas} = \frac{\text{positif-sejati}}{\text{positif-sejati} + \text{negatif-palsu}} \times 100\%$$

Adanya peningkatan dalam hasil positif-palsu (orang normal salah uji positif untuk suatu penyakit) akan menurunkan spesifisitas suatu tes, sedangkan suatu peningkatan dalam hasil negatif-palsu (orang sakit salah satu uji negatif untuk penyakit tersebut).

Untuk mendeteksi suatu penyakit, dibutuhkan sensitivitas maksimal, tetapi sering kali mengorbankan spesifitas. Dengan suatu tes yang sangat sensitif yang harus mempunyai nilai ambang abnormalitas rendah, seorang pasien mungkin salah dianggap berpenyakit sedangkan kenyataannya tidak.

Secara umum, tes yang sangat sensitif mempunyai spesifisitas yang relatif rendah, dan tes yang sangat spesifik mempunyai sensitivitas yang relatif rendah.

BAB III

PELAKSANAAN PENELITIAN

III.1 Desain Penelitian

Penelitian dilakukan secara *cross sectional* dengan menggunakan uji diagnostik untuk mengevaluasi hasil tes-tes yang digunakan untuk mendeteksi *Salmonella typhi* pada penderita suspek demam tifoid.

III.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2009 sampai sampel mencukupi dengan lokasi, yaitu :

1. Poliklinik dan perawatan Penyakit Dalam RSA. Jaury Jusuf Putera, RS. Pelamonia dan RS. Bhayangkara Makassar untuk pengumpulan sampel.
2. Laboratorium Biologi Molekuler Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar untuk tes *dri-dot* dan PCR.

III.3 Populasi Penelitian

Populasi sampel adalah penderita suspek demam tifoid yang berkunjung di poliklinik atau yang dirawat di Bagian Penyakit Dalam di beberapa Rumah sakit di Makassar.

III.4 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

Sampel adalah semua populasi terjangkau yang memenuhi kriteria penelitian dan dipilih sesuai dengan urutan masuknya di rumah sakit. Besar sampel diperkirakan sebanyak 30 sampel.

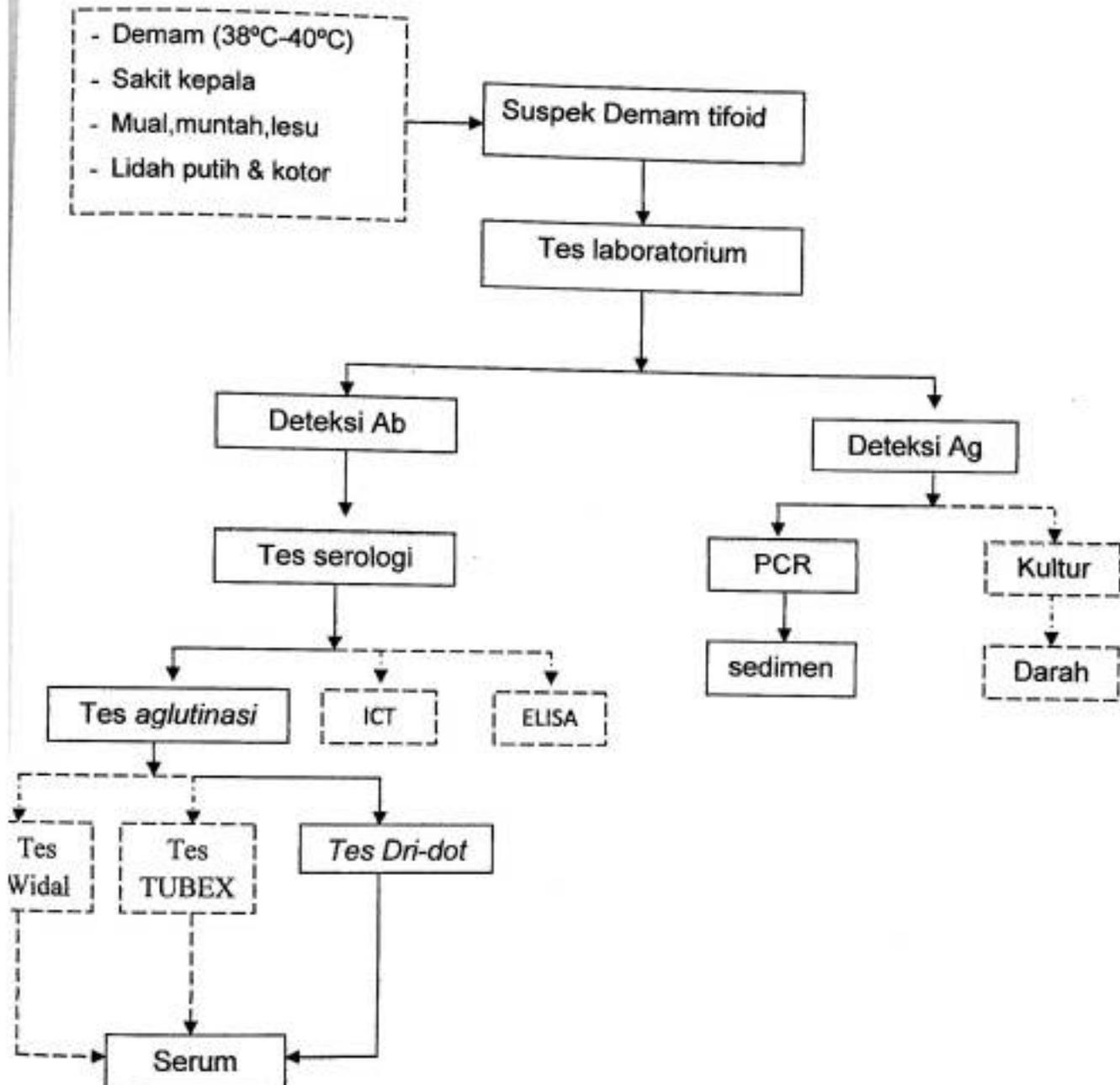
III.5 Kriteria Sampel

1. Penderita suspek demam tifoid dengan lama demam 3-7 hari dan suhu demam $> 37^{\circ}$ C.
2. Penderita yang telah menjalani pemeriksaan fisik dan dinyatakan sebagai suspek demam tifoid.
3. Setuju untuk diikutkan dalam penelitian dan menandatangani informed consent.

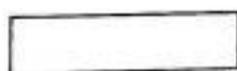
III.6 Izin Subjek Penelitian

Permintaan izin (informed consent) individu yang bersangkutan untuk dijadikan sampel penelitian.

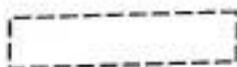
III.7 Kerangka Konsep



Keterangan :



: Variabel yang diteliti



: Variabel yang tidak diteliti

III.8 Definisi Operasional

- Suspek Demam Tifoid adalah penderita yang mempunyai suhu tubuh $> 37^{\circ}\text{C}$ selama lebih dari 3 hari dan telah menjalani pemeriksaan fisik di bagian Poliklinik atau perawatan di Bagian Penyakit Dalam dan dinyatakan sebagai suspek Demam Tifod.
- Tes Laboratorium adalah tes yang dilakukan secara *in vitro* untuk menentukan diagnosa penyakit infeksi.
- Deteksi Ab adalah pemeriksaan laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui adanya antibodi (kekebalan yang dibangkitkan dalam tubuh manusia dan hewan sebagai respon dan bereaksi spesifik dengan antigen yang masuk).
- Deteksi Ag adalah pemeriksaan laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui adanya antigen (substansi yang apabila dimasukkan dalam tubuh manusia dan hewan akan merangsang sel-sel tubuh tertentu untuk menghasilkan modified globulin)
- Tes Serologi adalah tes laboratorium yang mengukur aktivitas sistem imun (tes yang berdasarkan reaksi *invitro* antara antigen dengan antibodi).
- Serum adalah cairan darah yang terpisah setelah darah membeku.
- Bekuan darah adalah bagian dari darah yang membeku.
- Tes *dri-dot* adalah tes serologi sederhana untuk mendeteksi antibodi yang spesifik terhadap *Salmonella typhi* dalam serum manusia. *Dri-dot* mengandung partikel-partikel lateks berwarna

yang diaktifasi dengan preparat antigen yang diambil dari *Salmonella typhi* yang dikeringkan pada kartu aglutinasi.

- Aglutinasi adalah interaksi antara antibodi dan antigen yang menunjukkan adanya agregasi partikel-partikel.
- PCR (*Polimerase Chain Reaction*) adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*.
- Spesifisitas adalah kemampuan untuk mendeteksi negatif sejati dengan sangat sedikit hasil positif palsu.
- Sensitivitas adalah kemampuan untuk menghasilkan lebih banyak hasil positif sejati dan sedikit hasil negatif palsu.

III.9 Alat dan Bahan

III.9.1 Alat-Alat

1. Tes *Dri-dot* (2)

Alat-alat yang digunakan pada tes *dri-dot* yaitu mikropipet 10 μ l, spatula, stopwatch, dan tip.

2. Teknik PCR (27)

Alat-alat yang digunakan pada tes PCR yaitu botol reagen gyrotary shaker, Inkubator, kacamata anti UV, Kamera Polaroid, label, lemari pendingin, mesin PCR, mikropipet, mikro cup 1,5 ml, mikro cup 0,5 ml, mikro cup berisi 0,2 ml L6, oven, perangkat UV light, power supply, rak mikrocup 1,5 ml dan 0,5 ml, sentrifus, tangki elektroforesis, tip, dan vortex.

III.9.2 Bahan-Bahan

1. Tes *Dri-dot* (2)

Bahan-bahan yang digunakan pada tes *Dri-dot* yaitu kartu *dri-dot* dan *Blue dot*

2. Teknik PCR (27)

Bahan-bahan yang digunakan pada Teknik PCR yaitu aquadest steril, alkohol 96 %, buffer L6 (120 gram GuSCN dalam 100 ml Tris hydrochloride 0,1 M, pH 6,4 + 22 ml larutan EDTA 0,2 M, 2,6 gram Triton X-100), buffer L2 (120 gram GuSCN dalam 100 ml Tris-HCl 0,1 M pH 6,4) , aceton, TE delution (Tris-HCl 10 mM + EDTA 1 mM pH 8,0), ethidium bromide (loading solution), primer ST1 (5_-ACT GCT AAA ACC ACT ACT-3_), primer ST2 (5_-ACT GCT AAA ACC ACT-3_), primer ST3 (5_-AGA TGG TAC TGG CGT TGC TC-3_), primer ST4 (5_-TGG AGA CTT CGG TCG CGT AG-3_), Suspensi diatoms.

III.10 Prosedur Kerja

1. Alokasi Subyek

Penelitian dilakukan pada semua penderita yang memenuhi kriteria inklusi yang melakukan pemeriksaan di poliklinik atau perawatan penyakit dalam di RS. Bhayangkara Makassar, RS. Pelamonia dan RS.Akademis Makassar.

2. Cara Penelitian

2.1 Pengambilan Sampel

1. Setiap penderita yang memenuhi kriteria inklusi dicatat identitasnya, diberikan informasi dan penjelasan secara rinci mengenai apa yang akan dilakukan selama penelitian.
2. Penderita dianamnesis mengenai lama demam, suhu demam dan pola demam, riwayat penyakit dan riwayat terapi. Menjalani tes *dri-dot* dan PCR.
3. Dilakukan pengambilan sampel darah vena.
4. Selanjutnya darah yang telah diambil disentrifus untuk mendapatkan serum penderita sebagai sampel untuk tes imunoserologi teknik *dri-dot* dan sedimennya digunakan untuk tes PCR.
5. Setelah dilakukan tes imunoserologi *dri-dot*, maka dilanjutkan dengan tes PCR.

2.2 Cara Kerja

1. Pemeriksaan Serologi *Dri-dot* (2)

Kartu agglutinasia diambil dari kemasannya dan di tempatkan menghadap ke atas dengan titik berwarna birunya menghadap ke atas. Diteteskan serum 10 μ l di samping titik berwarna biru dan di dalam area yang ditandai dengan lingkaran hitam. Spatula dipegang dengan permukaan datarnya menghadap ke bawah dengan ibu jari dan jari telunjuk dekat ke ujung datar spatula. Disuspensikan titik biru ke dalam

serum dengan gerakan sirkular yang cepat. Suspensi disebar ke seluruh area permukaan kecil dan jangan sebar suspensi keluar dari area yang ditandai dengan lingkaran hitam. Kemudian Hasil dibaca dalam 60 detik setelah mulainya rotasi.

2. Teknik *nested PCR* (27)

a. Ekstraksi DNA *Salmonella typhi* dengan Metode Boom

Sampel darah sebanyak 100 µl ditambahkan dengan 900 µl buffer L6 lalu dihomogenkan. Campuran dishaker selama 18-24 jam. Campuran disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 5 menit. Campuran yang telah disentrifus ditambahkan 20 µl suspensi diatoms, divortex dan campuran dishaker selama 15 menit. Campuran disentrifus kembali selama 15 detik. Supernatan dibuang untuk memperoleh endapan. Selanjutnya dilakukan pencucian. Untuk pencucian pertama, endapan ditambahkan dengan 1000 µl buffer L2. Campuran divortex lalu disentrifus selama 15 detik dan dibuang supernatannya. Pencucian dengan L2 dilakukan dua kali. Untuk pencucian kedua endapan ditambahkan 1 ml alkohol 96 %, divortex dan disentrifus selama 15 detik, kemudian dibuang supernatannya. Pencucian dengan alkohol dilakukan dua kali. Untuk pencucian ketiga endapan ditambahkan 1 ml aseton, divortex dan disentrifus selama 15 detik kemudian buang supernatannya. Selanjutnya endapan dikeringkan pada suhu 56°C selama 10 menit di dalam oven. Endapan ditambahkan 60 µl buffer TE, di vortex dan diinkubasi pada suhu 56°C

selama 10 menit. Campuran tersebut disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 30 detik. Dipindahkan 40-50 μ l supernatannya ke dalam tabung baru sebagai hasil ekstraksi DNA.

b. Amplifikasi *Salmonella typhi*

Ekstrak DNA sebanyak 2 μ l ditambah 25 μ l PCR mix1 dan dimasukkan ke dalam tabung 500 μ l. Tabung dimasukkan ke mesin PCR selama 5 jam. Program amplifikasi pertama dibuat yang terdiri dari : (1) Denaturasi dengan jalan pemisahan dari pasangan strands-DNA, pada suhu 94°C selama 1 menit, (2) Annealing primer yaitu pengikatan primer dengan strands-DNA yang sesuai pada suhu 57°C selama 1 menit 30 detik, (3) Elongating primer yaitu pengkopian DNA-sequence yang terikat pada primer sehingga terjadi penggandaan dari pasangan DNA yang akan dideteksi, pada suhu 72°C selama 3 menit. Kemudian hasil amplifikasi pertama 2 μ l ditambah 25 μ l PCR mix2 ke dalam tabung 500 μ l, dimasukkan ke dalam mesin PCR kemudian program ulang dibuat sebagai amplifikasi kedua.

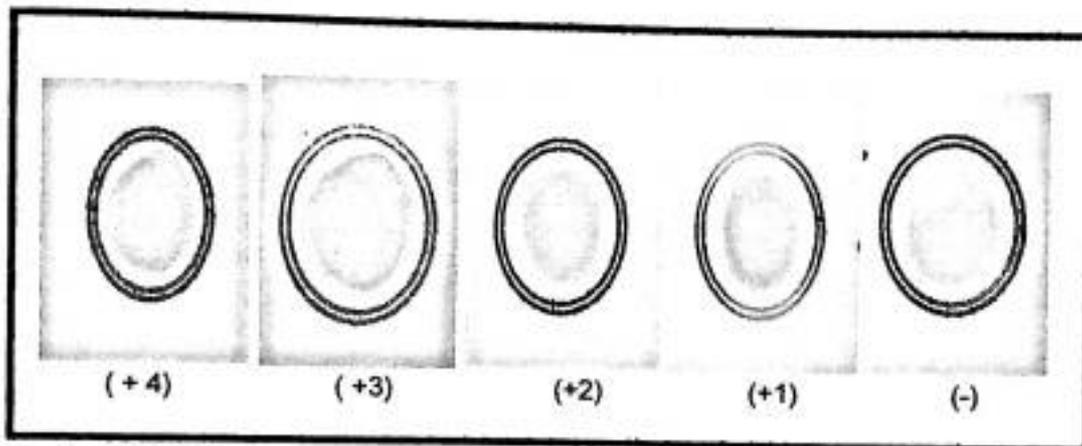
c. Elektroforesis

Pada tangki elektroforesis, 8 μ l dimasukkan produk amplifikasi kedua lalu loading solution (ethidium bromide) 2 μ l ditambah ke dalam sisir sumur-sumur 2 % agarose gel. Elektroforesis dijalankan dengan elektrode 220 volt selama 1 jam sehingga DNA akan bergerak ke kutub positif. Hasil elektroforesis dapat dilihat dengan bantuan lampu

ultraviolet, pita DNA dapat divisualisasikan dengan kamera. Pita DNA dari sampel dibandingkan dengan pita DNA kontrol *Salmonella typhi*.

III.11 Pembacaan Hasil

1. Hasil tes dri-dot dibaca dalam waktu 60 detik dan hasil negatif bila tidak terjadi aglutinasi.



Gambar 6. Hasil tes serologi dri-dot

Gambar 6 menunjukkan hasil positif pada tes serologi dri-dot berdasarkan aglutinasi yang diklasifikasikan menurut waktu (s) terjadinya aglutinasi. Aglutinasi yang terjadi selama 0-10 s menunjukkan hasil positif 4, sedangkan aglutinasi yang terjadi selama 11-20 s diklasifikasikan sebagai positif 3, jika aglutinasi terjadi pada 21-30 s diklasifikasikan sebagai positif 2 dan aglutinasi pada 30-60 s dapat diklasifikasikan sebagai positif 1. Jika tidak terjadi aglutinasi selama 30 s atau aglutinasi terjadi dalam waktu lebih dari 60 s menunjukkan hasil yang negatif.

2. Pada teknik nested PCR terbentuk pita DNA pada elektroforesis dengan membentuk pasangan basa (bp) 343 bp.

III.12 Analisis data

Data hasil uji dari tes serologi *dri-dot* dan PCR yang disajikan dengan menggunakan pendekatan secara deskriptif dengan menggunakan tabel dan gambar.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

IV.1.1 Karakteristik Subjek Penelitian

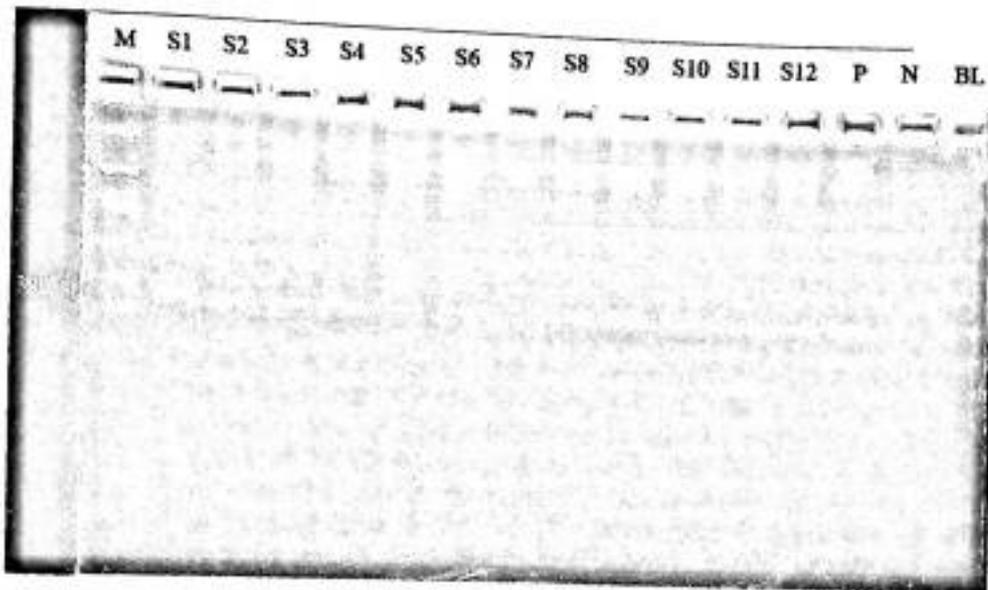
Selama periode April 2009 didapatkan 30 subjek penelitian yang terdiri atas 17 orang (56,7%) laki-laki dan wanita sebanyak 13 orang (43,3%). Didapatkan persentase tertinggi umur adalah 11 - 20 tahun (36,67 %) sedangkan berdasarkan lamanya demam, ditemukan persentase tertinggi dengan lama demam < 7 hari (86,67%) dan persentase suhu demam tertinggi dengan suhu $\geq 38^{\circ}\text{C}$ (66,67 %).

Tabel 1. Karakteristik subjek penelitian berdasarkan jenis kelamin, umur dan lamanya demam

| Karakteristik | Jumlah (n) | Persentase (%) |
|-----------------------------|------------|----------------|
| Jenis Kelamin | | |
| > Laki-laki | 17 | 56,7 |
| > Wanita | 13 | 43,3 |
| Umur | | |
| > 2 - 10 tahun | 5 | 16,67 |
| > 11 - 20 tahun | 11 | 36,67 |
| > 21 - 30 tahun | 6 | 20 |
| > 31 - 40 tahun | 3 | 10 |
| > 41 - 50 tahun | 2 | 6,67 |
| > > 50 tahun | 3 | 10 |
| Lama demam | | |
| > < 7 hari | 26 | 86,67 |
| > ≥ 7 hari | 4 | 13,33 |
| Suhu demam | | |
| > < 38°C | 10 | 33,33 |
| > $\geq 38^{\circ}\text{C}$ | 20 | 66,67 |

IV.1.2 Hasil Tes serologi Dri-dot dan PCR pada penderita Suspek Demam Tifoid

Telah dilakukan pemeriksaan pada 30 subjek penelitian dengan PCR didapatkan 25 penderita dengan hasil positif dan 5 penderita dengan hasil negatif.



Gambar 7. Hasil elektroforesis tampak pita pada posisi 343 bp dengan nPCR
M=Marker; S1-S12 = sampel Suspek DT; S7=sampel negatif ; N=control negative;P=control positif;BL=blanko

Gambar 7 menunjukkan hasil pada teknik nPCR, pada sampel 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 dan 12 tampak pita pada posisi 343 bp (marker) yang sama dengan pita pada kontrol positif (P) dan sampel 7 tidak menunjukkan pita sama dengan kontrol negatif (N).

Pada tabel 2, didapatkan 17 penderita dengan hasil positif pada tes serologi *dri-dot* dan PCR, 1 penderita dengan hasil positif pada tes serologi *dri-dot* dan hasil negatif pada PCR, 8 penderita dengan hasil negatif pada *dri-dot* dan hasil positif pada PCR, dan 4 penderita dengan hasil yang negatif pada *dri-dot* dan PCR.

Tabel 2 . Perbandingan Hasil tes serologi Dri-dot dan PCR

| Tes serologi <i>Dri-dot</i> | PCR | | Total |
|--------------------------------|-----|---|-------|
| | + | - | |
| + | 17 | 1 | 18 |
| - | 8 | 4 | 12 |
| Total | 25 | 5 | 30 |

IV.1.3 Persentase Hasil Positif Serologi *Dri-dot* Pada Suspek Demam Tifoid Berdasarkan Karakteristik Jenis Kelamin, Lama demam dan Suhu demam.

Pada tabel 3 ditemukan persentase hasil positif untuk tes serologi *dri-dot* antara laki-laki dan wanita sama yaitu 50 %, sedangkan untuk karakteristik umur ditemukan persentase hasil positif tertinggi pada umur 11-20 tahun. Berdasarkan karakteristik lama demam didapatkan persentase hasil positif tertinggi dengan lama demam < 7 hari yaitu 83,33 %, sedangkan untuk karakteristik suhu demam ditemukan persentase hasil positif tertinggi dengan suhu demam $\geq 38^{\circ}\text{C}$ yaitu 83,33 %.

Tabel 3. Persentase Hasil Positif Serologi *Dri-dot* Pada Suspek Demam Tifoid Berdasarkan Karakteristik Jenis Kelamin, Lama demam dan Suhu demam

| Karakteristik | Jumlah Penderita dengan hasil Positif | Persentase (%) |
|-----------------------------|---------------------------------------|----------------|
| Jenis Kelamin | | |
| > Laki-laki | 9 | 50 |
| > Wanita | 9 | 50 |
| Umur | | |
| > 2 – 10 tahun | 5 | 28 |
| > 11 – 20 tahun | 7 | 39 |
| > 21 – 30 tahun | 2 | 11 |
| > 31 – 40 tahun | 2 | 11 |
| > 41 – 50 tahun | - | - |
| > > 50 tahun | 2 | 11 |
| Lama demam | | |
| > < 7 hari | 15 | 83,33 |
| > ≥ 7 hari | 3 | 16,67 |
| Suhu Demam | | |
| > < 38°C | 3 | 16,67 |
| > $\geq 38^{\circ}\text{C}$ | 15 | 83,33 |

IV.1.4 Persentase Hasil Positif PCR Pada Suspek Demam Tifoid Berdasarkan Karakteristik Jenis Kelamin, Lama demam dan Suhu demam.

Pada tabel 4 ditemukan persentase hasil positif untuk tes PCR pada wanita yaitu 54%, sedangkan untuk karakteristik umur di dapatkan hasil positif tertinggi pada umur 11-20 tahun yaitu 32 %. Berdasarkan karakteristik lama demam didapatkan persentase hasil positif tertinggi dengan lama demam < 7 hari yaitu 88 %, sedangkan untuk karakteristik suhu demam ditemukan persentase hasil positif tertinggi dengan suhu demam ≥ 38 °C yaitu 68 %.

Tabel 4. Persentase Hasil Positif PCR Pada Suspek Demam Tifoid Berdasarkan Karakteristik Jenis Kelamin, Lama demam dan Suhu demam

| Karakteristik | Jumlah Penderita dengan hasil Positif | Persentase (%) |
|-----------------|---------------------------------------|----------------|
| Jenis Kelamin | | |
| > Laki-laki | 16 | 54 |
| > Wanita | 9 | 38 |
| Umur | | |
| > 2 – 10 tahun | 4 | 16 |
| > 11 – 20 tahun | 8 | 32 |
| > 21 – 30 tahun | 6 | 24 |
| > 31 – 40 tahun | 2 | 8 |
| > 41 – 50 tahun | 2 | 8 |
| > > 50 tahun | 3 | 12 |
| Lama demam | | |
| > < 7 hari | 22 | 88 |
| > ≥ 7 hari | 3 | 12 |
| Suhu Demam | | |
| > < 38°C | 8 | 32 |
| > ≥ 38 °C | 17 | 68 |

IV.2 Perhitungan

| Tes serologi Dri-dot | PCR | | Total |
|-------------------------|---------|--------|-------|
| | + | - | |
| + | 17 (PS) | 1 (PP) | 18 |
| - | 8 (NP) | 4 (NS) | 12 |
| Total | 25 | 5 | 30 |

$$\begin{aligned}
 1. \text{ Sensitivitas} &= \frac{PS}{PS + NP} \times 100\% \\
 &= \frac{17}{17 + 8} \times 100\% \\
 &= \frac{17}{25} \times 100\% \\
 &= 68\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2. \text{ Spesifisitas} &= \frac{NS}{NS + PP} \times 100\% \\
 &= \frac{4}{4 + 1} \times 100\% \\
 &= \frac{4}{5} \times 100\% \\
 &= 80\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 3. \text{ NPN} &= \frac{NS}{NS + NP} \times 100 \\
 &= \frac{4}{4 + 8} \times 100\%
 \end{aligned}$$

IV.2 Perhitungan

| Tes serologi Dri-dot | PCR | | Total |
|-------------------------|---------|--------|-------|
| | + | - | |
| + | 17 (PS) | 1 (PP) | 18 |
| - | 8 (NP) | 4 (NS) | 12 |
| Total | 25 | 5 | 30 |

$$1. \text{ Sensitivitas} = \frac{PS}{PS + NP} \times 100\%$$

$$= \frac{17}{17 + 8} \times 100\%$$

$$= \frac{17}{25} \times 100\%$$

$$= 68\%$$

$$2. \text{ Spesifisitas} = \frac{NS}{NS + PP} \times 100\%$$

$$= \frac{4}{4 + 1} \times 100\%$$

$$= \frac{4}{5} \times 100\%$$

$$= 80\%$$

$$3. \text{ NPN} = \frac{NS}{NS + NP} \times 100$$

$$= \frac{4}{4 + 8} \times 100\%$$

$$= \frac{4}{12} \times 100\%$$

$$= 33,33 \%$$

$$4. \text{ NPP} = \frac{\text{PS}}{\text{PS} + \text{PP}} \times 100$$

$$= \frac{17}{17 + 1} \times 100\%$$

$$= \frac{17}{18} \times 100\%$$

$$= 94 \%$$

IV.2.1 Hasil Sensitivitas, Spesifisitas, Nilai Prediksi Positif dan Nilai Prediksi Negatif Tes Serologis Dri-dot terhadap PCR pada Suspek Demam Tifoid

Berdasarkan Tabel 5 didapatkan nilai sensitivitas tes serologi dri-dot yaitu 68 %, dan memiliki spesifisitas dri-dot yaitu 80 %. Sedangkan nilai prediksi positif dan nilai prediksi negatif tes serologi dri-dot berturut-turut yaitu 33,3 % dan 94,4 %.

Tabel 5. Sensitivitas, Spesifisitas, Nilai Prediksi Positif dan Nilai Prediksi Negatif Tes Serologis Dri-dot terhadap PCR pada Suspek Demam Tifoid

| Tes Serologi | Nilai diagnostik | | | |
|----------------|------------------|------------------|----------------------------|----------------------------|
| | Sensitivitas (%) | Spesifisitas (%) | Nilai Prediksi Positif (%) | Nilai Prediksi Negatif (%) |
| <i>Dri-dot</i> | 68 | 80 | 33,33 | 94,4 |

IV.3 Pembahasan

Penelitian ini dilakukan selama periode April sampai Mei dengan 30 subjek penderita suspek demam tifoid. Dilakukan dua jenis pemeriksaan yaitu dengan tes serologi *dri-dot* untuk mendeteksi antibodi yang spesifik terhadap *Salmonella typhi* dalam serum penderita suspek DT, dan teknik penentuan DNA dari kuman *Salmonella typhi* dengan teknik PCR.

Pada penelitian ini didapatkan jumlah penderita suspek demam tifoid laki-laki lebih banyak yaitu 17 orang (56,7%) dan wanita sebanyak 13 orang (43,3%). Didapatkan persentase tertinggi umur adalah 11 - 20 tahun (36,67 %) sedangkan berdasarkan lamanya demam, ditemukan persentase tertinggi dengan lama demam < 7 hari (86,67%) dan persentase suhu demam tertinggi dengan suhu $\geq 38^{\circ}\text{C}$ (66,67 %).

Tes serologis telah banyak dikembangkan terutama tes diagnosis cepat memakai teknik pemeriksaan yang mudah dan cepat. Pada penelitian ini digunakan tes serologi *dri-dot* yaitu suatu tes serologi yang mengandung partikel-partikel lateks berwarna yang diaktifasi dengan preparat antigen yang diambil dari *Salmonella typhi* yang dikeringkan pada kartu aglutinasi untuk mendeteksi antibodi yang spesifik terhadap *Salmonella typhi* dalam serum manusia. Dari 30 subjek penelitian didapatkan 18 penderita dengan hasil positif. Sedangkan pemeriksaan dengan menggunakan teknik PCR di dapatkan 25 penderita dengan hasil positif. Hal ini membuktikan bahwa metode PCR adalah sangat sensitif untuk mendeteksi kuman *Salmonella*.

Metode PCR adalah metode deteksi secara molecular DNA dari kuman. Meskipun metode ini sangat sensitif namun mempunyai berbagai keterbatasan baik dalam teknik pemeriksaan yang harus membutuhkan tenaga dan ruangan khusus, serta fasilitas pemeriksaan yang masih relatif mahal sehingga metode ini belum dipakai sebagai pemeriksaan rutin dilaboratorium klinik.

Berdasarkan penelitian dengan menggunakan tes serologi *dri-dot* dan PCR didapatkan 17 penderita dengan hasil positif pada tes serologi *dri-dot* dan PCR, 1 penderita dengan hasil positif pada tes serologi *dri-dot* dan hasil negatif pada PCR, 8 penderita dengan hasil negatif pada *dri-dot* dan hasil positif pada PCR, dan 4 penderita dengan hasil yang negatif pada *dri-dot* dan PCR.

Pada tes serologi *dri-dot* antara laki-laki dan wanita di dapatkan hasil positif yang sama yaitu 50 %. Namun berdasarkan literatur wanita mengalami lebih sedikit infeksi selama hidupnya dibanding laki-laki. Hal ini disebabkan oleh efek relatif androgen, meskipun terjadi penghambatan sel T episodik wanita tidak menunjukkan infeksi yang lebih sering dibanding laki-laki (28). Hal ini menunjukkan peran besar immunoglobulin terhadap infeksi (28). Berdasarkan karakteristik lama demam didapatkan persentase hasil positif tertinggi dengan lama demam < 7 hari yaitu 83,33 %. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tes *dri-dot* akan memberikan hasil yang positif dengan lama demam < 7 hari, karena antibodi sudah terbentuk pada minggu pertama, namun berdasarkan literatur antibodi

akan mencapai tingkat yang dapat dideteksi pada sekitar satu minggu setelah onset penyakit (2). Hal ini disebabkan oleh jumlah sampel yang kecil dan distribusinya yang tidak merata, sehingga didapatkan hasil positif lebih banyak pada lama demam < 7 hari. Sedangkan untuk karakteristik suhu demam ditemukan persentase hasil positif tertinggi dengan suhu demam $\geq 38^{\circ}\text{C}$ yaitu 83,33 %. Hal ini menunjukkan bahwa suhu demam yang tinggi menandakan semakin banyaknya kuman dimana endotoksinya merangsang sintesis dan pelepasan zat pirogen oleh makrofag, selanjutnya zat pirogen yang beredar dalam darah mempengaruhi pusat termoregulator di hipotalamus yang mengakibatkan demam (6).

Pada pemeriksaan dengan teknik PCR, didapatkan jumlah penderita yang menunjukkan hasil yang positif sebanyak 25 orang. Berdasarkan jenis kelamin di dapatkan jumlah penderita laki-laki lebih banyak daripada wanita yaitu 68 %, karena androgen yang dilepas oleh laki-laki umumnya bersifat immunosupresif sedangkan wanita, respon imunnya terintegrasi dengan sistem endokrin yakni hormon estrogen yang merangsang produksi antibodi sehingga wanita mengalami lebih sedikit infeksi selama hidupnya dibanding laki-laki (28). Berdasarkan umur ditemukan persentase tertinggi hasil positif pada umur 11-20 tahun yaitu 32 %, berdasarkan literatur hampir semua daerah endemik, insidensi demam tifoid banyak terjadi pada usia 5-19 tahun, karena usia anak sekolah mempunyai sistem imun yang belum matang (28) dan sudah

biasa jajan sendiri sehingga mudah terinfeksi kuman melalui makanan dan minuman yang mereka konsumsi. Usia dibawah 5 tahun biasanya yang memberikan makanan adalah ibunya yang tentunya masih bersih dan tidak sembarangan beli, sementara bayi belum makan, belum jajan dan masih mendapatkan ASI dari ibunya . Sedangkan untuk usia lanjut disertai dengan penurunan resistensi terhadap infeksi (28). Untuk karakteristik lama demam dan suhu demam ditemukan persentase tertinggi hasil positif pada lama demam < 7 hari dengan suhu demam $\geq 38^{\circ}\text{C}$ berturut-turut 88 % dan 68 %. Hal ini menunjukkan bahwa metode PCR sangat sensitif untuk mendeteksi kuman pada awal terjadinya demam disebabkan oleh kuman yang terdapat di dalam makrofag masuk kedalam sirkulasi darah pada minggu pertama yaitu yang disebut bakteremia primer (14). Sedangkan berdasarkan suhu demam sama halnya pada tes serologi bahwa semakin tinggi suhu demam menandakan banyaknya kuman dimana endotoksinya merangsang sintesis dan pelepasan zat pirogen oleh makrofag, selanjutnya zat pirogen yang beredar dalam darah mempengaruhi pusat termoregulator di hipotalamus yang mengakibatkan demam (6). Sehingga dapat disimpulkan bahwa metode PCR sensitif untuk mendeteksi kuman *Salmonella* pada awal terjadinya demam yaitu lama demam < 7 hari dengan suhu demam $\geq 38^{\circ}\text{C}$.

Pada penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil yang negatif palsu yakni menunjukkan hasil yang negatif pada tes serologi dri-dot dan hasil positif pada PCR sebanyak 8 sampel, hal ini disebabkan oleh

pengambilan sampel yang terlalu dini, padahal antibodi akan mencapai tingkat yang dapat dideteksi pada sekitar satu minggu setelah onset penyakit, oleh karena itu sampel serum dikumpulkan sangat dini kemungkinan gagal menunjukkan adanya agglutinasi pada tes *dri-dot* (2). Sedangkan PCR sangat sensitif dalam mendeteksi kuman pada awal terjadinya penyakit atau setelah terbentuk bakteremia primer (14) sehingga pemeriksaan sampel yang dilakukan beberapa hari setelah onset penyakit akan memberikan hasil yang positif.

Pada penelitian ini juga didapatkan hasil positif palsu sebanyak 1 sampel yakni menunjukkan hasil positif pada tes serologi *dri-dot* dan negatif pada PCR. Hal ini disebabkan oleh pengambilan sampel pada tahap lanjut dimana kuman sudah tidak terdapat lagi di dalam pembuluh darah tetapi telah menyebar keseluruh organ retikuloendotelial tubuh terutama hati dan limpa (14), sehingga pada pemeriksaan PCR menunjukkan hasil yang negatif, sedangkan sebaliknya antibodi telah mencapai tingkat yang dapat dideteksi pada tahap lanjut sehingga didapatkan hasil positif pada tes serologi *dri-dot*.

Pada penelitian ini didapatkan nilai sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif, dan nilai prediksi negatif tes serologi *dri-dot* terhadap PCR berturut-turut yaitu 68 %; 80 %; 33,33 % ; dan 94,4 %.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian di atas maka dapat diperoleh kesimpulan bahwa

1. Tes serologi *dri-dot* mempunyai sensitivitas 68 % dan spesifisitas 80 % terhadap PCR.
2. Tes Serologi *dri-dot* menunjukkan persentase tertinggi hasil positif ditemukan pada penderita berusia 11-20 tahun (39 %) dengan lama demam < 7 hari (83,33 %), dan suhu demam $\geq 38^{\circ}\text{C}$ (83,33 %).
3. PCR menunjukkan persentase tertinggi hasil positif pada penderita dengan jenis kelamin laki-laki (54 %), usia 11-20 tahun (32 %), dengan lama demam < 7 hari (88 %) dan suhu demam $\geq 38^{\circ}\text{C}$ (68 %).

B. Saran

1. Dapat dipertimbangkan tes serologi *dri-dot* sebagai tes serologi yang baik dalam mendiagnosis demam tifoid.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan jumlah sampel yang lebih banyak dengan distribusi sampel yang lebih merata.

DAFTAR PUSTAKA

1. Handojo I. *Imunoasai terapan pada beberapa penyakit infeksi*. Airlangga University Press. Jakarta. 2004. hal.1,5,8.
2. Hatta M. *Tifoid F Dri-Dot a Salmonella typhi-specific Latex Serum Agglutination Assay for Use on human Serum Samples*. Royal tropical Institute/Koninklijk Institute Voor de Tropen (KIT).2007
3. Abdoel, T.Smits,L. Hatta, M. *Laboratory evaluation of a simple and rapid latex agglutination assay for the serodiagnosis of tifoid fever*. 2007.www.sciencedirect.com/journals/trst.
4. Soewondo S. *Perkembangan terkini dalam pengelolaan beberapa penyakit tropik infeksi*. Airlangga University Press. Jakarta. 2002. hal142.
5. (Anonim). *Pedoman pengobatan dasar di Puskesmas*. Departemen Kesehatan RI. 2007. hal.225
6. Rampengan T.H. *Penyakit infeksi tropik pada anak*. Ed.2. Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 2007. hal.46
7. World Health Organization. *The diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever*. 2003. Hal. 1-18.
8. Zulkarnaen I. *Demam Tifoid : Perkembangan terbaru dalam diagnosis dan terapi*. *Pertemuan ilmiah tahunan penyakit dalam*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2006.
9. Djide N. *Bakteriologi*. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Makassar. 2006. Hal.152
10. Karsinah, Lucky HM., Suharto, Mardiasuti H. W. *Enterobacteriaceae, Batang negative*. Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran. Bina Rupa Aksara. Jakarta. 1993. Hal. 154-190.
11. (Anonim). *Bakteriologi klinik*. Pusat Pendidikan Tenaga Kesehatan Departemen Kesehatan RI. Jakarta. 1989. Hal.38

DAFTAR PUSTAKA

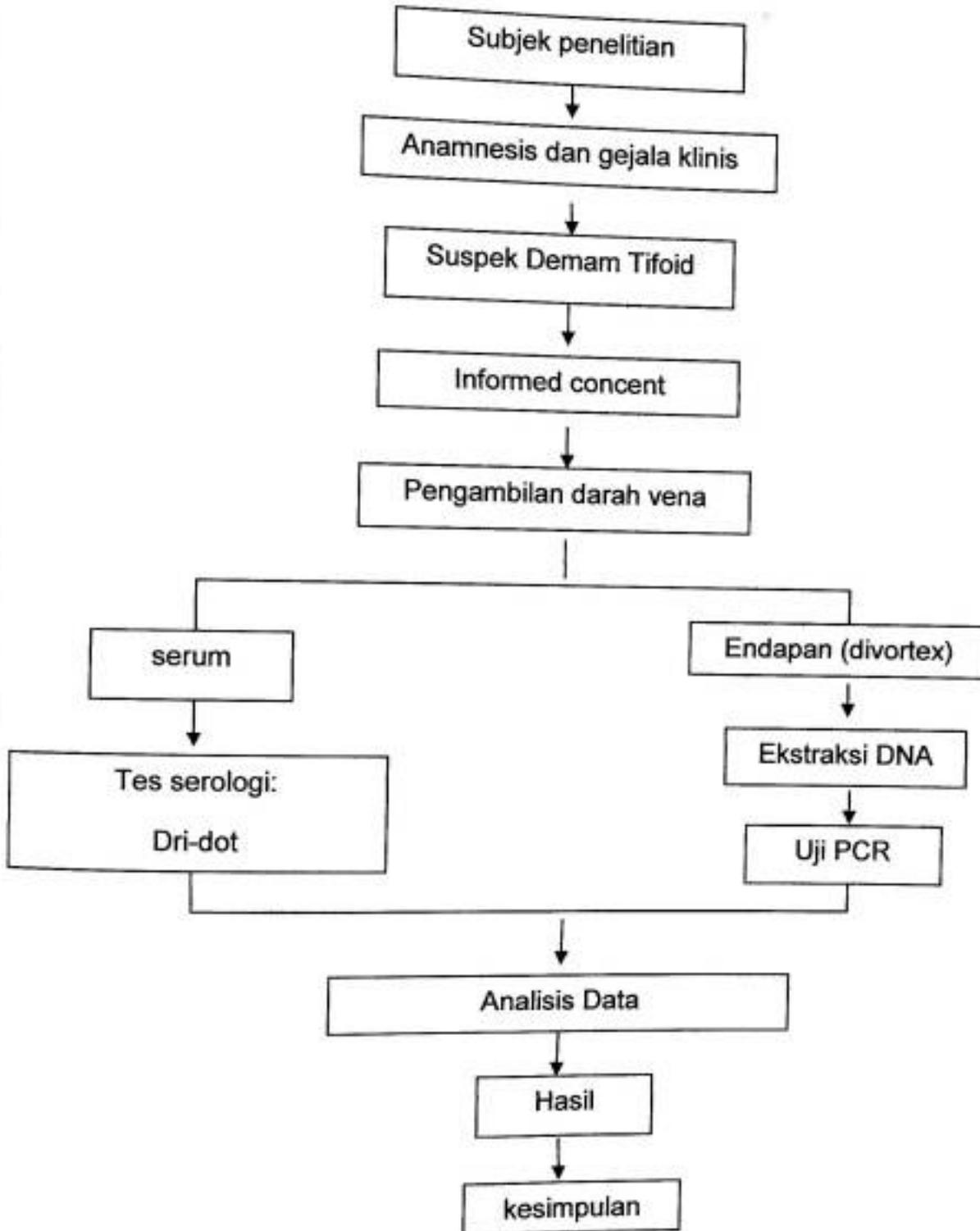
1. Handojo I. *Imunoasai terapan pada beberapa penyakit infeksi*. Airlangga University Press. Jakarta. 2004. hal.1,5,8.
2. Hatta M. *Tifoid F Dri-Dot a Salmonella typhi-specific Latex Serum Agglutination Assay for Use on human Serum Samples*. Royal tropical Institute/Koninklijk Institute Voor de Tropen (KIT).2007
3. Abdoel, T.Smits,L. Hatta, M. *Laboratory evaluation of a simple and rapid latex agglutination assay for the serodiagnosis of tifoid fever*. 2007.www.sciencedirect.com/journals/trst.
4. Soewondo S. *Perkembangan terkini dalam pengelolaan beberapa penyakit tropik infeksi*. Airlangga University Press. Jakarta. 2002. hal142.
5. (Anonim). *Pedoman pengobatan dasar di Puskesmas*. Departemen Kesehatan RI. 2007. hal.225
6. Rampengan T.H. *Penyakit infeksi tropik pada anak*. Ed.2. Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 2007. hal.46
7. World Health Organization. *The diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever*. 2003. Hal. 1-18.
8. Zulkarnaen I. *Demam Tifoid : Perkembangan terbaru dalam diagnosis dan terapi. Pertemuan ilmiah tahunan penyakit dalam*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2006.
9. Djide N. *Bakteriologi*. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Makassar. 2006. Hal.152
10. Karsinah, Lucky HM., Suharto, Mardiasuti H. W. *Enterobacteriaceae, Batang negative*. Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran. Bina Rupa Aksara. Jakarta. 1993. Hal. 154-190.
11. (Anonim). *Bakteriologi klinik*. Pusat Pendidikan Tenaga Kesehatan Departemen Kesehatan RI. Jakarta. 1989. Hal.38

12. Tambayung J. *Mikrobiologi untuk Keperawatan*. Widya Medika. Jakarta. 2000. hal.46
13. Bahrin U. *Diagnosis demam tifoid dengan tes anti-Salmonella typhi IgM*. disampaikan dalam Simposium Prodia. Makassar. 2009
14. Widodo D. *Demam tifoid dalam buku ajar ilmu Penyakit Dalam*. Edisi 4. Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK UI. 2006: 1774-1779
15. Mansjoer A., *Kapita selekta Kedokteran. Edisi ketiga, jilid 1*. FK UI. Medica Aesculapius. 2000. Hal.422
16. Juwono R. *Demam tifoid dalam buku ajar ilmu penyakit dalam*. Edisi 3. Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK UI. 2004. Hal.436
17. Yatim F. *Macam-macam penyakit menular dan cara pencegahannya, Jilid 2*. Pustaka Obor populer. Jakarta. 2007. Hal.123
18. Prasetyo RV dan Ismoedijanto. *Metode diagnostik demam tifoid pada anak*. 2009. [dikutip 1 Maret 2009]. Available from : www.pediatrik.com/buletin/06224114418-f53zji.doc
19. Syamsuhidayat R., Wim DJ. *Infeksi dan Inflamasi*. Buku Ajar Ilmu Bedah Edisi Revisi. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 1997. Hal. 3 – 70.
20. Yuwono T. *Teori dan aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Penerbit Andi. Yogyakarta. 2006. hal.1
21. Hatta, M., Mubin, A.H., Abdoel, T., Smits, H.L.. Antibody Response in Typhoid Fever in Endemic Indonesia and the Relevance of Serology and Culture to Diagnosis. *Annals Tropikal Medicine and Parasitology*. Liverpool London. 2002. Hal. 742-51
22. Taat P. *Biologi molekuler kedokteran Edisi 1*. Airlangga University Press. Surabaya.1999. hal.150
23. Hadinegoro S. *Strategi pengobatan demam tifoid pada anak, pendekatan imunologis berbagai penyakit alergi & infeksi*. Naskah lengkap Pendidikan Kedokteran Berkelanjutan Ilmu Kesehatan Anak XLIV. FKUI. Jakarta. 2001. hal 106

24. (Anonim). *Principle of PCR*. 2009. [dikutip 24 Maret 2006]. Available from : <http://www.users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.
25. Nikmawati A. Perbandingan Tes Immunoserologi, Tes Kultur dan Polymerase Chain Reaction pada Penderita Suspek Demam Tifoid. *Tesis*. Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Makassar. 2007.
26. Hardjoeno. *Interpretasi hasil tes laboratorium diagnostik*. Lembaga Penerbitan Universitas Hasanuddin (LEPHAS). Makassar. 2003.
27. Hatta M, Heerkens E, Smits HL. *Detection Of Salmonella typhi by Nested Polymerase Chain Reaction In Blood, Urine, and Stool Samples*. *Am J Trop Med Hyg*, 76(1).2007.hal.139-143
28. Baratawidjaja G.K. *Imunologi Dasar, Edisi ke-6*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 2004. Hal.27-29
29. Sacher RA, McPherson RA. *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium, Edisi 11*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 2004. Hal.3-4

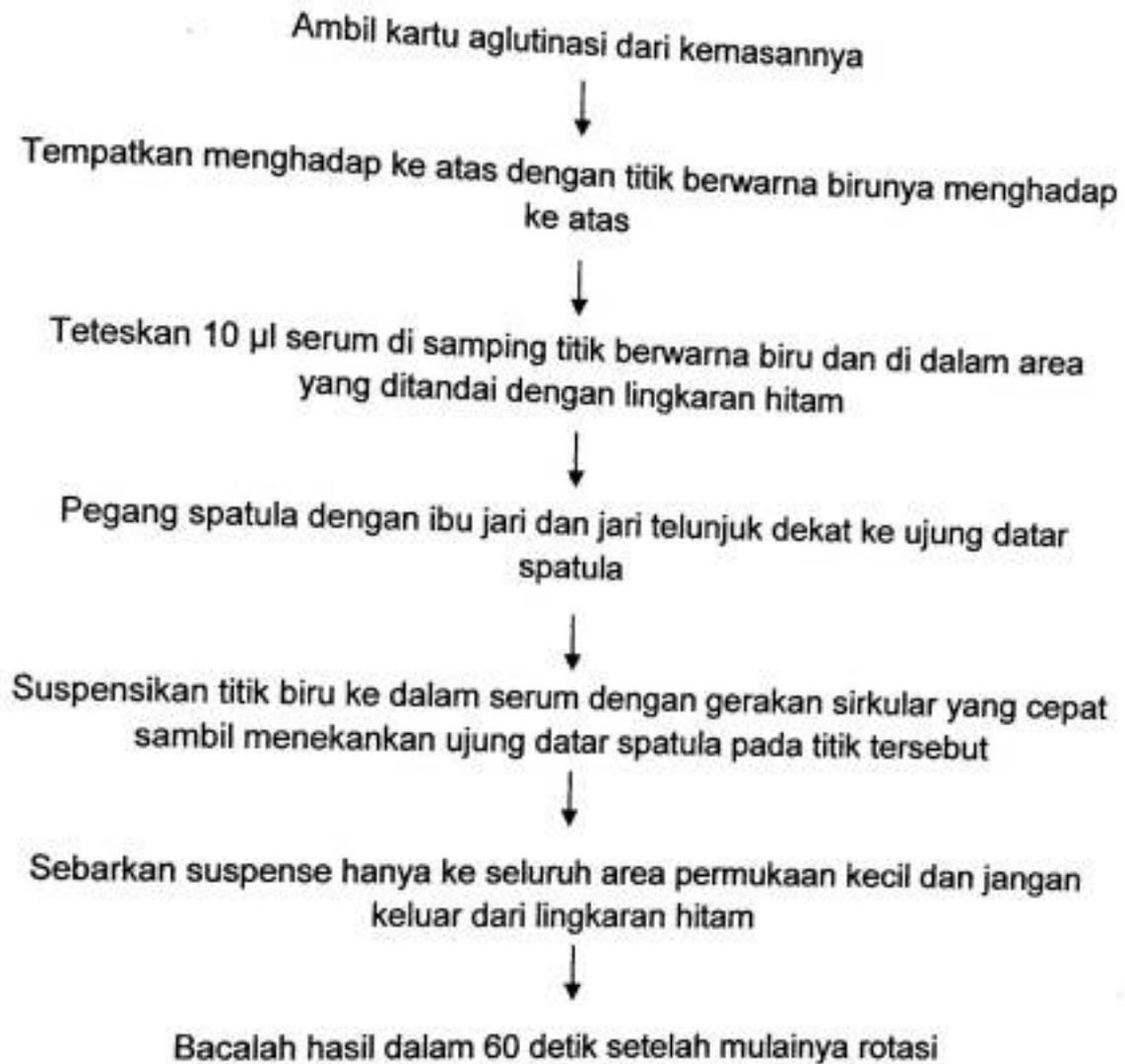
Lampiran I

Skema Alur Penelitian



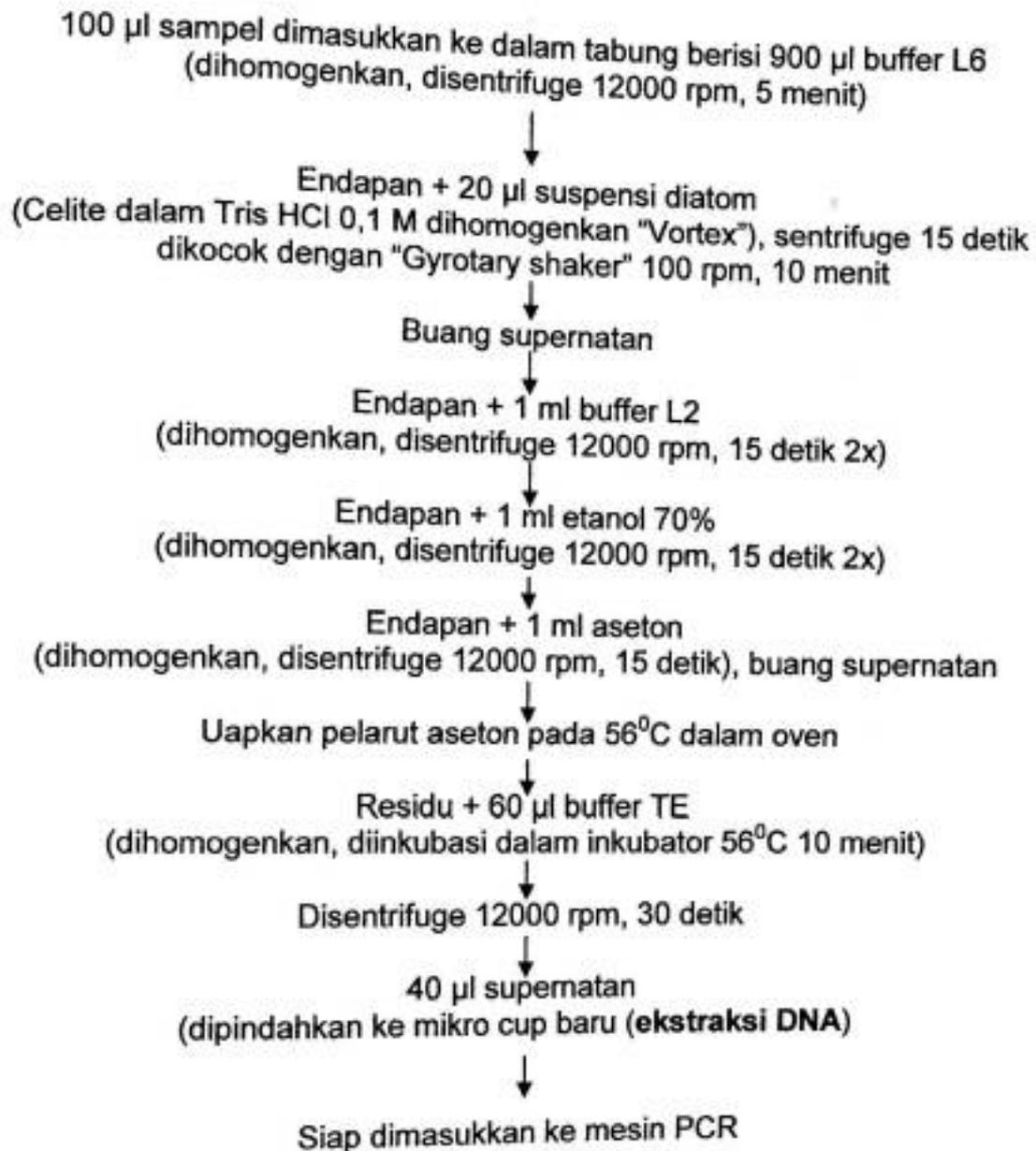
Lampiran II

Pemeriksaan Serologi Dri-dot



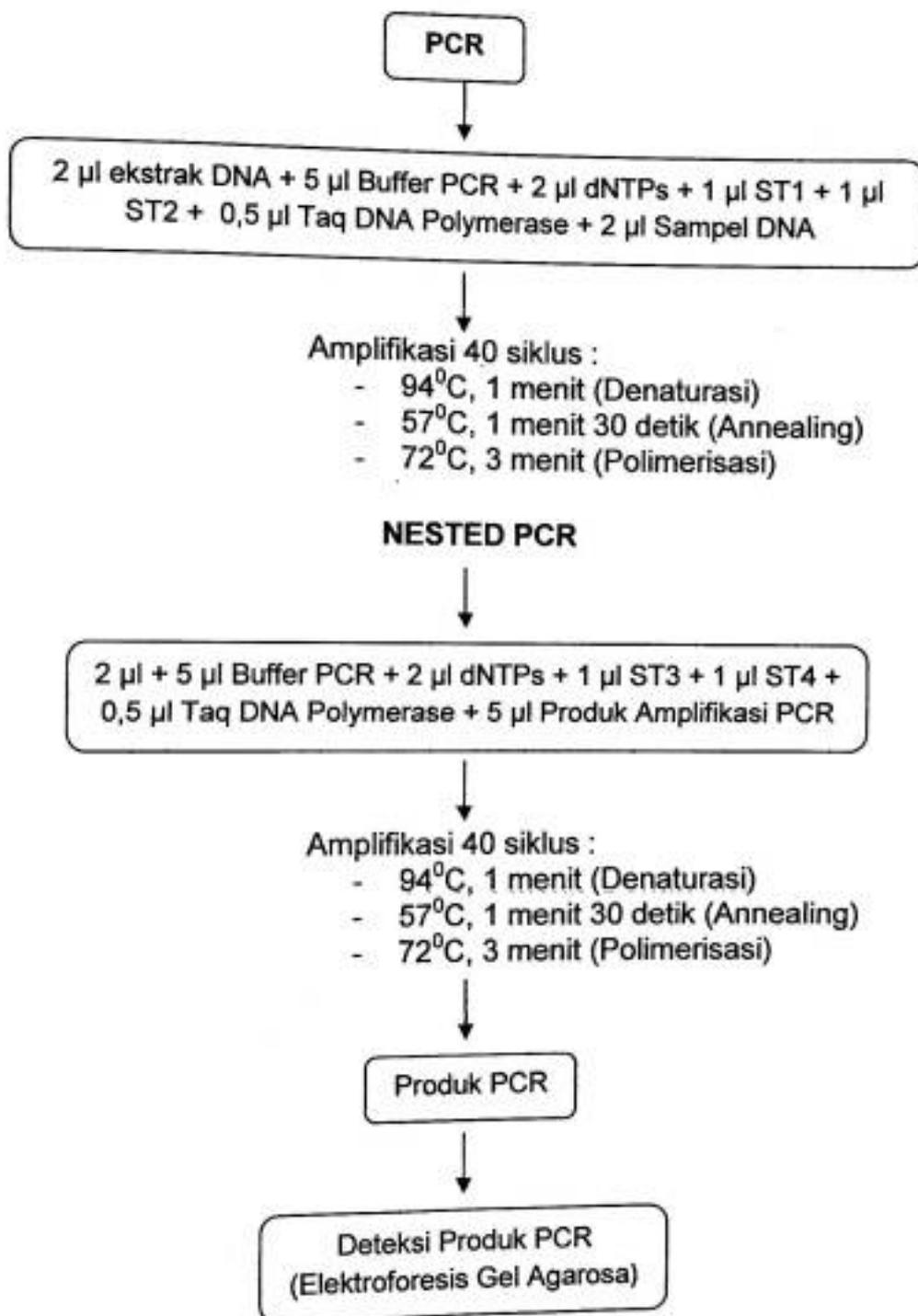
Lampiran III

Ekstraksi DNA *Salmonella typhi* dengan Metode Boom



Lampiran IV

Deteksi DNA *Salmonella typhi* dengan teknik PCR – Nested PCR



Lampiran V

Tabel 7. Hasil analisa pemeriksaan *Dri-dot* dan PCR pada penderita suspek demam tifoid

| KODE | UMUR | JK | LAMA DEMAM | SUHU (°C) | DRI-DOT | PCR |
|------|--------|----|------------|-----------|---------|-----|
| S1 | 27 Thn | P | 4 hari | 38 | - | + |
| S2 | 22 Thn | L | 5 Hari | 37,6 | - | + |
| S3 | 20 Thn | P | 3 Hari | 37,3 | + | + |
| S4 | 19 Thn | P | 4 Hari | 38 | + | + |
| S5 | 20 Thn | L | 2 Hari | 38 | - | + |
| S6 | 62 Thn | L | 3 Hari | 39 | + | + |
| S7 | 2 Thn | L | 7 Hari | 39 | + | - |
| S8 | 18 Thn | P | 3 Hari | 38 | + | + |
| S9 | 19 Thn | P | 3 Hari | 38,3 | + | + |
| S10 | 13 Thn | L | 3 Hari | 38 | + | + |
| S11 | 35 Thn | L | 4 Hari | 38 | + | + |
| S12 | 22 Thn | L | 5 Hari | 38 | - | + |
| S13 | 15 Thn | P | 3 Hari | 38 | + | + |
| S14 | 40 Thn | L | 4 Hari | 39 | + | + |
| S15 | 45 Thn | P | 3 Hari | 38 | - | - |
| S16 | 6 Thn | L | 3 Hari | 38,9 | - | + |
| S17 | 20 Thn | L | 5 Hari | 38 | - | - |
| S18 | 24 Thn | L | 4 Hari | 37,8 | - | + |
| S19 | 66 Thn | L | 3 Hari | 37,4 | - | - |
| S20 | 49 Thn | P | 3 Hari | 37,6 | + | + |
| S21 | 54 Thn | P | 3 Hari | 37,6 | + | + |
| S22 | 30 Thn | L | 3 Hari | 38 | + | + |
| S23 | 21 Thn | P | 3 Hari | 38,6 | + | + |
| S24 | 2 Thn | L | 7 Hari | 39 | + | + |
| S25 | 11 Thn | L | 3 Hari | 40 | - | + |
| S26 | 11 Thn | L | 3 Hari | 37,8 | + | + |
| S27 | 7 Thn | P | 7 Hari | 38,3 | + | + |
| S28 | 39 Thn | L | 3 Hari | 37,3 | - | + |
| S29 | 7 Thn | P | 4 Hari | 38,2 | + | + |
| S30 | 12 Thn | L | 8 Hari | 38,7 | - | - |