



**ISOLASI DAN PURIFIKASI ANTIGEN  
LIPOPOLISAKARIDA ( LPS ) *Salmonella typhi*  
ISOLAT JAYAPURA DAN REAKSI SEROLOGISNYA**

**RINI SESILIA KELANIT  
N 12107011**



PERPUSTAKAAN	17-12-09
Perihal	Farma
Daerah	kelas
Jumlahnya	1 buku
Tempat	
Angka	
Inventaris	

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



**ISOLASI DAN PURIFIKASI ANTIGEN  
LIPOPOLISAKARIDA ( LPS ) *Salmonella typhi*  
ISOLAT JAYAPURA DAN REAKSI SEROLOGISNYA**

**RINI SESILIA KELANIT  
N 12107011**



PERPUSTAKAAN	17-12-09
Primo	Farma
Dari	kelas
Jumlahnya	1 buku
Uraian	
Inventaris	

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

**ISOLASI DAN PURIFIKASI ANTIGEN LIPOPOLISAKARIDA ( LPS )**  
***Salmonella typhi* ISOLAT DARI JAYAPURA**  
**REAKSI SERELOGISNYA.**

**SKRIPSI**

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

**RINI SESILIA KELANIT**  
**N 121 07 011**

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

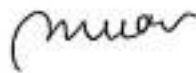
**ISOLASI DAN PURIFIKASI ANTIGEN LIPOPOLISAKARIDA ( LPS )**  
***Salmonella typhi* ISOLAT JAYAPURA**  
**DAN REAKSI SEROLOGISNYA**

**RINI SESILIA KELANIT**

**N 121 07 011**

Disetujui oleh :

Pembimbing utama,



**Prof. Dr. rer.nat Marianti A. Manggau, Apt.**  
**Nip.19670319 199203 2 002**

Pembimbing pertama,



**Prof. Dr Moch. Hatta, MDSpMK, PhD**  
**Nip.131 468 862**

Pembimbing kedua,



**Dra. Sartini, M. Si., Apt.**  
**Nip. 19611111 198703 2 001**

Pada tanggal, November 2009



## UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa, yang telah melimpahkan berkat dan karunia-Nya kepada penulis sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.

Sungguh banyak kendala yang penulis hadapi dalam rangka penyusunan skripsi ini. Namun berkat dukungan dan bantuan berbagai pihak, akhirnya penulis dapat melewati kendala-kendala yang ada. Oleh karena itu, penulis dengan tulus hati menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Ibu Prof. Dr. rer.nat Marianti A. Manggau Apt, selaku pembimbing utama, Bapak Prof. Dr. Mochammad Hatta Sp. MK, PhD, selaku pembimbing pertama, dan Ibu Dra. Sartini M. Si, Apt, selaku pembimbing kedua yang telah membimbing dan memberi masukan kepada penulis mulai dari penelitian hingga penyusunan skripsi ini.

Pada kesempatan yang baik ini pula penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar.
2. Ketua Program Konsentrasi Teknologi Laboratorium Kesehatan, para Dosen Pengajar dan seluruh Staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar.
3. Kepala Dinas Kesehatan Propinsi Papua yang telah memberikan ijin tugas belajar.

4. Direktur Rumah Sakit Umum Daerah Jayapura, Rumah Sakit Angkatan Laut Jayapura, Kepala Balai Laboratorium Kesehatan Jayapura dan Kepala Laboratorium Imunologi dan Biologi Molekuler bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.
5. Dr. Juliawati, SpPK. M.Kes, selaku kepala instalasi laboratorium RSUD Jayapura dan sebagai atasan penulis.
6. Mas Romi, Mas Sapri, Pak Mus, dan teman-teman seangkatan terutama, Hamid, Hielda, Rini Amra, Purwaningsih, Ulis.

Dan semua ini tiada artinya tanpa dukungan Ibunda tercinta, suami terkasih Martinus Mexin serta ananda tersayang, Deo, Lisa dan Septi, terima kasih atas doa, kesabaran dan pengertiannya dengan tersitanya waktu dan kasih sayang selama menjalankan pendidikan.

Akhirnya untuk semua pihak yang tidak disebutkan namanya yang telah banyak membantu kelancaran selama pendidikan maupun pada pelaksanaan penelitian sampai melakukan seminar, semoga Tuhan membalas amal dan jasa baik sekalian.

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

Makassar, Oktober 2009

**Rini Sesilia Kelanit**

## ABSTRAK

Penelitian tentang isolasi dan purifikasi antigen lipopolisakarida (LPS) *Salmonella typhi* isolat Jayapura dan reaksi serologisnya telah dilakukan pada bulan Mei sampai Agustus 2009. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan antigen lipopolisakarida yang diisolasi dari pasien suspek demam tifoid di Jayapura dan mengetahui reaksi serologisnya.. Metode yang digunakan yaitu eksperimen laboratorium dimana sampel darah sebanyak 67 sampel dilakukan uji kultur dan *Salmonella typhi* yang diperoleh diekstraksi menggunakan metoda *hot phenol water* menghasilkan antigen lipopolisakarida. Untuk reaksi serologis dilakukan uji lateral flow dan uji ELISA menggunakan antigen lipopolisakarida hasil isolasi dengan sampel serum. Hasil penelitian diperoleh stok antigen lipopolisakarida dari satu sampel kultur positif yang pada uji ELISA memberikan reaksi serologis terbaik pada konsentrasi 1/1000

## ABSTRACT

This research about the isolation and purification of antigen lipopolysakarida (LPS) *Salmonella typhi* isolate Jayapura and the reaction serology had been conducted on May until August 2009. This research is aim to gain the antigen lipopolysakarida which is isolate from the patient who suspect the tiroid fever in Jayapura which can be taken as an standard antigen in doing the serologis test. The method used is laboratory experiment which the total blood sample 67 sample had been test cultur and germ *Salmonella typhi* which get from dietracsi to become antigen lipopolysakarida, for the serologys had ben tested by Lateral Flow, and ELISA by using antigen lipopolysakarida the result of the isolation using serum. From the research we get the positive stock of antigen lipopolysakarida from one sample cultur which test on ELISA give the best serologis reaction on consentration 1/1000.



## DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENUNJUK .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH .....	iv
ABSTRAK .....	vi
ABSTRACT .....	vii
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN .....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	6
II.1. <i>Salmonella typhi</i> .....	6
II.1.1. Morfologi.....	6
II.1.2. Klasifikasi.....	6
II.1.3. Fisiologis.....	7
II.1.4. Struktur Antigen .....	8
II.1.5. Patogenesis .....	10
II.2. Sistem Imunitas Tubuh .....	13
II.2.1. Respon Imun Non Spesifik.....	13
II.2.2. Respon Imun Spesifik .....	14

II.3. Antigen dan Imunogen .....	17
II.3.1 Antigen Lipopolisakarida .....	18
II.3.2 Konsentrasi Antigen untuk reaksi serologis .....	20
II.4. Antibodi.....	23
II.5. Diagnosa Demam Tifoid.....	24
<b>BAB III. PELAKSANAAN PENELITIAN .....</b>	<b>32</b>
III.1. Jenis Penelitian .....	32
III.2. Waktu dan Lokasi Penelitian.....	32
III.3. Alat dan Bahan Penelitian.....	32
III.4. Populasi dan Sampel Penelitian .....	33
III.5. Prosedur Kerja .....	34
III.5.1. Uji Widal .....	34
III.5.2. Uji kultur.....	35
III.5.4. Ekstraksi dan Purifikasi Antigen Lipopolisakarida .....	36
III.5.5. Uji Lateral Flow .....	37
III.5.6. Uji Serologis Antigen lipopolisakarida .....	37
III.6. Analisa Data .....	38
III.7. Definisi Operasional .....	38
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>40</b>
IV.1. Hasil Penelitian.....	40
IV.2. Pembahasan .....	44
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>50</b>
V.1. Kesimpulan .....	50
V.2. Saran .....	50
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>51</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>54</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Hasil <i>Optical Density</i> (OD) rata-rata uji ELISA substrat TMB berdasarkan konsentrasi antigen LPS.....	41
2. Hasil <i>Optical Density</i> (OD) rata-rata uji ELISA substrat TMB berdasarkan pengenceran serum .....	41
3. Hasil <i>Optical Density</i> (OD) rata-rata uji ELISA substrat PnPP berdasarkan konsentrasi Ag LPS .....	42
4. Hasil <i>Optical Density</i> (OD) rata-rata uji ELISA substrat PnPP berdasarkan pengenceran serum.....	43
5. Hasil <i>Optical Density</i> (OD) rata-rata uji ELISA substrat TMB menggunakan antigen LPS Jayapura dan Ag LPS kontrol.....	43
6. Hasil uji widal, uji kultur dan uji lateral flow .....	61
7. Hasil uji ELISA menggunakan substrat TMB .....	63
8. Hasil Uji ELISA menggunakan substrat PnPP.....	64

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Morfologi <i>Salmonella typhi</i> .....	6
2. Struktur Antigen <i>Salmonella typhi</i> .....	10
3. Patogenesis infeksi Demam Tifoid .....	12
4. Pelepasan kembali antigen pada konsentrasi tinggi.....	22
5. Perubahan konfigurasi akibat pelepasan dengan kerapatan tinggi.....	23
6. Teknik-teknik Imunoasai-Enzim.....	31
7. Profil hasil uji ELISA rata-rata menggunakan substrat TMB berdasarkan konsentrasi antigen LPS.....	45
8. Profil hasil uji ELISA rata-rata menggunakan substrat TMB berdasarkan pengenceran serum.....	46
9. Profil hasil uji ELISA rata-rata menggunakan substrat PnPP berdasarkan konsentrasi Ag LPS .....	47
10. Profil hasil uji ELISA rata-rata substrat PnPP berdasarkan pengenceran serum .....	47
11. Profil uji ELISA rata-rata menggunakan antigen LPS isolat Jayapura dan Antigen LPS kontrol .....	49
12. Foto-foto Penelitian .....	73

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Morfologi <i>Salmonella typhi</i> .....	6
2. Struktur Antigen <i>Salmonella typhi</i> .....	10
3. Patogenesis infeksi Demam Tifoid .....	12
4. Pelepasan kembali antigen pada konsentrasi tinggi.....	22
5. Perubahan konfigurasi akibat pelepasan dengan kerapatan tinggi.....	23
6. Teknik-teknik Imunoasai-Enzim.....	31
7. Profil hasil uji ELISA rata-rata menggunakan substrat TMB berdasarkan konsentrasi antigen LPS.....	45
8. Profil hasil uji ELISA rata-rata menggunakan substrat TMB berdasarkan pengenceran serum.....	46
9. Profil hasil uji ELISA rata-rata menggunakan substrat PnPP berdasarkan konsentrasi Ag LPS .....	47
10. Profil hasil uji ELISA rata-rata susbtrat PnPP berdasarkan pengenceran serum .....	47
11. Profil uji ELISA rata-rata menggunakan antigen LPS isolat Jayapura dan Antigen LPS kontrol .....	49
12. Foto-foto Penelitian .....	73



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Alur Kerja Penelitian .....	54
2. Skema Alur Kerja Uji Widal .....	55
3. Skema Alur Kerja Ekstraksi dan Purifikasi Ag LPS .....	56
4. Skema Alur Kerja Uji ELISA .....	57
5. Bagan Distribusi Sampel Pada <i>Mikroplate</i> .....	59
6. Hasil Uji Widal, Uji Kultur dan Uji Lateral Flow .....	61
7. Hasil uji ELISA menggunakan substrat TMB.....	62
8. Hasil uji ELISA menggunakan substrat PnPP .....	63
9. Komposisi reagen untuk uji ELISA .....	64
10. Pengolahan data statistik .....	67
11. Foto-foto Penelitian .....	72

## DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/Singkatan	Arti
Ab	Antibodi
Ag	Antigen
C	Kontrol
EIA	<i>Enzyme Immuno Assay Dot</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
H	<i>Hauch</i>
H <sub>2</sub> S	Hidrogen Sulfida
IgA	Imunoglobulin Alfa
IgG	munoglobulin Gamma
IgM	Imunoglobulin Mu
KDO	Keto – deoksioktonat
LF	Lateral Flow
LPS	Lipopolisakarida
MCA	<i>Mac Conkey Agar</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	milli liter
MRVP	<i>Methyl Red Vages Proskaver</i>
MIF	<i>Macrofag Inhibition Factor</i>
μl	mikro liter

## DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/Singkatan	Arti
Ab	Antibodi
Ag	Antigen
C	Kontrol
EIA	<i>Enzyme Immuno Assay Dot</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
H	<i>Hauch</i>
H <sub>2</sub> S	Hidrogen Sulfida
IgA	Imunoglobulin Alfa
IgG	munoglobulin Gamma
IgM	Imunoglobulin Mu
KDO	Keto – deoksioktonat
LF	Lateral Flow
LPS	Lipopolisakarida
MCA	<i>Mac Conkey Agar</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	milli liter
MRVP	<i>Methyl Red Vages Proskaver</i>
MIF	<i>Macrofag Inhibition Factor</i>
μl	mikro liter



---

μm	mikro meter
NAD	Nangroe Aceh Darusalam
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
nm	nanno meter
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PnPP	<i>P-nitrophenil Phospat</i>
PBS	<i>Phospat buffer saline</i>
RI	Republik Indonesia
SIM	<i>Sulfite indol motility</i>
SSA	<i>Salmonella Shigella Agar</i>
T	Tes
TSIA	<i>Triple Sugar Iron Agar</i>
TMB	<i>Trimetil Bromfenol Blue</i>

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

Demam tifoid yang disebut juga *typhus abdominalis* adalah penyakit infeksi usus halus, bersifat endemik dan masih merupakan masalah kesehatan di negara berkembang, terutama di daerah tropis seperti Indonesia (1). Angka kejadian penyakit demam tifoid di Indonesia cukup besar rata-rata 900.000 kasus pertahun dengan angka kematian lebih dari 200.000 kasus dimana 91 % kasus terjadi pada usia 3 – 19 tahun (2).

Berdasarkan laporan Riset Kesehatan Dasar nasional oleh Depkes RI (2007) yang melaporkan bahwa prevalensi tifoid klinis nasional sebesar 1,6% (rentang:0,3% - 3%). Sebanyak 12 provinsi mempunyai prevalensi di atas angka nasional, yaitu provinsi NAD, Bengkulu, Jawa Barat, Banten, Nusa Tenggara Barat, Nusa Tenggara Timur, Kalimantan Selatan, Kalimantan Timur, Sulawesi Selatan, Gorontalo, Papua Barat, dan Papua. Di 18 provinsi, kasus tifoid sebagian besar terdeteksi berdasarkan diagnosis oleh tenaga kesehatan, sedang di provinsi lainnya terutama berdasarkan gejala klinis (3). Untuk prevalensi tifoid menurut diagnosis dan gejala, dari kabupaten / kota di provinsi papua berdasarkan laporan Riskesda Provinsi Papua tahun 2008 diketahui bahwa tingkat prevalensi tifoid di kota Jayapura 0,4%. Prevalensi tertinggi menurut gejala di kabupaten Pegunungan Bintang (14,3%) dan menurut diagnosis tenaga



kesehatan tertinggi ditemukan di kabupaten Jayawijaya yaitu sebesar 2,8 % (4).

Demam tifoid disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi*, yaitu bakteri gram negatif yang hanya menginfeksi manusia (1). Gambaran klinis penyakit demam tifoid sangat bervariasi dari penyakit yang ringan dan tidak terdiagnosis, sampai gambaran penyakit yang khas dengan komplikasi dan kematian (5).

Salah satu kunci keberhasilan pengendalian demam tifoid adalah pencarian kasus yang diikuti terapi dini dan akurat disamping penyuluhan kesehatan dan vaksinasi. Tes ideal untuk suatu pemeriksaan laboratorium seharusnya bersifat sensitif, spesifik dan diketahui hasilnya (6).

Isolasi *Salmonella typhi* dari spesimen klinis yang berasal dari tubuh penderita adalah *gold standard* untuk diagnosa pasti demam tifoid, namun membutuhkan waktu cukup lama dan sensitivitasnya dipengaruhi oleh banyak faktor (1).

Pemeriksaan laboratorium untuk menegakkan diagnosis demam tifoid yang ada sampai saat ini adalah dengan metode konvensional, yaitu kultur dan uji serologi Widal serta metode non-konvensional, yaitu antara lain *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, *Enzyme Immunoassay Dot (EIA)*, dan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* (5).

Tes serologi yang didasarkan deteksi antibodi sebagai alternatif yang mudah dan cepat. Sejak diketahui kegunaan uji Widal pada tahun 1896 yang menggunakan suspensi bakteri *S. typhi* untuk demam tifoid, sampai



kesehatan tertinggi ditemukan di kabupaten Jayawijaya yaitu sebesar 2,8 % (4).

Demam tifoid disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi*, yaitu bakteri gram negatif yang hanya menginfeksi manusia (1). Gambaran klinis penyakit demam tifoid sangat bervariasi dari penyakit yang ringan dan tidak terdiagnosis, sampai gambaran penyakit yang khas dengan komplikasi dan kematian (5).

Salah satu kunci keberhasilan pengendalian demam tifoid adalah pencarian kasus yang diikuti terapi dini dan akurat disamping penyuluhan kesehatan dan vaksinasi. Tes ideal untuk suatu pemeriksaan laboratorium seharusnya bersifat sensitif, spesifik dan diketahui hasilnya (6).

Isolasi *Salmonella typhi* dari spesimen klinis yang berasal dari tubuh penderita adalah *gold standard* untuk diagnosa pasti demam tifoid, namun membutuhkan waktu cukup lama dan sensitivitasnya dipengaruhi oleh banyak faktor (1).

Pemeriksaan laboratorium untuk menegakkan diagnosis demam tifoid yang ada sampai saat ini adalah dengan metode konvensional, yaitu kultur dan uji serologi Widal serta metode non-konvensional, yaitu antara lain *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, *Enzyme Immunoassay Dot (EIA)*, dan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* (5).

Tes serologi yang didasarkan deteksi antibodi sebagai alternatif yang mudah dan cepat. Sejak diketahui kegunaan uji Widal pada tahun 1896 yang menggunakan suspensi bakteri *S. typhi* untuk demam tifoid, sampai

saat ini uji tersebut masih merupakan uji serologi yang paling banyak dipakai untuk menunjang diagnosis demam tifoid, meskipun diketahui mempunyai banyak kelemahan. Dari hasil penelitian Schroeder pada tahun 1968 disimpulkan bahwa uji Widal ini kurang spesifik dan salah satu penyebabnya yaitu karena konsentrasi suspensi antigen yang digunakan (6).

Uji widal memberikan informasi yang tidak kuat oleh karena antara lain *S. typhi* mempunyai antigen O dan antigen H yang sama dengan *salmonella* lainnya, maka kenaikan titer antibodi dalam populasi daerah endemis yang secara konstan terpapar dengan organisme tersebut dan mempunyai titer antibodi mungkin lebih tinggi dari pada daerah non endemis pada orang yang tidak sakit sekalipun. Selain itu reaksi silang dapat terjadi apabila antibodi yang dihasilkan dari antigen non-tifoid bereaksi dengan antigen *S.typhi* yaitu Malaria, Dengue, Tuberculosis Miler, endokarditis, penyakit hati kronik, Brusellosis dan lain-lain ( 7,8 ).

Suwahyo pada tahun 1997 dalam penelitiannya membuktikan bahwa uji Widal yang dilakukan dengan menggunakan *S. typhi* yang berasal dari daerah endemis Surabaya lebih spesifik secara bermakna dibandingkan dengan uji Widal yang menggunakan antigen *S. typhi* yang berasal dari luar daerah endemis Surabaya pada penderita yang sama (9). Suspensi antigen yang diisolasi dari strain *Salmonella* setempat akan lebih baik dari suspensi antigen dari strain lain (10).

saat ini uji tersebut masih merupakan uji serologi yang paling banyak dipakai untuk menunjang diagnosis demam tifoid, meskipun diketahui mempunyai banyak kelemahan. Dari hasil penelitian Schroeder pada tahun 1968 disimpulkan bahwa uji Widal ini kurang spesifik dan salah satu penyebabnya yaitu karena konsentrasi suspensi antigen yang digunakan (6).

Uji widal memberikan informasi yang tidak kuat oleh karena antara lain *S. typhi* mempunyai antigen O dan antigen H yang sama dengan *salmonella* lainnya, maka kenaikan titer antibodi dalam populasi daerah endemis yang secara konstan terpapar dengan organisme tersebut dan mempunyai titer antibodi mungkin lebih tinggi dari pada daerah non endemis pada orang yang tidak sakit sekalipun. Selain itu reaksi silang dapat terjadi apabila antibodi yang dihasilkan dari antigen non-tifoid bereaksi dengan antigen *S.typhi* yaitu Malaria, Dengue, Tuberculosis Miler, endokarditis, penyakit hati kronik, Brusellosis dan lain-lain ( 7,8 ).

Suwahyo pada tahun 1997 dalam penelitiannya membuktikan bahwa uji Widal yang dilakukan dengan menggunakan *S. typhi* yang berasal dari daerah endemis Surabaya lebih spesifik secara bermakna dibandingkan dengan uji Widal yang menggunakan antigen *S. typhi* yang berasal dari luar daerah endemis Surabaya pada penderita yang sama (9). Suspensi antigen yang diisolasi dari strain *Salmonella* setempat akan lebih baik dari suspensi antigen dari strain lain (10).

Antigen lipopolisakarida (LPS) yang dikenal sebagai antigen O merupakan suatu faktor virulen dan antigen penting *Salmonella typhi*. Antigen ini bersifat spesifik group dan merupakan suatu endotoksin yang dapat menimbulkan *septic shock* bagi manusia (7,11). Antibodi terhadap antigen O adalah Immunoglobulin M (Ig M). Ig M muncul paling awal, 3-4 hari setelah terjadi demam. Dari penelitian yang dilakukan oleh Razel Kawano di Filipina tahun 2005 diperoleh hasil bahwa spesifitas dan sensitivitas antigen lipopolisakarida > 90% (12).

Jayapura merupakan daerah endemis demam tifoid yang mana hampir semua rumah sakit yang ada melakukan uji serologis Widal dalam menegakkan diagnosa demam tifoid. Dan antigen yang digunakan merupakan antigen import yang diisolasi dari daerah lain.

Berdasarkan uraian di atas maka perlu dilakukan penelitian untuk mengisolasi antigen lipopolisakarida yang berasal dari strain *Salmonella typhi* setempat yaitu lokal jayapura yang dapat menjadi antigen standar untuk melakukan uji serologis dalam menegakkan diagnosa dini penyakit demam tifoid.

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana mendapatkan antigen lipopolisakarida *Salmonella typhi* yang diisolasi dari penderita demam tifoid di Jayapura dan berapa konsentrasi yang tepat untuk uji serologis.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan antigen lipopolisakarida *Salmonella typhi* yang diisolasi dari Jayapura, yang dapat dijadikan

Antigen lipopolisakarida (LPS) yang dikenal sebagai antigen O merupakan suatu faktor virulen dan antigen penting *Salmonella typhi*. Antigen ini bersifat spesifik group dan merupakan suatu endotoksin yang dapat menimbulkan *septic shock* bagi manusia (7,11). Antibodi terhadap antigen O adalah Immunoglobulin M (Ig M). Ig M muncul paling awal, 3-4 hari setelah terjadi demam. Dari penelitian yang dilakukan oleh Razel Kawano di Filipina tahun 2005 diperoleh hasil bahwa spesifitas dan sensitivitas antigen lipopolisakarida > 90% (12).

Jayapura merupakan daerah endemis demam tifoid yang mana hampir semua rumah sakit yang ada melakukan uji serologis Widal dalam menegakkan diagnosa demam tifoid. Dan antigen yang digunakan merupakan antigen import yang diisolasi dari daerah lain.

Berdasarkan uraian di atas maka perlu dilakukan penelitian untuk mengisolasi antigen lipopolisakarida yang berasal dari strain *Salmonella typhi* setempat yaitu lokal jayapura yang dapat menjadi antigen standar untuk melakukan uji serologis dalam menegakkan diagnosa dini penyakit demam tifoid.

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana mendapatkan antigen lipopolisakarida *Salmonella typhi* yang diisolasi dari penderita demam tifoid di Jayapura dan berapa konsentrasi yang tepat untuk uji serologis.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan antigen lipopolisakarida *Salmonella typhi* yang diisolasi dari Jayapura, yang dapat dijadikan



sebagai antigen standar dalam melakukan uji serologis guna membantu menegakkan diagnosa demam tifoid.

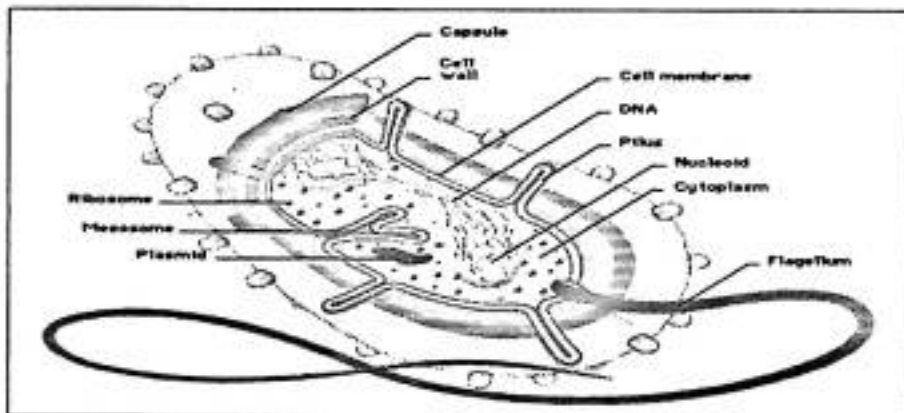
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1. *Salmonella typhi*

##### II.1.1. Morfologi

*Salmonella typhi* merupakan salah satu spesies dari *Enterobacteriaceae* bentuk batang gram negatif dengan panjang 2 – 3  $\mu\text{m}$  dan diameter 0,4 – 06  $\mu\text{m}$ , tidak berkapsul, tidak berspora, bergerak aktif dengan flagella peritrik (11, 13).



Gambar 1. Morfologi *Salmonella typhi* (Sumber: Abyankar. *Antigenic Structure Of Salmonella*. <http://www.geocities.com/pustaka/avinas/antigen.htm> . )

##### II.1.2. Klasifikasi

Klasifikasi bakteri *Salmonella typhi* menurut Garrity (16).

- Kingdom : *Procaryotae*  
Phylum : *Proteobacteria*  
Class : *Gamaproteobacteria*  
Ordo : *Enterobacteriales*

Familia : *Enterobacteriaceae*

Genus : *Salmonella*

Spesies : *Salmonella typhi*

### II.1.3.Fisiologis

*Salmonella typhi* bersifat fakultatif aerob, dapat memproduksi H<sub>2</sub>S, memfermentasi glukosa dan mannose tanpa memproduksi gas tetapi tidak memfermentasi laktosa dan sukrosa. Spesies ini berbeda dengan lainnya karena tidak dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbon, memberi hasil negatif pada reaksi indol, fenil alanin, serta tidak tumbuh dalam medium Kalium Cianida ( KCN) ( 11,17 ).

*Salmonella typhi* dapat tumbuh pada suhu antara 5 – 47 °C, dengan suhu optimum 35 – 37 °C. Beberapa sel tetap hidup selama penyimpanan beku, tumbuh pada pH optimum 6,5 – 7,5. Nilai pH minimum dapat bervariasi bergantung kepada serotipe, suhu inkubasi, komposisi media dan jumlah sel. Pada *Salmonella Shigella Agar* (SSA), EMB dan *Mac Conkey Agar*, koloni kuman berbentuk bulat kecil dan tidak berwarna. Pada Agar Wilson – Blair koloni berwarna hitam (13, 17).

*Salmonella typhi* mati pada pemanasan suhu 55 °C selama 1 jam atau 60°C selama 15 – 20 menit. Dalam air dan es dapat bertahan dalam waktu lama. Tumbuh subur pada medium yang mengandung garam empedu, tahan terhadap zat kimia seperti *briliant green*, *sodium deoksitionat* dan *sodium tetrionat*.

Bakteri ini juga mati dalam pemanasan basah, seperti pada suhu 50 °C selama 1 jam, atau pada suhu 60 C selama 15 menit. Pada biakan, *Salmonella typhi* sanggup bertahan selama beberapa bulan, bahkan beberapa tahun. Di luar tubuh individu, di lingkungan alam yang basah, *Salmonella typhi* dan *Salmonella* lainnya secara bertahap akan mati, tetapi beberapa minggu lamanya, misalnya pada tanah yang basah atau air limbah yang kotor. Pada keadaan kering *Salmonella* lebih cepat mati dalam beberapa jam, sehingga penyebaran melalui debu atau material yang terkontaminasi sangat kecil dari pada penyebaran melalui air atau bahan makanan yang basah (11,19).

#### **II.1.4.Struktur Antigen**

*Salmonella typhi* memiliki tiga jenis antigen yaitu (7, 9, 11):

##### **a. Antigen O**

Antigen O merupakan antigen somatik yang terdapat di lapisan dinding luar bakteri. Struktur kimianya terdiri dari lipopolisakarida ( LPS ) dan lipid. Antigen O bersifat hidrofilik dan memungkinkan bakteri membentuk suspensi homogen dalam larutan salin. Antigen ini dapat tahan terhadap panas hingga suhu 100 °C selama 2 – 5 jam, dan terhadap alkohol 96 % pada suhu 37 °C selama 4 jam. Antigen O apabila dalam tubuh merespon terbentuknya antibodi Imunoglobulin M (IgM). Antigen O mempunyai susunan kimia determinan antigenik O yaitu : lipid A, adalah lipid dari lipopolisakarida (LPS) yang bertanggung jawab atas toksisitas dari endotoksin, *Basal Core Polysacharida* yang bertanggung

jawab atas spesifik antigen, dan *O - spesifik chains*, yang menentukan spesifitas serologik dari LPS ( 11,13).

#### **b. Antigen H**

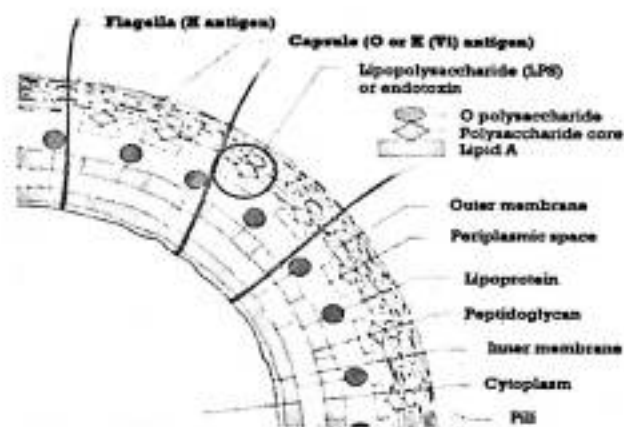
Antigen H ( = *Hauch* ) terdapat di flagella, fimbria dan pili pada bakteri yang mempunyai komponen protein. *Salmonella typhi* mempunyai antigen H *phase 1* tunggal yang juga dimiliki beberapa *Salmonella* lain. Antigen ini labil terhadap Formaldehid 0,04 – 0,2 %. Pemanasan dengan suhu melebihi 60°C akan melepaskan flagella dari bakteri. Antigen H dalam tubuh akan merespon terbentuknya antibodi Immunoglobulin G (Ig G).

#### **C. Antigen Vi**

Antigen Vi adalah kapsul yang melindungi tubuh bakteri dari fagositosis, dan merupakan polimer dari polisakarida yang bersifat asam, terdapat pada selaput dinding bagian luar bakteri. Hampir semua strain *Salmonella typhi* membentuk antigen Vi sebagai lapisan pelindung dari luar dinding selnya. Antigen Vi tidak aktif terhadap pemanasan suspensi pada suhu 100 °C selama 1 jam dan pemisahan bakteri dengan sentrifugasi dari cairan yang mengandung antigen Vi. Antigen Vi biasanya tidak digunakan untuk menentukan diagnosis infeksi, tetapi hanya dipakai untuk mendeteksi carrier.

Ketiga jenis antigen tersebut dalam tubuh penderita akan menimbulkan tiga macam antibodi yaitu aglutinin O, aglutinin H dan agglutinin Vi. Pada demam tifoid antibodi terhadap antigen O atau

antigen H dapat meningkat pada minggu pertama dan mencapai puncak pada akhir minggu ketiga. Sedangkan antibodi terhadap antigen Vi terbentuk lebih lambat dan dapat terjadi peningkatan titer yang berarti setelah satu bulan. Peningkatan titer antibodi terhadap antigen O dan H dapat bertahan sampai beberapa bulan (20).



Gambar 2. Struktur antigen *Salmonella typhi* (Sumber: Struktur antigen *S.typhi*. [www.vphcap.org/file/thesis/mr.arsooth/chapte 2.pdf](http://www.vphcap.org/file/thesis/mr.arsooth/chapte%202.pdf) diakses tanggal 27 april 2009)

### II.1.5 Patogenesis

Masuknya *Salmonella typhi* ke dalam tubuh manusia terjadi melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi. Sebagian *S.typhi* dimusnahkan dalam lambung, sebagian lolos ke dalam usus halus dan berkembang biak (19, 24, 25). Bila respon imunitas humoral mukosa (IgA) usus kurang baik maka kuman akan menembus sel-sel epitel (terutama sel-M) dan selanjutnya ke lamina propia. Di lamina propia berkembang biak dan difagosit oleh sel-sel fagosit terutama oleh sel makrofag. Kuman dapat hidup dan berkembang biak dalam makrofag dan selanjutnya



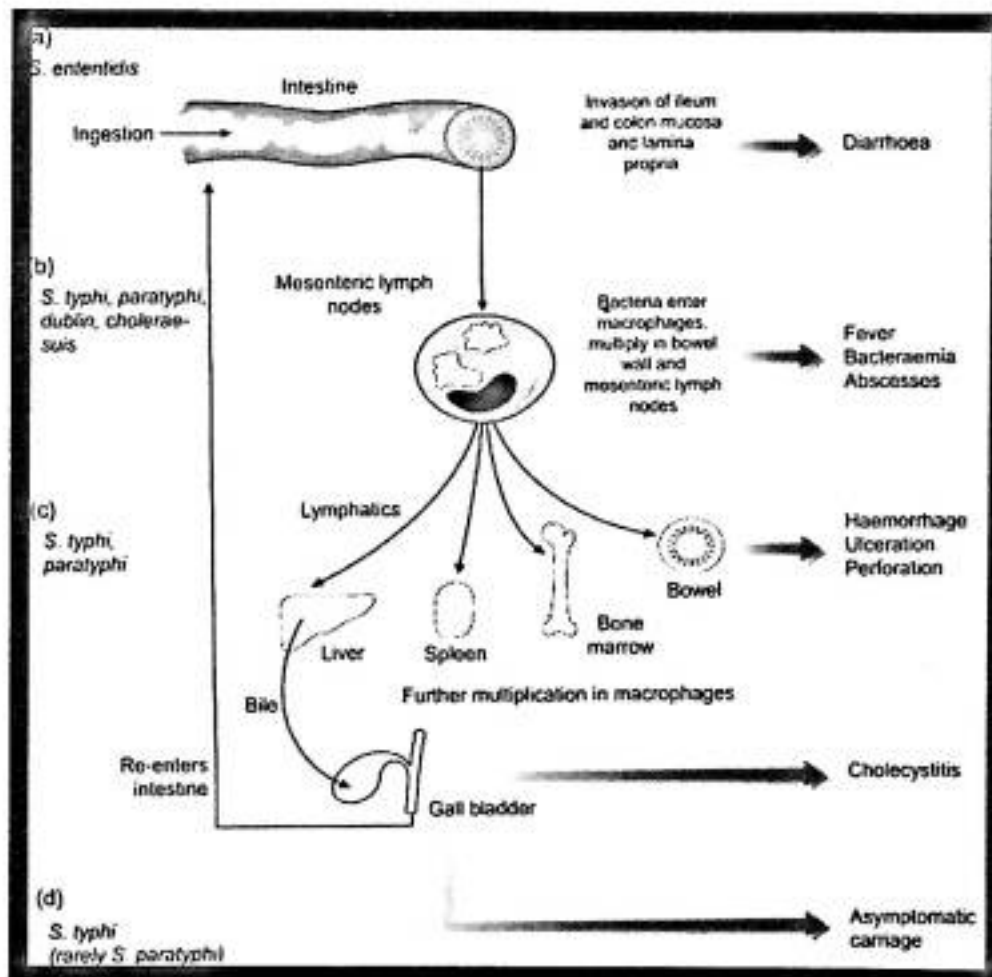
dibawa ke *plague peyeri ileum distal* kemudian ke kelenjar getah bening mesenterika. Selanjutnya melalui duktus torasikus kuman yang terdapat di dalam makrofag ini masuk ke dalam sirkulasi darah (mengakibatkan bakterimia pertama yang asimtomatik) dan menyebar ke seluruh organ retikulo endotelial tubuh terutama hati dan limpa. Di organ-organ ini kuman meninggalkan sel-sel fagosit dan berkembang biak di luar sel atau ruang sinusoid dan selanjutnya masuk ke dalam sirkulasi darah lagi mengakibatkan bakterimia yang kedua kalinya dengan disertai tanda-tanda dan gejala penyakit infeksi sistemik (24).

Di dalam hati, kuman masuk ke dalam kandung empedu, berkembang biak, dan bersama cairan empedu diekskresikan secara "intermittent" ke dalam lumen usus. Sebagian kuman dikeluarkan melalui feses dan sebagian lagi ke dalam sirkulasi setelah menembus usus. Proses yang sama terulang kembali, berhubung makrofag telah beraktivasi dan hiperaktif maka saat fagositosis *Salmonella typhi*, 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 (10, 24).

Di dalam *plague peyeri* makrofag hiperaktif menimbulkan reaksi hiperplasia jaringan (*S. typhi* intra makrofag menginduksi reaksi hipersensitivitas tipe lambat, hiperplasia jaringan dan nekrosis organ). Perdarahan saluran cerna dapat terjadi akibat reaksi pembuluh darah

sekitar *plague peyeri* yang sedang mengalami nekrosis dan hiperplasia akibat akumulasi sel-sel mononuclear di dinding usus. Proses patologis jaringan limfoid ini dapat berkembang hingga ke lapisan otot, serosa usus, dan mengakibatkan perforasi (1,10).

Endotoksin dapat menempel di reseptor sel endotel kapiler dan mengakibatkan timbulnya komplikasi seperti gangguan neuropsikiatrik, kardiovaskular, pemapasan, dan gangguan organ lainnya (10,24).



Gambar.2. Patogenesis Infeksi Demam Tifoid (Sumber: Bahrin, U. *Diagnosis demam tifoid dengan tes anti-Salmonella typhi IgM*. disampaikan dalam Simposium Prodia. Makassar. 2009)



## **II.2.Sistem Imunitas Tubuh**

Sistem imun ialah semua mekanisme yang digunakan tubuh untuk mempertahankan tubuh sebagai perlindungan terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup (26). Infeksi yang terjadi pada orang normal umumnya singkat dan jarang meninggalkan kerusakan permanen. Hal ini disebabkan tubuh memiliki sistem imun yang memberikan respon dan melindungi tubuh terhadap unsur-unsur patogen tersebut (27).

Respon imun sangat bergantung pada kemampuan sistem imun untuk mengenali molekul-molekul asing (antigen) yang terdapat pada patogen potensial dan kemudian membangkitkan reaksi yang cepat untuk menyingkirkan sumber antigen bersangkutan(20). Kemampuan ini dimiliki oleh komponen sistem imun yang terdapat pada jaringan limforetikuler yang letaknya tersebar di seluruh tubuh, misalnya di dalam sum-sum tulang, kelenjar limfe, limpa, timus, sistem saluran pemapasan, saluran cerna, dan organ-organ lain (28).

Bila sistem imun terpapar pada zat yang dianggap asing, dalam hal ini antigen *Salmonella typhi* maka ada dua jenis respon imun yang mungkin terjadi yaitu respon imun non spesifik dan respon imun spesifik (27).

### **II.2.1.Respon Imun non spesifik**

Respon imun non spesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme karena dapat

memberikan respon langsung tanpa memerlukan pengenalan antigen sebelumnya (25).

Respon imun non spesifik umumnya merupakan imunitas bawaan (*innate immunity*) dalam arti bahwa respon terhadap zat asing dapat terjadi walaupun tubuh tidak pernah terpapar pada zat tersebut. Sel-selnya terdiri dari sel makrofag, sel *Natural Killer* (NK) dan sel mediator (27, 28).

Asam lambung (pH <3,5) sebagai barier pertama untuk mematikan kuman penyebab infeksi saluran cerna. Pada individu yang sehat, jumlah *Salmonella typhi* di dalam lambung akan berkurang sehingga sedikit saja kuman yang masuk usus. Motilitas usus juga akan, melindungi usus dengan cara menangkap kuman dengan cepat. Bakteri anaerob di dalam usus mampu merintangi pertumbuhan *Salmonella typhi* dengan membentuk asam lemak (19,26).

Setelah menembus epitel mukosa usus halus dan membran basalis, *S. typhi* akan bertemu dengan sistem jaringan limfoid, sel fagosit dan cairan jaringan. Apabila *Salmonella typhi* berhasil difagosit, kuman akan hidup dan berkembang biak dalam sel. Hal ini karena terjadi penurunan metabolisme, oksidatif pasca fagositik dalam fagosit, yang diperlukan dalam proses bakterisida (19).

## **II. 2.2 Respon Imun Spesifik.**

Respon imun spesifik merupakan respon didapat (*acquired*) yang timbul terhadap antigen tertentu, dimana tubuh pernah terpapar sebelumnya. Benda asing yang pertama kali muncul dalam tubuh segera



dikenal oleh sistem imun spesifik sehingga terjadi sensitasi terhadap antigen tersebut. Bila sel sistem imun seluler berpaparan kembali dengan benda asing yang sama, maka benda asing yang terakhir ini akan dikenal dengan cepat kemudian dihancurkan olehnya (19).

Sistem imun spesifik dapat bekerja tanpa bantuan sistem imun non spesifik untuk menghancurkan benda asing yang berbahaya bagi tubuh, tetapi pada umumnya terjadi kerja sama yang baik antara antibodi – komplemen – fagosit dan antara sel T- makrofag (26, 27).

Respon imun spesifik terdiri dari sel limfosit yang merupakan kunci pengontrol sistem imun, terdapat dua macam respon spesifik yaitu respon imun humoral (sel B) dan respon imun seluler (sel T) (19,26).

#### **a. Respon Imun Humoral**

Yang berperan dalam respon imun humoral adalah limfosit B atau sel B yang oleh rangsangan antigen (misalnya *Salmonella typhi*) akan berpoliferasi dan berkembang menjadi sel plasma yang dapat mensintesa antibodi (imunoglobulin). Fungsi utama dari respon humoral yaitu menghasilkan antibodi yang berfungsi sebagai pertahanan infeksi ekstraseluler Virus dan bakteri serta menetralsir toksinnya (25).

Infeksi primer umumnya merangsang terbentuknya Imunoglobulin M<sub>u</sub> (Ig M) dan kemudian disusul oleh Imunoglobulin Gamma (Ig G). Selain itu juga terjadi peningkatan sintesa Imunoglobulin ALFA (Ig A) terutama secretory Ig A (slg A) yang berperan dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi mukosa (25).

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa antibodi yang dibentuk oleh antigen O, H dan Vi dan *Salmonella typhi* meningkat secara signifikan pada penderita demam tifoid pada minggu pertama sakit, akan tetapi tidak selamanya menunjukkan peningkatan titer 4 kali atau lebih. Banyak laporan penelitian menunjukkan bahwa tingginya titer antibodi yang dibentuk oleh antigen O, H dan Vi tidak mempengaruhi daya tahan tubuh terhadap penyakit. Tingginya titer antibodi juga tidak mempengaruhi berat ringannya penyakit (19, 28).

#### **b. Respon imun seluler**

Yang berperan dalam respon imun seluler adalah limfosit T atau sel T. Pada orang dewasa Sel T dibentuk di dalam sum-sum tulang tetapi proliferasi dan diferensiasinya terjadi di kelenjar timus. Fungsi utama respon imun seluler yaitu pertahanan terhadap bakteri yang hidup intra seluler, virus, Jamur, parasit dan keganasan (28).

Respon imun seluler sangat penting untuk penyembuhan penyakit, karena sifat kuman yang dapat bermutiplikasi di dalam sel. Sistem imunitas seluler merupakan suatu kompleks interaksi antara sel limfosit T dengan fagosit mononuklear untuk membunuh mikroorganisme yang tidak dapat diatasi oleh mekanisme respon humoral dan fagosit PMN (11,18,19).

Antigen penyebab infeksi akan menstimulasi limfosit T membentuk faktor *soluble* yang disebut limfokin seperti *Makrofag Actifation Factor* (MAF) dan *Macrofag Inhibition factor* (MIF) yang dilepas sel T terhadap

monosit yang akhirnya menempel pada vena dan menghambat monosit ke jaringan lain. Limfokin ini akan mengaktifkan makrofag dan menyebabkan makrofag tersebut berkumpul di tempat terjadinya invasi kuman(19).

### **II.3. Antigen dan imunogen**

Imunogenitas suatu substansi yaitu yang menunjukkan kemampuan substansi bersangkutan bila masuk ke dalam tubuh untuk merangsang respon imun, baik respon seluler maupun respon humoral ataupun keduanya. Istilah antigen dahulu diartikan sebagai molekul yang dapat merangsang pembentukan antibodi, tetapi sekarang istilah antigen digunakan untuk menyebut substansi yang mampu bereaksi dengan antibodi yang diproduksi atas rangsangan imunogen, tanpa mempertimbangkan apakah antigen itu sendiri bersifat imunogenik. Ini berarti bahwa semua imunogen adalah antigen, tetapi tidak semua antigen merupakan imunogen (27).

Hampir semua molekul biologik, termasuk karbon hidrat, lipid, protein dan asam nukleat dapat bertindak sebagai antigen, tetapi hanya makromolekul yang bersifat imunogenik dan mampu merangsang aktivasi limfosit yang diperlukan untuk mengawali respon imun (27, 28).

Secara umum antigen digolongkan dalam antigen eksogen yaitu antigen yang berasal dari luar tubuh seseorang, misalnya berbagai jenis bakteri, virus, obat, dan antigen endogen yang terdapat di dalam tubuh. Yang termasuk golongan antigen endogen adalah antigen *Xenogenic* atau heterolog yang terdapat dalam spesies yang berlainan, antigen autolog

atau idiotipik yang merupakan komponen tubuh sendiri, dan antigen *allogenic* atau homolog yang membedakan satu individu dari individu yang lain dalam spesies yang sama. Contoh determinan antigen homolog adalah antigen yang terdapat pada eritrosit, leukosit, trombosit, protein serum, dan *Major Histocompatibility Complex* ( MHC ) (26).

### **II.3.1. Antigen Lipopolisakarida**

Antigen lipopolisakarida merupakan makromolekul yang sangat kompleks, sering disebut sebagai antigen somatik atau antigen O. Struktur antigen lipopolisakarida terdiri dari tiga unit (29) :

#### **1.unit 1**

Merupakan polimer dari unit Oligosakarida yang spesifik, tersusun dari 3-4 monosakarida yang berulang. Perbedaan pada unit ini yang dapat dipakai untuk membedakan sub group pada suatu genus.

#### **2.Unit 2**

Unit 2 ini melekat pada unit 1, terdiri dari inti polisakarida yang dibedakan atas inti dalam yang terdiri dari 2 keto – 3 deoksioktonat (KDO), heptosa, fosfat, pirofosfat dan inti luar yang terdiri dari heksosa, glukosa, galaktosa dan N-asetil glukosamin. Unit ini konstan pada satu genus tetapi berbeda antara genera.

#### **3.Unit 3**

Unit 3 ini melekat pada unit 2, terdiri dari lipid A yang merupakan bagian molekul yang toksin, menghubungkan LPS dengan lapisan murein lipoprotein. Sebagai contoh antigen lipopolisakarida adalah antigen pada

genus *Salmonella*. Pada antigen bakteri yang telah banyak dipelajari ini ditunjukkan hubungan antara serologi dan struktur kimianya. Umumnya struktur inti dari lipopolisakarida *Salmonella* tersusun atas D-glukosa, D-glaktosa, N-asetil-Dglukosamin, heptosa, dan asam ketodeoksiotonat. Pada struktur inti ini terikat berbagai macam rantai samping yang menentukan beberapa penentu antigenik utama (11, 29, 30).

Secara kuantitatif antigen lipopolisakarida penting karena pada bakteri gram-negatif jumlahnya sekitar 1–5 % berat kering atau 10–15 % berat dinding sel kering. Dengan teknik laboratorium yang dapat dilakukan secara fisika maupun kimiawi, molekul ini dapat diperoleh dalam jumlah besar dan bebas dari pencemaran makromolekul lain (30).

Antigen lipopolisakarida mempunyai sifat-sifat sebagai berikut (12):

1. Merupakan imunodominan dan kuat.
2. Antigen lipopolisakarida *thymus independent tipe 1* imunogenik pada bayi (antigen Vi dan H kurang imunogenik), dan merupakan mitogen yang sangat kuat terhadap sel B.
3. Antigen lipopolisakarida dapat menstimulasi sel-sel B tanpa bantuan sel T (tidak seperti antigen-antigen protein) sehingga respon antibodi dapat terdeteksi lebih cepat.
4. Antigen lipopolisakarida dapat menimbulkan respon antibodi yang kuat dan cepat melalui aktivasi sel B via reseptor sel B dan reseptor lain (*toll like reseptor 4*).

5. Spesifitasnya yang tinggi (90%) terutama LPS 09 yang sangat jarang ditemukan baik di alam ataupun di antara mikroorganismenya.

### **II.3.2. Konsentrasi Antigen Untuk Reaksi Serologi**

Evolusi imunoasai sebagai cara untuk mengukur secara kuantitatif sejumlah kecil materi antigen dipelopori oleh peneliti Berson dan Yallow pada tahun 1959. Perkembangan yang terjadi pada uji serologis terus menerus dilakukan untuk mendapatkan suatu teknik pengujian yang lebih cepat dan sensitif (33).

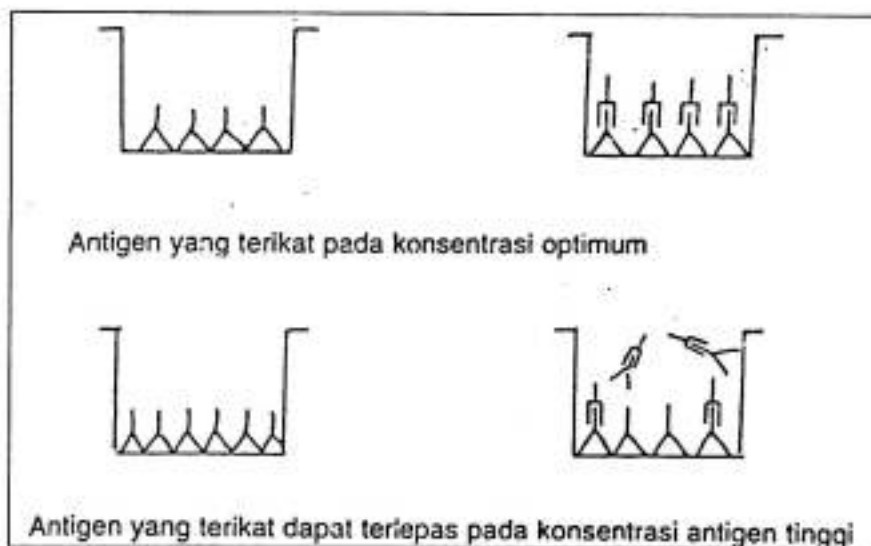
Penyiapan antigen untuk uji serologis sangat penting dilakukan mengingat bahwa perlakuan penyiapan antigen tersebut harus sedikit mungkin mempengaruhi reaktifitas imunologi seterusnya dalam pengujian. Tingkat penyiapan antigen yang diperlukan untuk uji serologis ditentukan oleh asal antigen, sifat antigen dan spesifitas reagen pada langkah selanjutnya.

Salonen dan Vaehri pada tahun 1979 dalam penelitiannya terhadap uji ELISA membuktikan bahwa banyaknya antigen yang diperlukan untuk reaktifitas tertinggi sebenarnya sangat kecil dibandingkan dengan jumlah antigen yang ditambahkan pada penyangga pelapis. Jadi faktor pembatasnya sering kali adalah penempelan antigen dan stabilitas penempelan tersebut (19,33). Banyak antigen yang akan melapis dengan baik ketika hanya dilarutkan dengan penyangga alkalis dan dibiarkan terabsorpsi secara pasif. Antigen lainnya memerlukan fiksasi



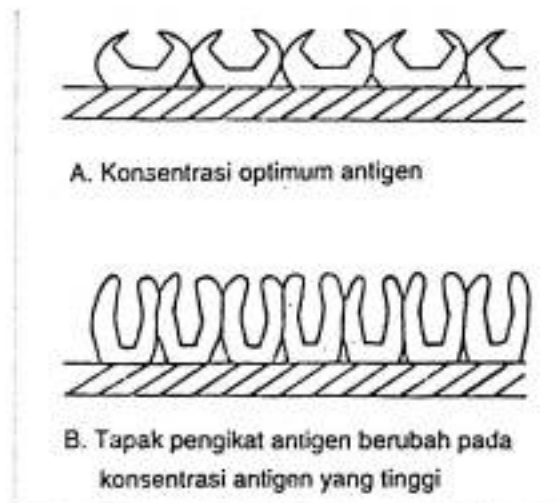
melalui agen pengikat perantara atau melalui perlakuan kimia terhadap matriks atau antigennya sendiri.

Dalam setiap pengujian yang paling penting adalah menentukan konsentrasi optimum antigen untuk pelapisan. Diinginkan antigen yang dilapiskan pada matriks padat konsentrasinya tinggi sehingga semua tempat pengikatan ditemplei, dan tersedia sebanyak mungkin tempat reseptor antibodi. Namun makin tinggi konsentrasi antigen, makin tinggi juga laju antigen yang terlepas seperti dapat dilihat pada gambar 4. Terlepasnya antigen selama pengujian akan menghambat pengikatan antibodi pada antigen sehingga menurunkan sensitivitas. Bila jumlah antibodi terbatas, antigen yang terlepas akan bersaing dengan antigen yang melekat untuk mengikat antibodi sehingga mengakibatkan hasil assay menurun (33).



Gambar 4. Pelepasan kembali antigen pada konsentrasi tinggi.  
(Sumber: Burges WS, Graham. *Teknologi ELISA dalam diagnosis dan penelitian*. UGM Yogyakarta 1995)

Pada kerapatan yang tinggi konfigurasi antigen dapat berubah dan dapat terjadi kekurangan tempat pengikatan sterik antibodi karena susunannya sangat rapat dan kadang berlapis-lapis seperti pada gambar 5. Tumpukan antigen yang terlihat pada konsentrasi tinggi harus dihindari karena interaksi ini sangat tidak stabil dan antigen yang tertumpuk tersebut dapat terlepas selama pengujian dan mengurangi imunoreaksi sehingga sensitivitasnya menjadi rendah.



Gambar 5. Perubahan konfigurasi akibat pelapisan dengan kerapatan tinggi (sumber: Burges WS, Graham. Teknologi Elisa dalam Diagnosis dan Penelitian, Universitas Gajah Mada Yogyakarta, 1995)

Untuk menyelidiki pengaruh jumlah antigen yang ditambahkan selama proses pelapisan terhadap pengikatan antibodi spesifik, Engvall dan Perlmann pada tahun 1972 melakukan pengujian dengan melapisi tabung polistiren dengan larutan antigen dari albumin manusia (*Human Serum Albumin HSA*) dengan konsentrasi berbeda-beda, dan direaksikan dengan dua pengenceran antiserum yang berbeda. Hasilnya yaitu

pengikatan antibodi spesifik melampaui maksimum dengan makin tingginya konsentrasi antigen pada larutan pelapis. Makin tinggi pengenceran antiserum, nilai maksimum ini bergeser ke konsentrasi antigen yang lebih rendah. Konsentrasi antibodi yang rendah mungkin tidak dapat dideteksi dengan ELISA, jika konsentrasi antigen yang digunakan terlalu tinggi atau terlalu rendah. Konsentrasi optimum untuk absorpsi berbeda-beda bagi setiap protein karena daya absorpsi bawaannya berlainan (33).

#### **II.4. Antibodi**

Antibodi merupakan suatu bahan larut yang digolongkan dalam protein dan disebut imunoglobulin (Ig). Imunoglobulin merupakan substansi pertama yang diidentifikasi sebagai molekul dalam serum yang mampu menetralkan sejumlah mikroorganisme penyebab infeksi. Molekul ini dibentuk oleh sel plasma yang berasal dari proliferasi sel B akibat adanya kontak dengan antigen. Semua molekul imunoglobulin mempunyai 4 rantai polipeptida dasar yang terdiri atas 2 rantai berat (*heavy chain*) dan 2 rantai ringan (*light chain*) yang identik serta dihubungkan satu sama lain oleh ikatan disulfida. Ada 5 jenis Imunoglobulin yaitu Imunoglobulin M, Imunoglobulin G, Imunoglobulin A, Imunoglobulin E, dan Imunoglobulin D (1,24).

## II.5.Diagnosa Demam tifoid

Demam tifoid sukar untuk dapat ditegakkan hanya atas dasar gejala klinis saja, sebab gambaran klinis penyakit ini sangat bervariasi dan umumnya tidak khas untuk demam tifoid. Dengan demikian, membutuhkan pemeriksaan laboratorium untuk menunjang diagnosis demam tifoid (12). Bahan pemeriksaan dapat berupa darah, feses, urin, dan sumsum tulang belakang (20).

Sarana laboratorium dalam menegakkan diagnosis demam tifoid pada garis besarnya ada tiga cara yaitu (12):

1. Uji kultur untuk mengisolasi dan identifikasi *Salmonella typhi*.
2. Imunoasai, untuk melacak kenaikan titer antibodi terhadap antigen *Salmonella typhi* dan menentukan adanya antigen spesifik dari *Salmonella typhi*.
3. Uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR), untuk melacak DNA spesifik dari *Salmonella typhi*.

Beberapa pemeriksaan yang dapat dilakukan untuk diagnosis demam tifoid adalah :

### II.5.1. Uji kultur

Kultur darah adalah metode untuk mengisolasi *S. typhi* dengan pembiakkan pada media tertentu dan merupakan *gold standard* dalam mendiagnosa demam tifoid. Medium-medium yang digunakan diantaranya medium diferensial seperti *Mac Conkey Agar* atau deoksilat yang memungkinkan deteksi secara cepat bakteri peragi laktosa dan sedikit

menghambat gram positif. Pembedaan pada medium selektif seperti SSA (*Salmonella – Shigella Agar*) yang merupakan tempat *Salmonella* dan *Shigella* akan tumbuh melebihi organisme *Enterobacteriaceae* lainnya. Identifikasi akhir dari uji kultur adalah uji biokimia dan uji aglutinasi dengan serum spesifik. Ini membutuhkan waktu lama (5-7 hari) dan hasil yang tidak sensitif (11, 17).

Pada kultur darah, spesifitasnya dipengaruhi oleh sampel darah, jenis medium yang digunakan, lamanya masa inkubasi dan jumlah bakteri. Semakin sedikit jumlah bakteri semakin sulit untuk mendeteksi melalui kultur darah. Sedikitnya jumlah bakteri disebabkan pengaruh antibiotik yang digunakan sebelum sampel diambil, respon sistem imun *host* dan karakteristik *S. typhi* itu sendiri (12, 13, 31).

### **II.5.2. Uji Serologi**

Serologi merupakan ilmu yang mempelajari reaksi-reaksi antara antigen dan antibodi secara *in vitro*. Reaksi serologi dapat digunakan untuk mengetahui secara kualitatif maupun kuantitatif respon tubuh terhadap agen infeksi dan juga untuk diagnostik penyakit infeksi karena reaksinya bersifat spesifik (11, 31).

Uji serologi membutuhkan waktu yang jauh lebih singkat dibandingkan dengan uji diagnostik yang lazim digunakan secara luas karena adanya kekhususan dan sensitivitas dari reaksi antigen dan antibodi. Beberapa uji serologis yang dapat digunakan untuk mendiagnosa demam tifoid antara lain (11):

menghambat gram positif. Pembedaan pada medium selektif seperti SSA (*Salmonella – Shigella Agar*) yang merupakan tempat *Salmonella* dan *Shigella* akan tumbuh melebihi organisme *Enterobacteriaceae* lainnya. Identifikasi akhir dari uji kultur adalah uji biokimia dan uji aglutinasi dengan serum spesifik. Ini membutuhkan waktu lama (5-7 hari) dan hasil yang tidak sensitif (11, 17).

Pada kultur darah, spesifitasnya dipengaruhi oleh sampel darah, jenis medium yang digunakan, lamanya masa inkubasi dan jumlah bakteri. Semakin sedikit jumlah bakteri semakin sulit untuk mendeteksi melalui kultur darah. Sedikitnya jumlah bakteri disebabkan pengaruh antibiotik yang digunakan sebelum sampel diambil, respon sistem imun *host* dan karakteristik *S. typhi* itu sendiri (12, 13, 31).

### **II.5.2. Uji Serologi**

Serologi merupakan ilmu yang mempelajari reaksi-reaksi antara antigen dan antibodi secara *in vitro*. Reaksi serologi dapat digunakan untuk mengetahui secara kualitatif maupun kuantitatif respon tubuh terhadap agen infeksi dan juga untuk diagnostik penyakit infeksi karena reaksinya bersifat spesifik (11, 31).

Uji serologi membutuhkan waktu yang jauh lebih singkat dibandingkan dengan uji diagnostik yang lazim digunakan secara luas karena adanya kekhususan dan sensitivitas dari reaksi antigen dan antibodi. Beberapa uji serologis yang dapat digunakan untuk mendiagnosa demam tifoid antara lain (11):

## 1. Uji Widal

Sejak tahun 1986, kegunaan Uji Widal telah diketahui menggunakan suspensi *S. typhi* untuk menentukan titer aglutinin dalam serum penderita demam tifoid. Uji Widal menggunakan antigen O dan H merupakan tes sederhana tetapi memiliki keterbatasan dengan adanya hasil positif dan negatif palsu(31). Hingga saat ini uji Widal masih merupakan uji serologi yang paling banyak dipakai untuk menunjang diagnosis demam tifoid walaupun mempunyai kelemahan yaitu spesifitasnya yang rendah. Kesulitan untuk menginterpretasi hasil uji Widal disebabkan karena pemeriksaan titer aglutinin O dan H harus dilakukan dua kali dengan jangka waktu 5-7 hari. Bila terdapat kenaikan titer sebesar empat kali maka hasilnya mempunyai nilai diagnostik untuk demam tifoid (5, 31).

## 2. Uji Lateral Flow

Uji lateral flow merupakan uji serologis berdasarkan immunokromatographic. Prinsipnya yaitu daerah pada tes terdapat membran nitroselulosa yang mengandung antigen Lipopolisakarida sedangkan reagen deteksi mengandung anti human Ig M yang berlabel, dengan partikel koloid yang berwarna merah. Dengan penambahan serum, reagen deteksi akan mengikat sampel yang mengandung antibodi dan bereaksi dengan partikel. Campuran akan bermigrasi sampai pada daerah tes yang mengandung antigen pada membran nitroselulosa, sehingga akan terjadi

## 1. Uji Widal

Sejak tahun 1986, kegunaan Uji Widal telah diketahui menggunakan suspensi *S. typhi* untuk menentukan titer aglutinin dalam serum penderita demam tifoid. Uji Widal menggunakan antigen O dan H merupakan tes sederhana tetapi memiliki keterbatasan dengan adanya hasil positif dan negatif palsu(31). Hingga saat ini uji Widal masih merupakan uji serologi yang paling banyak dipakai untuk menunjang diagnosis demam tifoid walaupun mempunyai kelemahan yaitu spesifitasnya yang rendah. Kesulitan untuk menginterpretasi hasil uji Widal disebabkan karena pemeriksaan titer aglutinin O dan H harus dilakukan dua kali dengan jangka waktu 5-7 hari. Bila terdapat kenaikan titer sebesar empat kali maka hasilnya mempunyai nilai diagnostik untuk demam tifoid (5, 31).

## 2. Uji Lateral Flow

Uji lateral flow merupakan uji serologis berdasarkan immunokromatographic. Prinsipnya yaitu daerah pada tes terdapat membran nitroselulosa yang mengandung antigen Lipopolisakarida sedangkan reagen deteksi mengandung anti human Ig M yang berlabel, dengan partikel koloid yang berwarna merah. Dengan penambahan serum, reagen deteksi akan mengikat sampel yang mengandung antibodi dan bereaksi dengan partikel. Campuran akan bermigrasi sampai pada daerah tes yang mengandung antigen pada membran nitroselulosa, sehingga akan terjadi





ikatan antigen-antibodi yang ditunjukkan adanya garis merah, sedangkan garis kontrol akan selalu berwarna merah.

Jika serum tidak mengandung antibodi maka sampel dan reagen deteksi akan melewati daerah tes dan tidak ada garis yang akan tampak pada daerah tes. Pada daerah kontrol akan terlihat garis merah kontrol untuk memastikan bahwa reagen deteksi masih aktif. Kelebihan Sampel dan buffer akan diserap oleh blok penyerap. Hasil diperoleh setelah 10 menit dengan penglihatan secara visual pada garis Tes (T) dan kontrol (C). Keuntungan dari Uji Lateral Flow, yaitu mudah di gunakan, waktu yang dibutuhkan untuk mendeteksi hasil lebih singkat, dan stabilitasnya tinggi.

### 3. Uji *Enzyme Linked Immunosorbent* (ELISA)

Uji *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) yaitu suatu uji dimana terjadinya reaksi antara antibodi dan antigen yang telah dilabel dengan enzim sehingga terbentuk antigen-antibodi kompleks. Dengan penambahan substrat, maka akan memberikan intensitas warna yang sesuai dengan konsentrasi antigen atau antibodi yang dites dan dapat dibaca melalui *raeder machine*.

Karena demam tifoid terus menjadi penyebab utama penyakit di negara berkembang, maka uji sensitivitas dan spesifitas sangat diperlukan untuk melakukan diagnosis laboratorium yang cepat terhadap penyakit tersebut. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) telah berkembang dan teruji, baik dalam kondisi laboratorium maupun kondisi

klinis, karena kemampuannya mendeteksi antigen Vi dalam urin. ELISA dapat mendeteksi antigen dalam urin dibandingkan dengan 100 mg/ml yang terdeteksi melalui metode aglutinasi. ELISA juga dapat mendeteksi antigen dalam urin yang didilusi sebanyak 1:1,024 dalam urin normal.

Dalam pengujian terhadap spesimen urin dari 6 orang yang kultur positif tinja dengan penjangkitan tifoid yang kecil di Amerika, ELISA juga dapat mendeteksi antigen terhadap 4 dari 6 penderita. ELISA juga terbukti spesifik, tidak memberikan hasil positif palsu terhadap spesimen dari 50 orang yang tidak mengalami demam tifoid. Tingginya spesifitas dan sensitivitas ELISA menjadikan sebagai uji yang dapat dipakai untuk diagnosis cepat demam tifoid (34).

Prinsip ELISA didasarkan pada dua pengamatan, pertama antibodi dan beberapa antigen menempel pada *mikroplet* (atau penyangga padat lainnya) dan kemampuan imunologisnya tetap terjaga secara penuh. Kedua, antigen dan antibodi dapat berikatan pada enzim, dan kompleks yang terbentuk masih tetap berfungsi penuh, baik secara imunologis maupun enzimatis (6,33,34).

Enzim yang dipakai untuk melabel antigen atau antibodi harus memenuhi beberapa persyaratan, diantaranya tidak boleh mengurangi sifat imunologik antigen ataupun antibodi, harus dapat diperoleh dalam keadaan murni serta stabil untuk dapat disimpan selama jangka waktu tertentu. Enzim yang banyak dipakai pada saat ini adalah peroksidase (11).

ELISA mempunyai keuntungan yaitu (34):

1. Kemampuan untuk mengidentifikasi kelas respon antibodi dapat memberikan informasi tentang kapan terkena infeksi.
2. Semua kelas dan sub kelas antibodi dapat dideteksi
3. ELISA lebih sensitif sampai 10.000 kali dibandingkan yang lain. Hal ini mengakibatkan banyak laporan yang menunjukkan peningkatan kemampuan ELISA untuk diagnosa penyakit.

Yang menjadi ukuran bagi jumlah antigen dan antibodi yang ada di dalam contoh yang akan diuji adalah kegiatan enzim. Enzim yang dapat digunakan dalam ELISA meliputi B-glaktosidase, glucose oksidase, peroksidase dan alkalin fosfatase (33, 34).

Terdapat dua metode *immunoassay* yang ternyata mempunyai nilai klinis paling baik yaitu *sandwich antibody* ganda yang berguna untuk mendeteksi dan mengukur antibodi dan cawan mikro tidak langsung yang berguna untuk mendeteksi dan mengukur antigen(33).

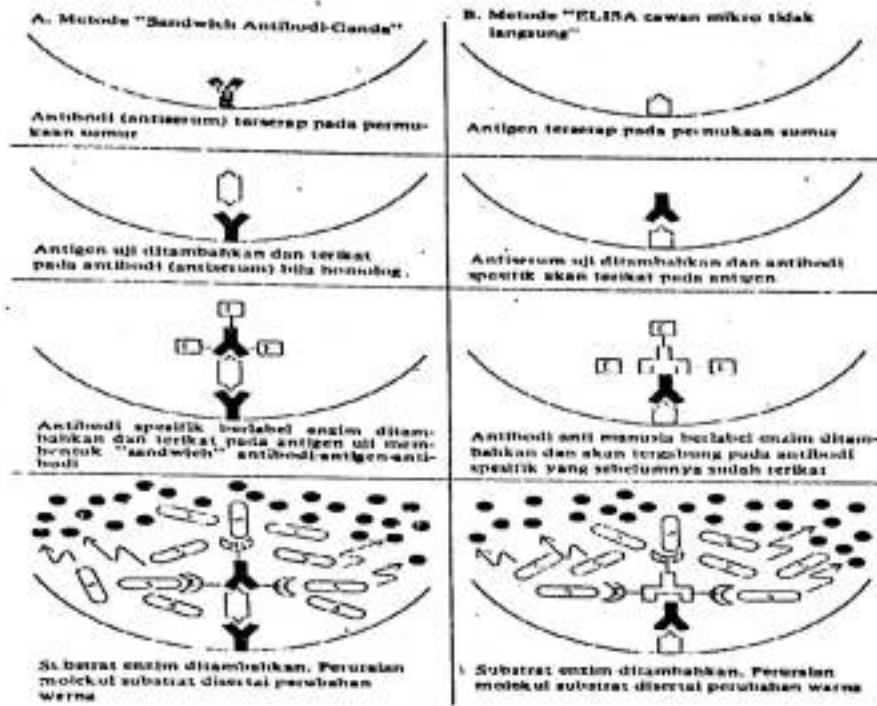
### 1. **Sandwich Antibody Ganda**

Dalam teknik ini anti serum dimasukkan ke dalam sumur-sumur di dalam *mikroplet*. Antibodi di dalam anti serum itu melekat pada permukaan setiap sumur. Lalu antigen uji ditambahkan dan bila antigen itu homolog, maka akan melekat pada antibodi yang terikat pada permukaan sumur. Kemudian ditambahkan antibodi spesifik berlabel enzim dan kerja enzim akan berbanding lurus dengan jumlah antibodi berlabel enzim yang ada dan pada gilirannya sebanding dengan jumlah antigen uji. Aktivitas

enzim dapat diikuti dengan mengamati perubahan warna (disebabkan oleh substrat) secara visual atau diukur dengan kalorimeter (alat yang digunakan untuk menganalisa perubahan warna di dalam suatu larutan). Metode ini telah digunakan untuk menguji kadar antigen hepatitis B dan berhasil baik (30,33).

## **2. Uji *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* ( ELISA ) Cawan Mikro Tidak Langsung**

Langkah pertamanya ialah melapisi sumur *mikroplet* antigen melalui absorsi pasif. Antiserum uji (antibodi di dalam serum sampel) ditambahkan dan diinkubasikan. Bila antibodi di dalam antiserum itu homolog, maka akan terikat pada antigen yang sudah tidak bergerak pada sumur tadi. Antibodi berlabel enzim ditambahkan ke dalam sistem tersebut yang akan terikat kepada kompleks antigen-antibodi yang terbentuk pada langkah sebelumnya. Pada akhirnya, sama seperti metode *sandwich antibody* ganda, substrat enzim ditambahkan dan laju penguraiannya (hidrolisis) berkaitan dengan perubahan warna yang sebanding dengan konsentrasi yang ada di dalam contoh yang diuji. Perubahan warna ini dapat diikuti secara visual dengan kalorimeter (30, 33, 34).



Gambar 4. Teknik-teknik imunoasai – enzim. (A) Metode "sandwich-antibodi – ganda" (B) Metode ELISA – cawan tidak langsung (33).

## **BAB III**

### **PELAKSANAAN PENELITIAN**

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

Jenis penelitian ini adalah metode penelitian eksperimental, yaitu melakukan isolasi dan purifikasi antigen lipopolisakarida (LPS) *Salmonella typhi* yang diisolasi dari Jayapura dan menguji reaksi serologisnya.

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

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei sampai Agustus 2009. Sampel dikumpulkan dari pasien yang berkunjung ke Rumah Sakit Umum Daerah Jayapura, Rumah Sakit Angkatan Laut Jayapura dan Balai Laboratorium Kesehatan Jayapura. Pengujian laboratorium dilaksanakan di laboratorium Imunologi dan Biologi Molekuler bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

#### **III.3. Alat dan Bahan Penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah *sentrifuge* (produk Bio rad) *mikropiret* 10-400  $\mu$ l , tabung falcon ukuran 50 ml, tabung eppendor 1,5 ml, penangas air, plat kasar bentuk U, satu unit *ELISA Reader* (produk Bio rad), *Vortex*, alat uji *lateral Flow*, lemari pendingin.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah Reagen Widal (produk Tulip), medium *bactec plus aerobic /F*, Medium *Salmonella Shigella Agar* ( *SSA* ), medium *Triple Sugar Iron Agar* (*TSIA*), medium *Sulfite Indol Motility* (*SIM*), medium *Simmons Citrate medium Methyl Red*

## **BAB III**

### **PELAKSANAAN PENELITIAN**

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

Jenis penelitian ini adalah metode penelitian eksperimental, yaitu melakukan isolasi dan purifikasi antigen lipopolisakarida (LPS) *Salmonella typhi* yang diisolasi dari Jayapura dan menguji reaksi serologisnya.

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

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei sampai Agustus 2009. Sampel dikumpulkan dari pasien yang berkunjung ke Rumah Sakit Umum Daerah Jayapura, Rumah Sakit Angkatan Laut Jayapura dan Balai Laboratorium Kesehatan Jayapura. Pengujian laboratorium dilaksanakan di laboratorium Imunologi dan Biologi Molekuler bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

#### **III.3. Alat dan Bahan Penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah *sentrifuge* (produk Bio rad) *mikropiret* 10-400 µl , tabung falcon ukuran 50 ml, tabung eppendor 1,5 ml, penangas air, plat kasar bentuk U, satu unit *ELISA Reader* (produk Bio rad), *Vortex*, alat uji *lateral Flow*, lemari pendingin.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah Reagen Widal (produk Tulip), medium *bactec plus aerobic /F*, Medium *Salmonella Shigella Agar* ( *SSA* ), medium *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), medium *Sulfite Indol Motility* (SIM), medium *Simmons Citrate medium Methyl Red*

## **BAB III**

### **PELAKSANAAN PENELITIAN**

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

Jenis penelitian ini adalah metode penelitian eksperimental, yaitu melakukan isolasi dan purifikasi antigen lipopolisakarida (LPS) *Salmonella typhi* yang diisolasi dari Jayapura dan menguji reaksi serologisnya.

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

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei sampai Agustus 2009. Sampel dikumpulkan dari pasien yang berkunjung ke Rumah Sakit Umum Daerah Jayapura, Rumah Sakit Angkatan Laut Jayapura dan Balai Laboratorium Kesehatan Jayapura. Pengujian laboratorium dilaksanakan di laboratorium Imunologi dan Biologi Molekuler bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

#### **III.3. Alat dan Bahan Penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah *sentrifuge* (produk Bio rad) *mikropiret* 10-400 µl , tabung falcon ukuran 50 ml, tabung eppendor 1,5 ml, penangas air, plat kasar bentuk U, satu unit *ELISA Reader* (produk Bio rad), *Vortex*, alat uji *lateral Flow*, lemari pendingin.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah Reagen *Widal* (produk Tulip), medium *bactec plus aerobic IF*, Medium *Salmonella Shigella Agar* ( *SSA* ), medium *Triple Sugar Iron Agar* (*TSIA*), medium *Sulfite Indol Motility* (*SIM*), medium *Simmons Citrate medium Methyl Red*





Voges Proskaver (MRVP), medium glukosa, laktosa, mannitol, sukrosa, formalin 10 %, Larutan fenol, Larutan Buffer Carbonat – bicarbonate pH 9,6, larutan Phospat Buffer Saline (PBS) pH 7,4, Larutan PBST 10 % NGS (Normal Goat Serum), Larutan PBS 1 % BSA (Bovine Serum albumin), larutan Phospat Sitrat pH 5,0 substrat TBM, substrat *P-nitrophenil phospat* (PnPP), Asam Sulfat 0,5 M *Conjugate Dilution buffer*, enzim *peroxidase anti human Ig M*, antigen LPS kontrol, dan anti serum kontrol.

### **III.4. Populasi dan Sampel Penelitian**

#### **III.4.1. Populasi Penelitian**

Penderita suspek demam tifoid yang berkunjung ke rumah sakit Umum daerah Jayapura, Rumah sakit Angkatan Laut Jayapura dan Balai Laboratorium Kesehatan Jayapura, yang berdomisili tetap di Jayapura dan telah mengisi data *Informed consent*.

#### **III.4.2. Sampel Penelitian.**

Sampel penelitian berupa darah dan serum sebanyak 67 sampel dari populasi penelitian yang diambil pada saat 3-7 hari terjadi demam.

#### **III.4.3. Kriteria Sampel**

Yang menjadi kriteria sampel dalam penelitian ini adalah:

1. Pasien yang telah menjalani pemeriksaan fisik dan dinyatakan sebagai suspek demam tifoid dan belum diterapi antibiotik.
2. Pasien yang berdomisili tetap di Jayapura dan tidak pernah bepergian keluar daerah selama sekurangnya setahun terakhir.

#### III.4.4. Persiapan sampel

Sampel berupa darah vena diambil secara steril sebanyak  $\pm 10$  ml untuk orang dewasa dan  $\pm 5$  ml untuk anak-anak. Sampel untuk uji kultur langsung dimasukkan ke dalam *medium bactec plus aerobic/F*, dan sampel serum disiapkan dengan cara darah dibekukan pada suhu kamar selama 30 menit dan *disentrifuge* pada 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan berupa serum dipisahkan dari sel darah. Sampel yang telah dikumpulkan di Jayapura kemudian dikirim pada suhu dingin menggunakan *pack ice* dengan jasa penitipan kilat.

#### III.5. Prosedur Kerja

##### III.5.1 Uji widal

Dibuat dua seri *slide* pada *mikroplate*, masing-masing diberi tanda O dan H, satu *slide* untuk melakukan kontrol. Serum sampel diisi pada *slide* O dan H secara berurutan : 80  $\mu$ l, 40  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, dan 5  $\mu$ l, dan satu tetes serum kontrol positif dan kontrol negatif. Antigen O dan H ditambahkan pada masing-masing *slide* sebanyak 1 tetes sehingga didapatkan pengenceran :  $1/20$ ,  $1/40$ ,  $1/80$ ,  $1/160$ ,  $1/320$ , serum dan antigen dicampur menggunakan pengaduk bersih pada masing-masing *slide*, selanjutnya digunakan *shaker* selama 1 menit, adanya aglutinasi diamati dan hasil dinyatakan positif bila terjadi aglutinasi.

##### III.6.2. Uji Kultur

Sampel darah dari penderita yang pada uji Widal memberikan hasil positif dengan titer antigen O lebih dari  $1/160$  diambil sebanyak 5-7 ml

untuk dewasa dan 1-3 ml untuk anak-anak. Kemudian dimasukkan ke dalam medium *bactecplus Aerobic/F* dan dikirim pada suhu kamar ke laboratorium Imunologi dan Biologi Molekuler bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hassanuddin Makassar.

Selanjutnya diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam. Suspensi yang dibiakkan diinokulasi pada medium *Salmonella Shigella Agar* (medium SSA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diamati dan dilakukan uji pewarnaan gram dan uji biokimia,.Hasil dicatat dan diinterpretasi sebagai *Salmonella typhi*.

### III.6.3. Koleksi suspensi *S.typhi*(35)

Kuman *S. typhi* yang sudah diidentifikasi melalui kultur dan tes biokimia diambil sebanyak 3-4 koloni dan dimasukkan kedalam 1 liter medium *broth* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya ditambahkan formalin 10% dengan perbandingan suspensi *S.typhi* 400 ml dan formalin 10% sebanyak 10 ml, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C.

Suspensi kuman kemudian dibagi dalam 10 tabung falcon steril ukuran 50 ml dan disentrifus 3000 rpm selama 30 menit pada temperatur 4°C dan sedimen dikumpulkan dalam satu tabung falcon steril ukuran 50 ml. Sedimen kemudian dicuci dengan aquadest steril sebanyak 3 kali dengan cara menambahkan aquadest steril sampai volume menjadi 40 ml dan disentrifus 3000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C.

Suspensi kuman kemudian dibagi dalam 3 falcon steril masing-masing 15 ml dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

#### **III.6.4. Ekstraksi dan purifikasi Antigen Lipopolisakarida ( Metode hot phenol water ) (35)**

Suspensi *S.typhi* sebanyak 15 ml yang telah dikoleksi dalam tabung falcon steril, ditambahkan dengan 15 ml larutan phenol pada suhu  $70^{\circ}\text{C}$  sambil terus dikocok (*shaker*), dan didiamkan pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Lapisan cairan bagian atas (*upper layer*) diambil sebagai suspensi antigen LPS, dan disentrifus 4000 rpm selama 15 menit pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatan diambil tanpa menyentuh sedimen dan dimasukkan ke dalam *vial* steril ukuran 1,5 ml masing-masing sebanyak 1,2 ml, kemudian disentrifus kecepatan 15.000 rpm selama 60 menit pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ .

Sedimen diambil dan ditambahkan 1 ml aquadest steril untuk pencucian dan diaduk menggunakan tip, dan disentrifus kecepatan 15.000 rpm selama 60 menit suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Pencucian dengan 1 ml aquadest steril diulangi sebanyak 2 kali. Sedimen diambil dan disimpan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  sebagai stok antigen LPS yang akan dipakai untuk uji serologis. Sebelum digunakan terlebih dahulu ditambahkan dengan 1 ml aquadest steril dan diencerkan sesuai konsentrasi yang diinginkan.

#### **III.6.5. Uji Lateral flow.**

Alat uji berupa kaset lateral flow diletakkan pada bidang datar kemudian serum sebanyak 5  $\mu\text{l}$  dipipet dan dimasukkan pada sumur sampel. Ditambahkan larutan buffer sebanyak 130  $\mu\text{l}$  dan akan terjadi

campuran buffer dan serum yang bermigrasi menimbulkan reaksi antigen antibodi selama 10-15 menit. Hasil diinterpretasikan positif bila terjadi dua garis merah pada tanda merah pada tes (T) dan kontrol (C).

### III.6.5. Uji Serologis Antigen lipopolisakarida (6,35)

Pemeriksaan menggunakan tehnik ELISA yang terdiri dari dua tahap. Tahap pertama yaitu antigen lipopolisakarida yang telah dimurnikan dibuat dalam konsentrasi  $1/500$ ,  $1/750$ ,  $1/1000$  dengan penambahan larutan *Carbonat Bicarbonate buffer (coating buffer)* selanjutnya dibuat bagan sesuai dengan *plate* yang digunakan seperti pada lampiran 2. Tiap sumur pada kolom B sampai kolom H dimasukkan *coating buffer* antigen LPS tadi sebanyak 50  $\mu$ l. *Plate* ditutup pada suhu 4<sup>0</sup>C selama 24 jam dan sebagai kontrol digunakan juga antigen LPS yang diisolasi dari luar daerah yang telah diketahui sensitivitasnya.

Tahap kedua yaitu reaksi antigen antibodi. *Plate* tersebut dicuci dengan PBST 0,1 % sebanyak 4 kali yaitu dengan 2 x 1 menit dan 2 x 2 menit. Kemudian ditambahkan larutan PBS 1% BSA (sebagai larutan pemblok) sebanyak 100  $\mu$ l pada tiap sumur dan diinkubasi pada suhu kamar selama 2 jam. *Plate* dicuci sebanyak 4 kali yaitu 2 x 1 menit dan 2 x 2 menit. Sampel serum dibuat dalam pengenceran  $1/100$   $1/200$   $1/400$ ,  $1/800$  menggunakan larutan PBST 10% NGS (*dilution buffer*) dan ditambahkan sebanyak 50  $\mu$ l pada sumur sesuai bagan pada tabel 1. *Plate* ditutup dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. *Plate* dicuci sebanyak 4 kali dengan larutan PBST 0,1 %.

Larutan *Conjugate* dan *anti human IgM* sebanyak 50 µl dimasukkan pada tiap sumur dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah itu dicuci sebanyak 4 kali dengan larutan PBST 0,1 %. Larutan TMB sebagai substrat atau larutan *P-nitrophenil Phospat* (PnPP) sebagai substrat masing-masing ditambahkan ke dalam sumur sebanyak 50 µl dan diinkubasi selama 15 menit (larutan akan berwarna biru). Reaksi dihentikan dengan penambahan Asam Sulfat 0,5 M sebanyak 50 µl pada tiap sumur dan larutan akan berwarna kuning.

Hasil reaksi dibaca dengan *ELISA Reader* pada filter 450 nm untuk substrat TMB dan filter 405 nm untuk susbtrat PnPP. Hasil uji ELISA dinyatakan positif bila nilai *Optical Density* (OD)  $\geq 0,350$

### **III.7. Analisa Data**

Data yang diperoleh dari hasil penelitian diolah secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.

### **III.8. Definisi Operasional**

Suspek demam tifoid yaitu penderita tersangka demam tifoid yang mempunyai gejala klinis demam selama 3-14 hari berturut-turut, sakit kepala, lidah kotor, lesu, mual, muntah dan lain-lain.

Antigen yaitu benda asing yang bila masuk ke tubuh manusia dapat merangsang respon imun tubuh dengan bentuknya antibodi.

Lipopolisakarida yaitu komponen utama dari dinding bakteri gram negatif yang berfungsi sebagai pelindung dari beberapa bahan kimia jenis tertentu.

Uji serologis yaitu pelacakan antibodi spesifik terhadap antigen yang dapat digunakan sebagai alat diagnostik terhadap infeksi.

Isolat Jayapura merupakan antigen yang berasal dari kuman *Salmonella typhi* yang diisolasi dari penderita demam tifoid yang berdomisili tetap Jayapura.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### IV.1. Hasil Penelitian

Dari penelitian yang dilakukan terhadap 67 sampel dari pasien yang berkunjung di Rumah Sakit Umum Jayapura, Rumah Sakit Angkatan Laut Jayapura dan Balai Laboratorium Kesehatan Jayapura diperoleh hasil sebagai berikut:

##### IV.1.1. Uji Widal

Dalam penelitian ini uji Widal dijadikan sebagai uji skreening yang memperkuat gejala klinis demam tifoid untuk dilakukan uji kultur. Hasil pengujian terhadap 67 sampel suspek demam tifoid didapatkan hasil bahwa titer lebih dari atau sama dengan 1/320 sebanyak 49 sampel, titer 1/160 sebanyak 13 sampel, titer 1/80 sebanyak 4 sampel dan titer 1/40 sebanyak 1 sampel.

##### IV.1.2. Uji Kultur

Menurut penelitian Gulli MJ tahun 2003 terhadap suspek demam tifoid pada daerah endemik maka uji Widal dinyatakan positif untuk diagnosa demam tifoid bila titernya lebih dari 1/320, tetapi dalam penelitian ini hasil uji Widal dinyatakan positif sebagai suspek demam tifoid bila titer di atas 1/160 dan sebanyak 62 penderita yang menunjukkan hasil positif pada uji Widal dilakukan uji kultur untuk mengisolasi *Salmonella typhi*, dan diperoleh hasil bahwa kultur positif



*Salmonella typhi* sebanyak 1 sampel, yaitu dari pasien yang pada uji Widal menunjukkan titer 1/320.

#### **IV.1.3. Uji Lateral Flow**

Dalam penelitian ini uji Lateral Flow menggunakan antigen LPS isolat dari strain Makassar dijadikan sebagai pembanding untuk memilih sampel serum yang akan digunakan untuk uji ELISA. Hal ini berdasarkan penelitian Rini amra pada agustus 2009 yang melakukan uji lateral flow menggunakan antigen LPS isolat Makassar terhadap serum pasien di Jayapura dan diperoleh hasil sensitivitas dan spesifitas sebesar 100 % dan 92 %. Dari 67 sampel yang diperiksa diperoleh hasil positif sebanyak 24 penderita dan hasil negatif sebanyak 43 penderita jika dilihat dari derajat kepositifannya berdasarkan garis merah yang terbentuk pada tanda tes (T) maka penderita dengan positif 1 sebanyak 16 orang, positif 2 sebanyak 3 orang, positif 3 sebanyak 2 orang dan positif 4 sebanyak 3 orang.

#### **IV.1.4. Uji ELISA Menggunakan Substrat Tri Metil Brom Fenol Blue (TMB)**

Hasil uji ELISA menggunakan substrat TMB yaitu *optical density* (OD) rata-rata terendah untuk ketiga konsentrasi pada kontrol negatif yaitu OD : 0,137 untuk konsentrasi 1/500, OD : 125 untuk konsentrasi 1/700 dan OD 0,121 untuk konsentrasi Ag LPS 1/1000, dan hasil OD tertinggi berada pada kontrol positif yaitu OD : 0,727 untuk Ag LPS 1/500, OD :

0,718 untuk LPS 1/750 dan OD : 0,710 untuk Ag LPS 1/1000, yang dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil *optical density* (OD) rata-rata uji ELISA menggunakan substrat TMB berdasarkan konsentrasi antigen LPS

Hasil Lateral Flow	Ag LPS 1/500	Ag LPS 1/750	Ag LPS 1/1000
Blanko	0.056	0.056	0.056
Kontrol negatif	0.137	0.125	0.121
LF. Negatif	0.228	0.205	0.195
LF. Negatif	0.233	0.218	0.209
LF. Negatif	0.257	0.245	0.229
LF. Positif 1	0.268	0.259	0.249
LF. Positif 1 kultur	0.327	0.314	0.291
LF. Positif 2	0.407	0.385	0.389
LF. Positif 3	0.493	0.469	0.440
LF. Positif 4	0.619	0.610	0.601
LF. Kontrol Positif	0.727	0.718	0.710

Berdasarkan pengenceran serum maka nilai OD tertinggi pada pengenceran serum 1/100, yaitu OD : 0,525 untuk Ag LPS 1/500, OD : 0,506 untuk Ag LPS : 1/750, OD : 0,509 untuk Ag LPS 1/1000, dan nilai OD terendah pada pengenceran serum 1/800 masing-masing OD : 0,185 untuk Ag LPS 1/500, OD : 0,178 untuk 1/750 dan OD : 0,169 untuk Ag LPS 1/1000, seperti pada tabel 2

Tabel 2. Hasil Nilai *Optical Density* (OD) rata-rata uji ELISA substrat TMB Berdasarkan Pengenceran Serum

	Ag LPS 1/500	Ag LPS 1/750	Ag LPS 1/1000
1/100	0.525	0.516	0.509
1/200	0.390	0.376	0.360
1/400	0.264	0.254	0.244
1/800	0.185	0.178	0.169

#### IV.1.5. Uji ELISA Menggunakan Substrat *P-nitrophenil Phospat* (PnPP)

Hasil uji ELISA menggunakan substrat *P-nitrophenil Phospat* (PnPP) (PnPP) yaitu *optical density* (OD) terendah pada kontrol negatif yaitu OD : 0,066 untuk Ag LPS 1/500, OD : 0,065 untuk Ag LPS 1/750 dan OD : 0,79 untuk Ag LPS : 1/1000. Hasil OD tertinggi pada sampel dengan lateral flow positif 2 yaitu OD : 0,094 untuk Ag LPS 1/500, OD : 0,094 untuk Ag LPS 1/750, OD : 0,093 untuk Ag LPS 1/1000, yang dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil *Optical Density* (OD) rata-rata uji ELISA substrat PnPP berdasarkan konsentrasi Ag LPS

Hasil Lateral Flow	Ag LPS 1/500	Ag LPS 1/750	AgLPS 1/1000
Blanko	0.066	0.065	0.067
Kontrol negatif	0.077	0.076	0.079
LF. Negatif	0.081	0.079	0.075
LF. Negatif	0.084	0.084	0.089
LF. Negatif	0.087	0.084	0.063
LF. Positif 1	0.086	0.086	0.084
LF. Positif 1 kultur	0.090	0.084	0.087
LF. Positif 2	0.094	0.094	0.093
LF. Positif 3	0.088	0.082	0.091
LF. Positif 4	0.090	0.087	0.088
LF. Kontrol Positif	0.094	0.088	0.089

Berdasarkan pengenceran serum maka hasil OD tertinggi pada pengenceran serum 1/100. Menggunakan Ag LPS 1/500 Hasil OD terendah pada pengenceran serum 1/800 yaitu OD : 0,081 untuk Ag LPS 1/500, OD : 0,082 untuk Ag LPS 1/750 dan OD dan Ag LPS 1/1000 yaitu OD : 0,088 untuk Ag LPS 1/500, OD : 0,085 untuk Ag LPS 1/750 dan pengenceran 1/200 untuk Ag LPS 1/1000, yang dapat dilihat pada tabel 4 .

Tabel 4. Hasil *Optical Density* (OD) rata-rata uji ELISA substrat PnPP berdasarkan pengenceran serum

Pengenceran serum	Ag LPS 1/500	Ag LPS 1/750	Ag LPS 1/1000
1/100	0.088	0.085	0.085
1/200	0.086	0.083	0.086
1/400	0.085	0.082	0.084
1/800	0.081	0.082	0.082

Untuk mengetahui apakah antigen yang telah diisolasi adalah benar-benar antigen LPS *Salmonella typhi* maka selain serum kontrol negatif dan positif yang dipakai, digunakan juga antigen LPS kontrol yang telah diketahui sensitivitas dan spesifisitasnya, dan hasilnya diperoleh nilai OD dengan perbedaan yang sangat kecil antara kedua antigen yang dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil *Optical Density* (OD) rata-rata ELISA Substrat TMB menggunakan antigen LPS Jayapura dan Antigen LPS kontrol

	Ag LPS Jayapura	Ag LPS Kontrol
Kontrol Negatif	0.128	0.120
Kontrol Positif	0.718	0.697
LF Negatif	0.209	0.173
LF Positif (+4)	0.610	0.568

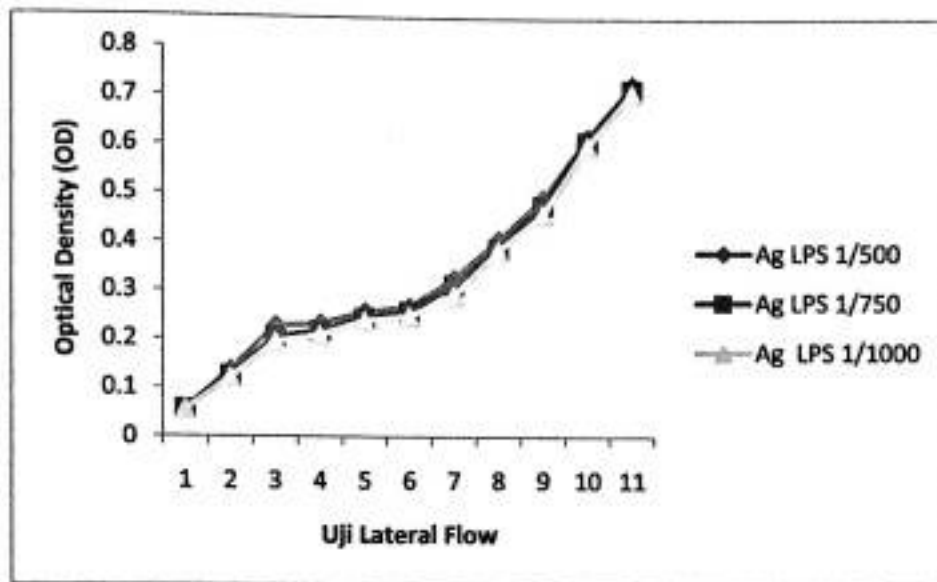
## IV.2. Pembahasan

Dari penelitian ini hasil uji Widal tidak sebanding dengan uji kultur, dimana dari hasil uji Widal dengan titer  $\geq 1/160$  sebanyak 62 sampel hanya satu sampel yang memberikan hasil kultur positif *Salmonella typhi*. Hal ini disebabkan karena uji Widal memiliki sensitivitas dan spesifitas yang rendah dan adanya reaksi silang dengan penyakit lain, dan nilai ramalnya sangat bervariasi tergantung daerah geografis (5).

Selain itu uji kultur yang merupakan *gold standar* untuk diagnosis demam tifoid mempunyai sensitivitas yang rendah dan hasilnya dipengaruhi oleh banyak faktor, baik dari faktor sampel yang digunakan maupun dari faktor teknik pengujiannya (3).

Berhasilnya diisolasi antigen LPS dengan *metoda hot phenol water* karena dengan metoda ini *Salmonella typhi* dipecahkan secara kimiawi dan antigen lipopolisakarida dipisahkan dengan antigen lain dari tubuh kuman tetapi tidak merusak struktur dari antigen itu sendiri.

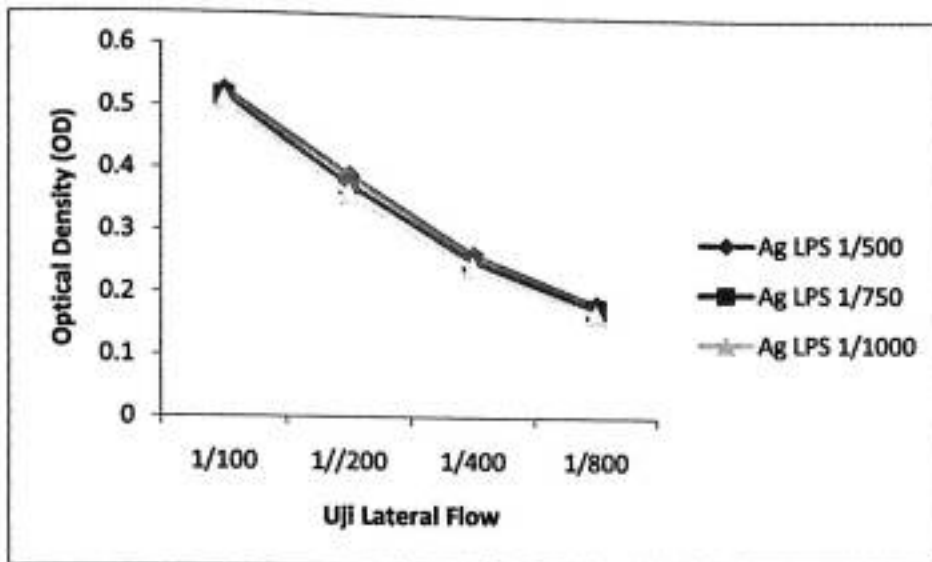
Hasil uji ELISA menggunakan substrat TMB untuk konsentrasi 1/500, 1/750, 1/1000 menunjukkan hasil *optical density* (OD) dengan perbedaan yang kecil untuk ketiga konsentrasi dan sebanding hasil uji lateral yang dapat dilihat pada gambar 7, ini disebabkan karena uji lateral flow menggunakan antigen LPS, dan adanya ikatan yang stabil antara antigen LPS dan Ig M pada serum pasien yang pada penambahan substrat TMB terjadi proses penguraian dengan sempurna.



Gambar 7. Profil hasil uji ELISA menggunakan substrat TMB berdasarkan konsentrasi antigen LPS

Berdasarkan pengenceran serum diperoleh hasil bahwa nilai OD tertinggi adalah pengenceran 1/100 dan terendah adalah pengenceran 1/800 pada uji ELISA menggunakan substrat TMB. Kenaikan nilai OD sebanding dengan besarnya pengenceran serum untuk tiap konsentrasi seperti pada grafik 8.

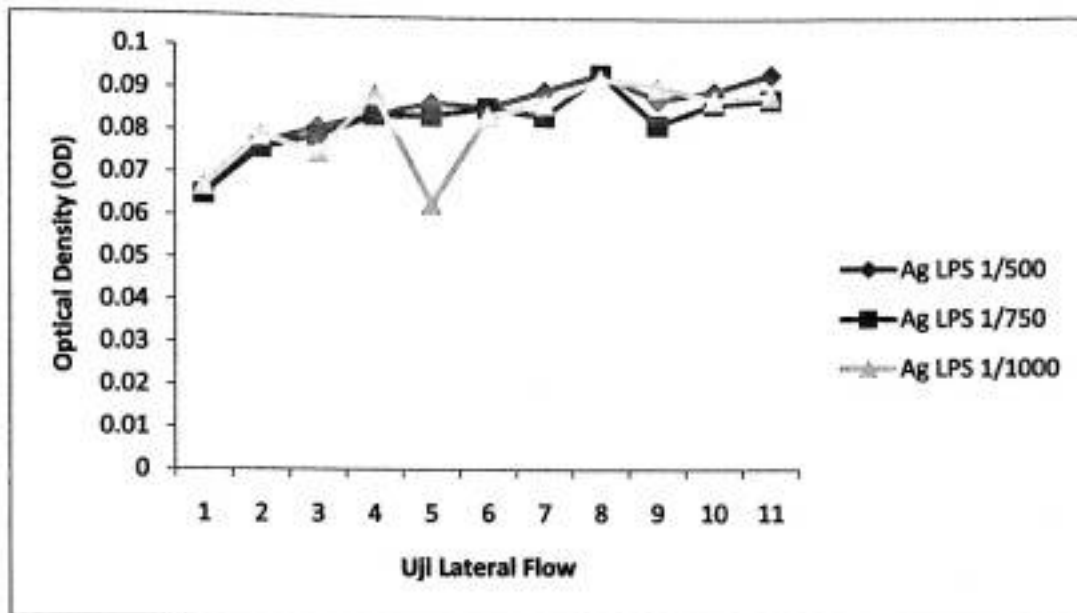
Hal ini terjadi karena pada pengenceran 1/100 titer antibodi yang dalam hal ini adalah immunoglobulin M (IgM) berada pada konsentrasi tinggi dan terjadi ikatan yang stabil antara antigen LPS dan IgM dari penderita engan antigen LPS yang telah diisolasi.



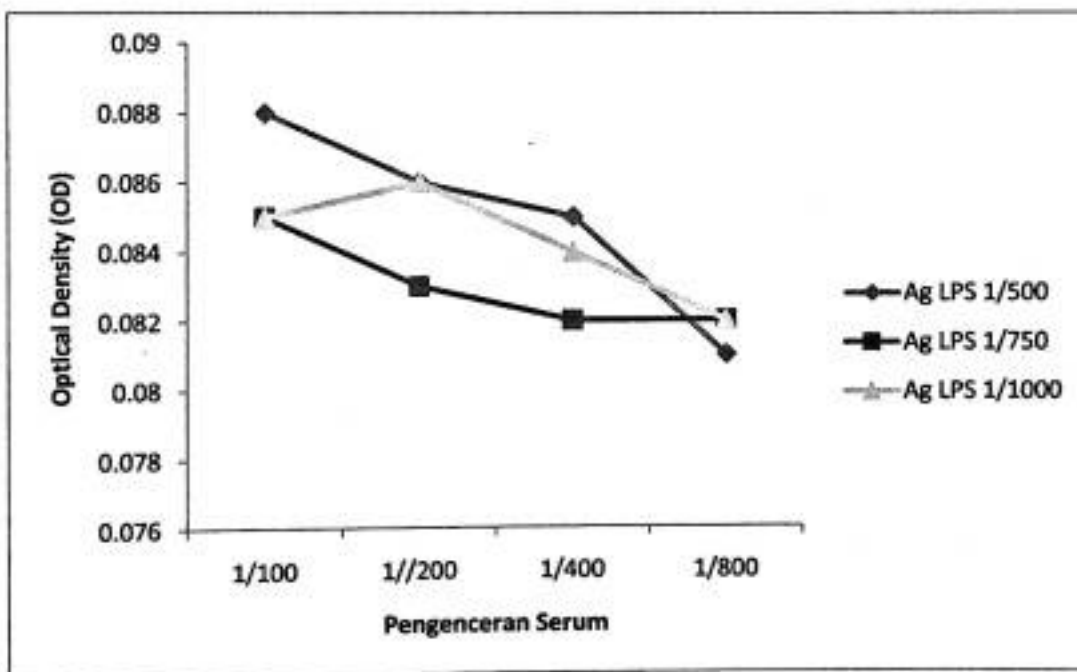
Gambar 8. Profil hasil uji ELISA TMB Berdasarkan Pengenceran Serum

Hasil uji ELISA menggunakan substrat *P-nitrophenil phospat* (PnPP) menunjukkan hasil yang tidak bermakna antara nilai optical density terhadap kontrol maupun sampel serum. Terdapat hasil yang tidak sebanding untuk tiap konsentrasi antigen LPS (1/500, 1/750, 1/1000) dengan hasil uji lateral flow seperti pada gambar 9, dan nilai OD juga tidak sebanding dengan pengenceran serum seperti pada gambar 10.

Hal ini terjadi karena substrat PnPP yang direaksikan dengan antibodi berlabel enzim tidak dapat mengikat antigen-antibodi untuk membentuk ikatan kompleks antigen-antibodi berlabel enzim sehingga pada laju penguraian tidak terjadi perubahan warna (34).



Gambar 9. Profil hasil uji ELISA substrat PnPP berdasarkan konsentrasi Ag LPS



Gambar 10. Profil hasil uji ELISA substrat PnPP berdasarkan pengenceran serum

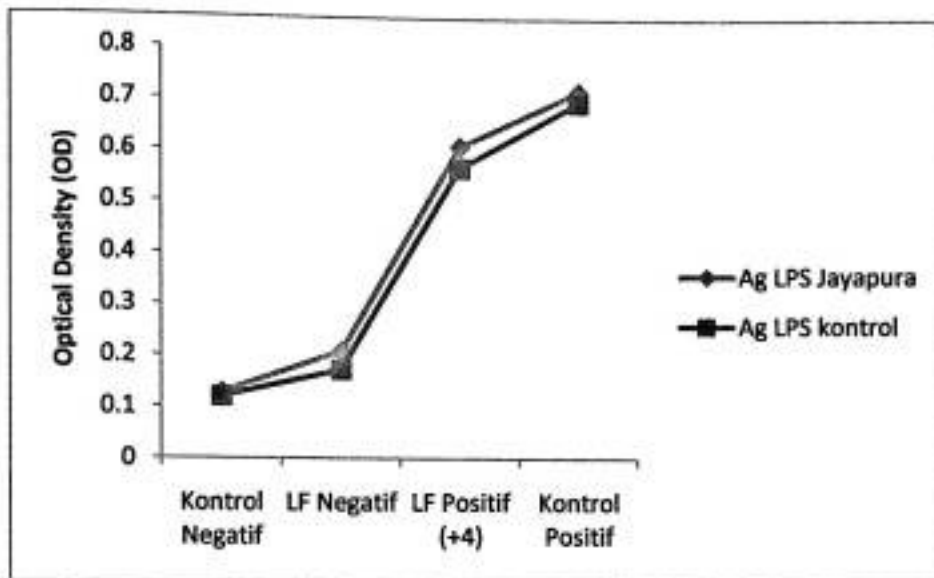
Berdasarkan hasil uji ELISA menggunakan substrat TMB diperoleh hasil bahwa ketiga konsentrasi antigen LPS yaitu 1/500, 1/750, 1/1000 memberikan hasil OD dengan perbedaan yang kecil sehingga ketiga



konsentrasi antigen LPS dapat dipakai tetapi dalam penelitian ini konsentrasi yang dianggap terbaik untuk uji serologis yaitu konsentrasi Ag LPS 1/1000.

Hal ini terjadi berdasarkan penelitian yang dilakukan Salonen dan Vaheeri pada tahun 1979 yang membuktikan bahwa banyaknya antigen yang diperlukan untuk reaktivitas tertinggi sebenarnya sangat kecil dibandingkan dengan jumlah antigen yang ditambahkan pada penyangga pelapis (35). Antigen yang dilapiskan pada matriks padat (*plate*) harus berada optimum sehingga semua tempat pengikatan antigen tertempel penuh dan tersedia sebanyak mungkin tempat reseptor antibodi. Makin tinggi konsentrasi antigen, makin tinggi pula laju antigen yang terlepas karena kerapatannya tinggi (34).

Hasil uji ELISA menggunakan substrat TMB antara antigen LPS Jayapura dan antigen LPS kontrol menunjukkan nilai OD yang hampir sama pada kontrol negatif dan positif (pada gambar 11). Hal ini disebabkan antigen yang telah diisolasi dari Jayapura adalah antigen LPS *Salmonella typhi*. Dan adanya perbedaan yang lebih besar pada hasil OD serum pasien disebabkan adanya ikatan yang stabil antara antigen LPS Isolat Jayapura dengan antibodi IgM serum pasien yang berasal dari daerah endemik yang sama.



Gambar 11. Profil hasil uji ELISA Substrat TMB menggunakan antigen LPS Jayapura dan Antigen LPS kontrol

Hasil uji ELISA menggunakan substrat TMB menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan uji ELISA menggunakan substrat PnPP. Hal ini disebabkan substrat TMB dengan komposisi utamanya TMB sigma T2885 dan sigma U1753 bersama dengan enzim peroksidase dari *antihuman IgM* dapat mengikat secara langsung antigen-antibodi sehingga terbentuk ikatan kompleks antigen-antibodi berlabel enzim dibandingkan substrat PnPP yang komposisi utamanya sigma N27565 + tris buffer sigma T8790 dan laju penguraian (hidrolisis) akan terjadi seiring dengan perubahan warna (34,35).

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### V.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa :

1. Antigen lipopolisakarida *Salmonella typhi* berhasil diisolasi dari pasien suspek demam tifoid yang berdomisili tetap di Jayapura.
2. Konsentrasi antigen lipopolisakarida (LPS) isolat lokal Jayapura yang terbaik untuk uji serologis yaitu 1/1000.

#### V.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui sensitivitas dan spesifisitas antigen lipopolisakarida isolat lokal Jayapura dengan antibodi penderita demam tifoid daerah setempat.
2. Perlu dilakukan penelitian untuk membuat alat uji lateral flow menggunakan antigen lipopolisakarida isolat lokal dari Jayapura.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Rampengan, TH, Laurentz. *Penyakit Infeksi Tropik pada Anak*. Penerbit Kedokteran EGC, Jakarta. 2007
2. Retnowardani, A. *SmartLiving, Hidup sehat Bersama Prodia*, Edisi 06 Februari 2007, Laboratorium Klinik Prodia, Jakarta, 2007.
3. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, *Laporan Riskesdas Nasional 2007*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 2008. Hal. 107. <http://www.litbang.depkes.go.id/LaporanRKD/Nasional.pdf>. diakses tanggal 26 april 2009.
4. Badan penelitian dan Pengembangan Kesehatan *Laporan Riskesdas Provinsi Papua 2008*. hal. 81. <http://www.litbang.depkes.go.id/LaporanRKD/Papua/laporanPapua.pdf>: diakses tanggal 26 april 2009.
5. Silvia, Y, Mulyawan, Julius, ES. *Diagnosa Dini Demam Tifoid Dengan Menggunakan Protein Membran Luar*, Jakarta, 1999.
6. Hardjoeno, H. *Interpretasi Hasil Tes Diagnostik*. Penerbit Hasanuddin University Press (LEPHAS), Makassar, 2006.
7. Rohim, A, Saharso, D. *Ilmu Penyakit Anak, diagnose dan Penatalaksanaan*. Penerbit Salemba Medika. Jakarta, 2002.
8. Chrishartono T, *Informasi Produk Tubex TF*. Penerbit PT Pacific Biotekindo Intralab, Jakarta. 2006.
9. Puspa Wardani, Prihatini, Probahoosodo, MY, *Kemampuan Uji Tabung Widal menggunakan Antigen Import dan Antigen Lokal*. Jakarta. 2001.
10. Sjaifoellah Noer, *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*, Balai Penerbit FKUI, Jakarta. 1996.
11. Jawetz, Melnick dan Adelbergs, *Mikrobiologi Kedokteran*. Penerbit Salemba Medika, Jakarta, 2001.
12. Kaniawati M, *Informasi Laboratorium Klinik Prodia*. Laboratorium Klinik Prodia, Jakarta, 2006.
13. Lakare C, *Mikrobiologi Kedokteran II (Bagian Special)*, Bagian Mikrobiologi Kedokteran Unhas, Makassar, 2005.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Rampengan, TH, Laurentz. *Penyakit Infeksi Tropik pada Anak*. Penerbit Kedokteran EGC, Jakarta. 2007
2. Retnowardani, A. *SmartLiving, Hidup sehat Bersama Prodia*, Edisi 06 Februari 2007, Laboratorium Klinik Prodia, Jakarta, 2007.
3. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, *Laporan Riskesdas Nasional 2007*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 2008. Hal. 107. <http://www.litbang.depkes.go.id/LaporanRKD/Nasional.pdf>. diakses tanggal 26 april 2009.
4. Badan penelitian dan Pengembangan Kesehatan *Laporan Riskesdas Provinsi Papua 2008*. hal. 81. <http://www.litbang.depkes.go.id/LaporanRKD/Papua/aporanPapua.pdf>: diakses tanggal 26 april 2009.
5. Silvia, Y, Mulyawan, Julius, ES. *Diagnosa Dini Demam Tifoid Dengan Menggunakan Protein Membran Luar*, Jakarta, 1999.
6. Hardjoeno, H. *Interpretasi Hasil Tes Diagnostik*. Penerbit Hasanuddin University Press (LEPHAS), Makassar, 2006.
7. Rohim, A, Saharso, D. *Ilmu Penyakit Anak, diagnose dan Penatalaksanaan*. Penerbit Salemba Medika. Jakarta, 2002.
8. Chrishartono T, *Informasi Produk Tubex TF*. Penerbit PT Pacific Biotekindo Intralab, Jakarta. 2006.
9. Puspa Wardani, Prihatini, Probahoosodo, MY, *Kemampuan Uji Tabung Widal menggunakan Antigen Import dan Antigen Lokal*. Jakarta. 2001.
10. Sjaifoellah Noer, *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*, Balai Penerbit FKUI, Jakarta. 1996.
11. Jawetz, Melnick dan Adelbergs, *Mikrobiologi Kedokteran*. Penerbit Salemba Medika, Jakarta, 2001.
12. Kaniawati M, *Informasi Laboratorium Klinik Prodia*. Laboratorium Klinik Prodia, Jakarta, 2006.
13. Lakare C, *Mikrobiologi Kedokteran II (Bagian Special)*, Bagian Mikrobiologi Kedokteran Unhas, Makassar, 2005.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Rampengan, TH, Laurentz. *Penyakit Infeksi Tropik pada Anak*. Penerbit Kedokteran EGC, Jakarta. 2007
2. Retnowardani, A. *SmartLiving, Hidup sehat Bersama Prodia*, Edisi 06 Februari 2007, Laboratorium Klinik Prodia, Jakarta, 2007.
3. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, *Laporan Riskesdas Nasional 2007*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 2008. Hal. 107. <http://www.litbang.depkes.go.id/LaporanRKD/Nasional.pdf>. diakses tanggal 26 april 2009.
4. Badan penelitian dan Pengembangan Kesehatan *Laporan Riskesdas Provinsi Papua 2008*. hal. 81. <http://www.litbang.depkes.go.id/LaporanRKD/Papua/laporanPapua.pdf>: diakses tanggal 26 april 2009.
5. Silvia, Y, Mulyawan, Julius, ES. *Diagnosa Dini Demam Tifoid Dengan Menggunakan Protein Membran Luar*, Jakarta, 1999.
6. Hardjoeno, H. *Interpretasi Hasil Tes Diagnostik*. Penerbit Hasanuddin University Press (LEPHAS), Makassar, 2006.
7. Rohim, A, Saharso, D. *Ilmu Penyakit Anak, diagnose dan Penatalaksanaan*. Penerbit Salemba Medika. Jakarta, 2002.
8. Chrishartono T, *Informasi Produk Tubex TF*. Penerbit PT Pacific Biotekindo Intralab, Jakarta. 2006.
9. Puspa Wardani, Prihatini, Probahoosodo, MY, *Kemampuan Uji Tabung Widal menggunakan Antigen Import dan Antigen Lokal*. Jakarta. 2001.
10. Sjaifoellah Noer, *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*, Balai Penerbit FKUI, Jakarta. 1996.
11. Jawetz, Melnick dan Adelbergs, *Mikrobiologi Kedokteran*. Penerbit Salemba Medika, Jakarta, 2001.
12. Kaniawati M, *Informasi Laboratorium Klinik Prodia*. Laboratorium Klinik Prodia, Jakarta, 2006.
13. Lakare C, *Mikrobiologi Kedokteran II (Bagian Special)*, Bagian Mikrobiologi Kedokteran Unhas, Makassar, 2005.

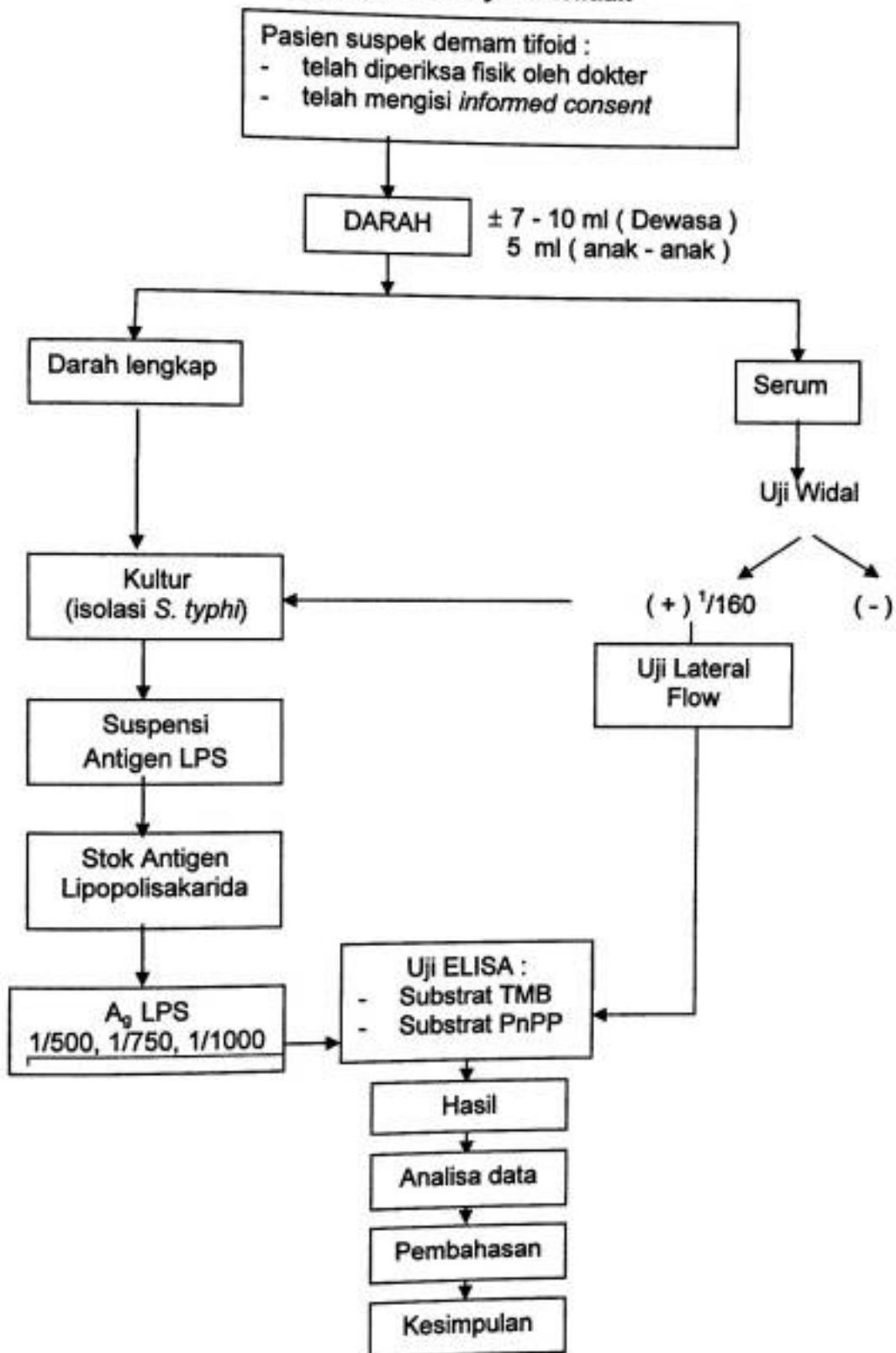
14. Endene and Vden. *Typhoid Fever*. [www.itg.be/itg/distansel/learning/lecture Notes Vanden Endene/Teksten/Sylabus/30 typhoid Fever, doc](http://www.itg.be/itg/distansel/learning/lecture%20Notes%20Vanden%20Endene/Teksten/Sylabus/30%20typhoid%20Fever.doc). diakses 26 April 2009.
15. Garrity, G.2000. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2<sup>nd</sup> Edition*.[http://www.cme.msu.edu/Bergey's Outline.trn.pds](http://www.cme.msu.edu/Bergey's%20Outline.trn.pds).diakses tanggal 2 Mei 2009.
16. Soemarno, *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Klinik*. Akademi Analis Kesehatan DepKes RI, Yogyakarta.2000.
17. Supardi I, Sukamto, *Mikrobiologi Dalam Pengelolaan dan Keamanan Pangan*, Bandung.1999.hal.158 – 159.
18. Pasaribu S, *Imunologi Demam Tifoid*, Dalam Majalah Kedokteran Nusantara, Medan, Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara, vol 34 .2001.
19. Bakri S, *Imunogenitas Antigen O Salmonella Typhi antara Isolat dan Strain Makassar dan Isolat Strain dari Surabaya dala Menginduksi Antibodi*. Tesis PascaSarjana Program Studi Imunologi, Universitas Airlangga, Surabaya.2002.
20. Kadang, KJ. *Pengenalan Dini Demam Tifoid*, Makalah Temu Muka dan Konsultasi Metoda cepat mengatasi Demam, Klinik Anak, Bekasi. 2000.
21. Sari ID, *Demam Tifoid Salah Satu Penyakit Pada Musim Hujan*, [http://www.Demam Tifoid – htm](http://www.DemamTifoid-hm).Di akses Tanggal 26 April 2009
22. Abyankar.*Antigenic Structure of Salmonella*. [http://www.geocities.Com /avinas/antigen.htm](http://www.geocities.Com/avinas/antigen.htm) 1.diakses 27 Mei 2009
23. Sudoyo, WA, Setyohadi B, Idrus, Simadibrata M, Sitiadi S, *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Edisi 04*, Pusat Penerbitan Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2007.
24. Handoko. IS. *Demam Tifoid Dalam Klinikku*.[www.klinikku.com/pustaka /Medis /inf/tifoid.htm](http://www.klinikku.com/pustaka/Medis/inf/tifoid.htm). Di akses tanggal 21 April 2009
25. Baratawidjaya, KG. *Imunologi Dasar Edisi 4*, Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, 2000.
26. Kresno SB, *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Edisi Keempat. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, 2001.

27. Wiedosari, E. *Metoda Ilmiah dalam Pengembangan Immunologi*. <http://members.tripod.com//ugm.htm>. diakses tanggal 10 Februari 2009.
28. Salam, A, Sastro, M. *Imunokimia*. Penerbit Andi Offset, Yogyakarta, 1998.
29. Levinson W, Jawetz, G. *Medical Microbiology dan Immunology Examination & Board Review*, seventh edition, International Edition, 2003.
30. Hatta. M. *Simple Dipstik Assay for The Determination S. Typhi Specific IgM Antibodies and Evolution of The Immune Response in Patienth with Typhoid fever*. The American Journal of Tropical Medicin and Hygiene, vol.66.no.4.2002.
31. Lay, Bibiana. W, *Analisis Mikropa di Laboratorium*. PT.Raja Grafindo Persada. Jakarta.1994.
32. Pelczar.L. *Dasar – dasar Mikrobiologi*. Jilid II. Universitas Indonesia Press, Jakarta 1998.
33. Burges WS.Graham. *Teknologi Elisa Dalam Diagnosis dan Penelitian*, Universitas Gajah Mada Yogyakarta, 1995.
34. Pastoor R, Hatta M, Abdul TH, Smitz HC, *Simple Rapid and Affor Double Point off Care Test For the Serodiagnosis of Typhoid Fever*, [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) . di akses tanggal 24 Mei 2009
35. Westphal O and Jann J *Bacterial Lipopolisacharida Extraction With Phenol Water and Futher Application of Procedur Methods carbohydrate Chemistry* 1965, 5:83-91



## Lampiran I.

## Skema Alur Kerja Penelitian



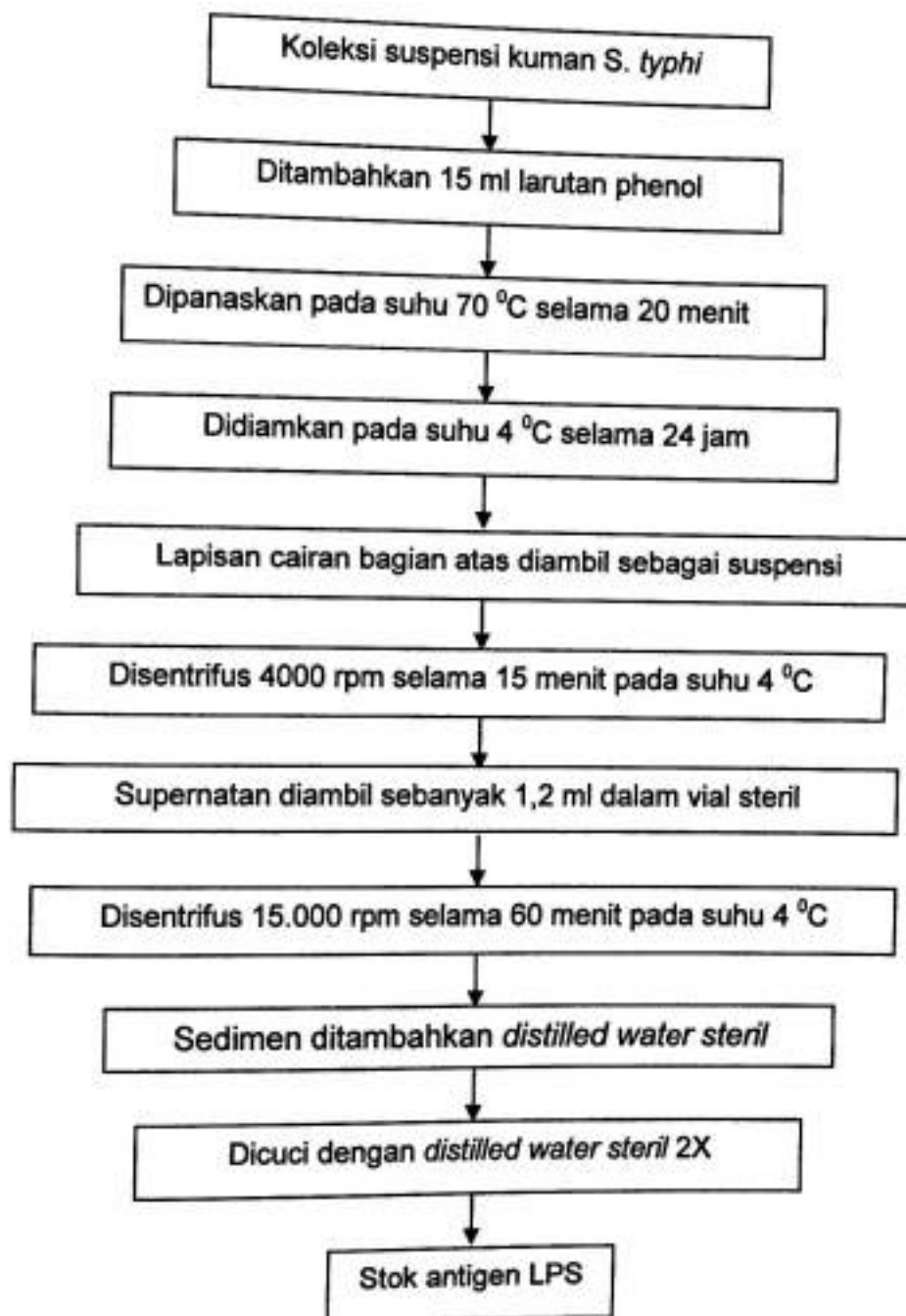
## Lampiran II

## Skema Kerja Widal



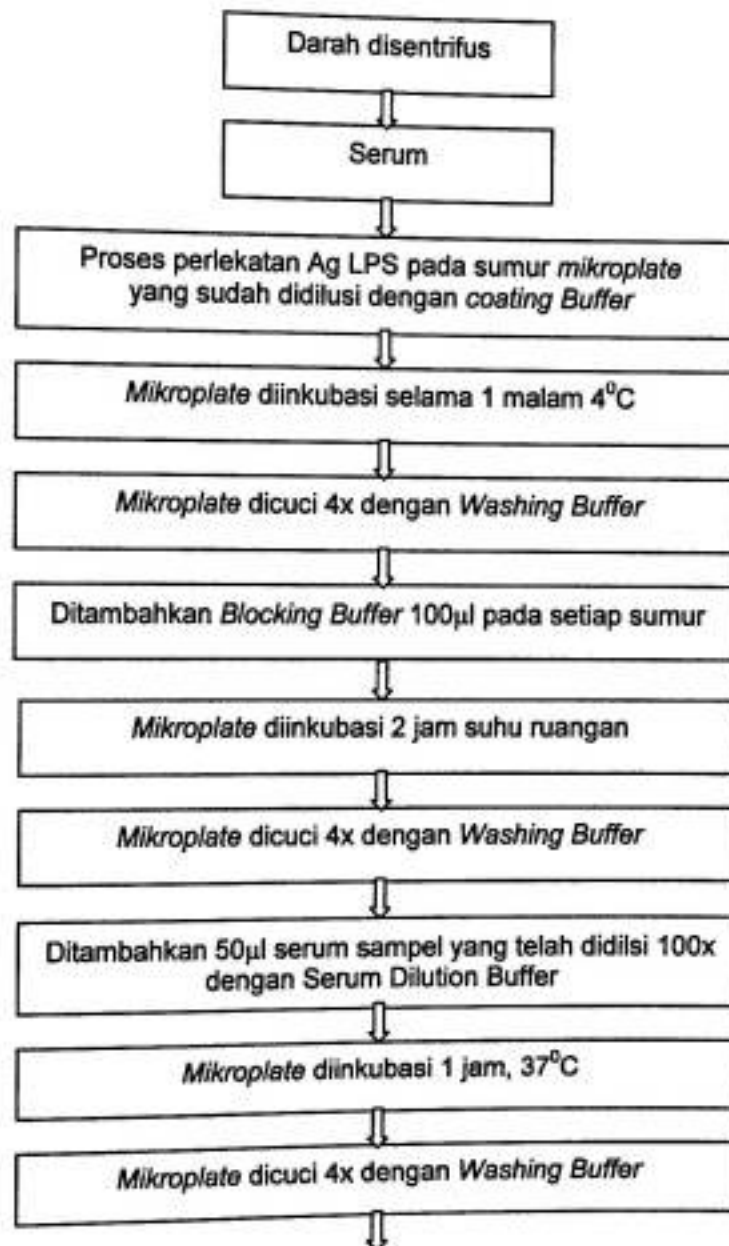
## Lampiran III

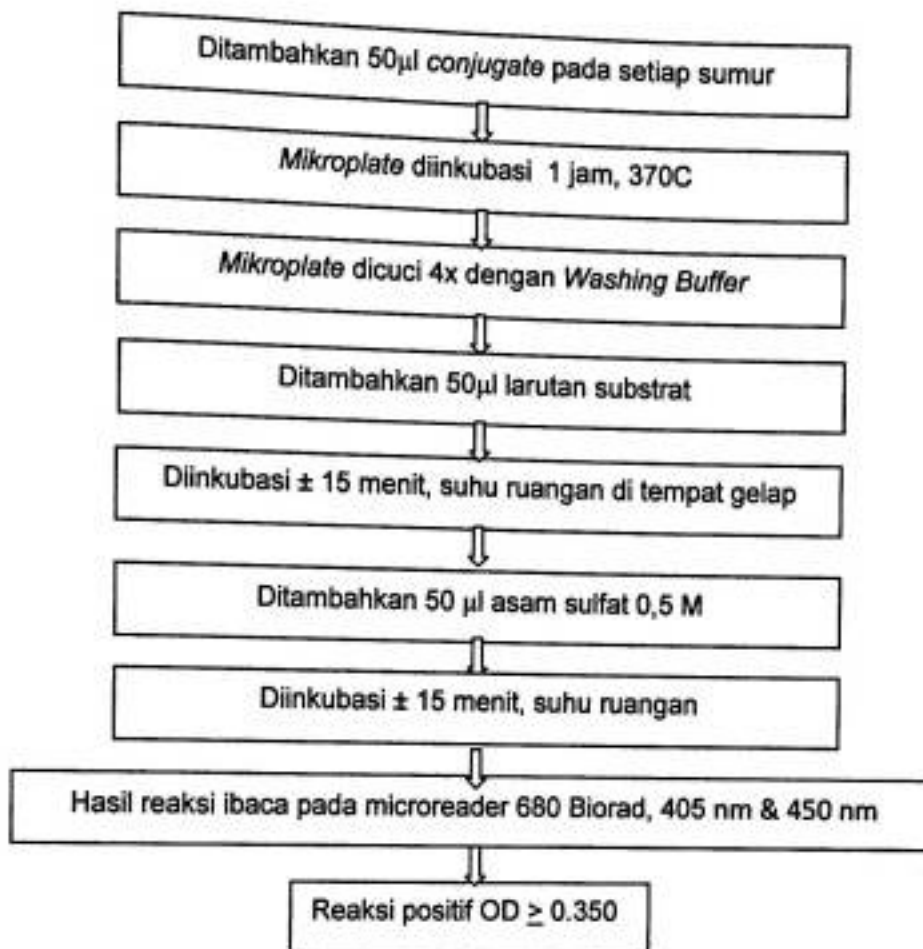
## Skema Kerja Ekstraksi Dan Purifikasi Antigen LPS



## Lampiran IV

## Skema Kerja Teknik ELISA







Lampiran VI

Distribusi Sampel Pada Mikroplate

	Ag LPS 1/500				Ag LPS 1/750				Ag LPS 1/1000				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	Blanko
B	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	Kontrol Negatif
C	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	LF. Negatif
D	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	LF. Negatif
E	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	LF. Negatif
F	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	LF. Positif 1
G	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	LF. Positif Kultur
H	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	LF. Positif 2

Ket :

Blanko (sum : Sampel dari aquadest, sumur mikroplate tanpa di coating

Sampel (sumur B-H)

## Lampiran VII

## Hasil uji Elisa menggunakan Substrat TMB Terhadap Serum Pasien

Ag LPS 1/500				Ag LPS 1/750				Ag LPS 1/1000				
1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	Pngcran Serum
0.058	0.056	0.055	0.057	0.058	0.056	0.055	0.057	0.058	0.056	0.055	0.057	Blanko
0.193	0.141	0.119	0.097	0.171	0.128	0.106	0.094	0.162	0.114	0.103	0.086	Kontrol Negatif
0.31	0.275	0.182	0.147	0.284	0.247	0.173	0.114	0.271	0.224	0.17	0.117	LF. Negatif
0.327	0.278	0.192	0.186	0.311	0.262	0.183	0.121	0.292	0.253	0.174	0.114	LF. Negatif
0.389	0.301	0.177	0.142	0.377	0.299	0.181	0.13	0.349	0.283	0.166	0.127	LF. Negatif
0.434	0.289	0.207	0.144	0.404	0.255	0.177	0.126	0.397	0.255	0.168	0.126	LF. Positif 1
0.557	0.358	0.232	0.161	0.514	0.357	0.227	0.159	0.482	0.327	0.208	0.146	LF. Pos. 1 Kultur
0.645	0.464	0.31	0.209	0.621	0.417	0.302	0.202	0.587	0.461	0.291	0.194	LF. Positif 2
0.753	0.573	0.399	0.248	0.726	0.495	0.365	0.253	0.629	0.516	0.372	0.244	LF. Positif 3
0.977	0.738	0.467	0.297	0.963	0.689	0.459	0.307	0.952	0.593	0.435	0.274	LF. Positif 4
1.136	0.817	0.56	0.395	1.126	0.804	0.541	0.382	1.121	0.782	0.491	0.367	Kontrol Positif
Ag LPS Kontrol												
0.184	0.148	0.119	0.098	0.176	0.123	0.101	0.84	0.153	0.109	0.092	0.071	Kontrol Negatif
0.271	0.242	0.147	0.113	0.263	0.237	0.162	0.101	0.258	0.213	0.16	0.097	LF Negatif
0.968	0.717	0.432	0.274	0.957	0.641	0.429	0.282	0.931	0.563	0.417	0.256	LF Positif 4
1.126	0.801	0.541	0.371	1.113	0.786	0.524	0.367	1.114	0.771	0.473	0.352	Kontrol Positif

## Lampiran VIII

Hasil uji Elisa menggunakan Substrat PnPP Terhadap Serum Pasien

Ag LPS 1/500				Ag LPS 1/750				Ag LPS 1/1000				
1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800	Pngcran Serum
0.068	0.064	0.064	0.067	0.066	0.068	0.063	0.065	0.064	0.067	0.069	0.064	Blanko
0.081	0.075	0.081	0.071	0.079	0.078	0.072	0.074	0.079	0.08	0.079	0.081	Kontrol Negatif
0.08	0.084	0.079	0.082	0.093	0.077	0.072	0.074	0.077	0.079	0.074	0.072	LF. Negatif
0.087	0.089	0.08	0.083	0.083	0.083	0.086	0.084	0.094	0.092	0.087	0.083	LF. Negatif
0.085	0.088	0.088	0.088	0.084	0.084	0.086	0.084	0.082	0.088	0.083	0.082	LF. Negatif
0.089	0.087	0.089	0.081	0.088	0.086	0.087	0.086	0.089	0.081	0.084	0.083	LF. Positif 1
0.086	0.101	0.087	0.088	0.084	0.086	0.084	0.085	0.087	0.088	0.087	0.087	LF. Pos. 1 Kultur
0.098	0.087	0.099	0.094	0.096	0.094	0.095	0.093	0.092	0.094	0.096	0.092	LF. Positif 2
0.098	0.089	0.085	0.082	0.084	0.076	0.086	0.082	0.098	0.099	0.089	0.088	LF. Positif 3
0.098	0.09	0.09	0.083	0.089	0.086	0.086	0.086	0.089	0.087	0.088	0.087	IF. Positif 4
0.104	0.097	0.091	0.085	0.086	0.093	0.087	0.087	0.089	0.09	0.089	0.087	Kontrol Positif
Ag LPS Kontrol												
0.082	0.085	0.081	0.087	0.077	0.087	0.084	0.081	0.078	0.082	0.082	0.085	Kontrol Negatif
0.078	0.083	0.081	0.087	0.081	0.084	0.082	0.081	0.087	0.084	0.086	0.082	LF Negatif
0.087	0.081	0.082	0.08	0.08	0.088	0.088	0.082	0.084	0.098	0.087	0.086	LF Negatif 4
0.092	0.09	0.091	0.089	0.089	0.09	0.094	0.091	0.089	0.087	0.09	0.091	Kontrol Positif



## Hasil uji widal, uji kultur dan uji lateral flow

NO	TANGGAL	NAMA PASIEN	UMUR	SEK	SUKU	GEJALA/RIWAYAT	WIDAL	KULTUR	LI
1	13-01-09	JPR 01	3	L	37	Demam sejak 5 hari yang lalu			
2	15-01-09	JPR 02	40	L	37	Diarete 1 Minggu, nyeri	H1/40, BO1/40		Negatif
3	15-01-09	JPR 03	51	L	37	Demam ±2 hari	O1/80, HC 1/640		Negatif
4	15-01-09	JPR 04	9	P	38,5	Panas ± 5 hari,nyeri perut	O 1/320	Negatif	Negatif
5	15-01-09	JPR 05	14	P	38	Panas ± 5 hari, Nyeri perut	O1/160,H1/80	Negatif	Positif
6	19-01-09	JPR 06	26	P	37,5	Panas 4 hari	O1/160,H1/80	Negatif	Negatif
7	19-01-09	JPR 07	30	L	37,5	Panas 1, demam, lidah kotor	OB 1/160, HC 1/640	Negatif	Negatif
8	20-01-09	JPR 08	22	P	38	Panas sejak 3 hari lalu	O 1/160	Negatif	Positif
9	20-01-09	JPR 09	32	P	37,5	Panas dengan 3 hari	HB 1/160	Negatif	Negatif
10	20-01-09	JPR 10	17	P	37,5	Panas dengan 4 hari	O1/320, HB 1/160	Negatif	Negatif
11	20-01-09	JPR 11	33	P	38	Demam 4 hari, menggigil saat diambil darah	O 1/320	Negatif	Positif
12	20-01-09	JPR 12	15	P	37,5	Panas 1 minggu	O 1/80, H 1/80	Negatif	Negatif
13	21-01-09	JPR 13	35	L	37,5	Demam sejak 1 minggu	H 1/320	Negatif	Negatif
14	21-01-09	JPR 14	44	L	38	Panas 1 minggu, nyeri perut	O 1/320	Negatif	Positif
15	26-01-09	JPR 15	25	P	37,5	Panas 3 hari, riwayat tifod	O 1/160, H 1/320	Negatif	Negatif
16	26-01-09	JPR 16	24	P	38,5	Demam 1 minggu, riwayat tifoid	O>1/320,H1/160	Negatif	Positif
17	28-01-09	JPR 17	33	L	38,5	Panas 4 hari	O>1/320	Negatif	Positif
18	28-01-09	JPR 18	25	L	38,5	Panas 5 hari	O 1/320, H 1/320	Negatif	Negatif
19	29-01-09	JPR 19	50	L	38,5	Panas 5 hari	O >1/320, H>1/320	Negatif	Negatif
20	1/2/2009	JPR 20	31	P	37	Demam 5 hari,nyeri perut	O >1/320, H>1/320	Negatif	Positif
21	1/3/2009	JPR 21	20	P	37,5	Panas 5 hari	H 1/320	Negatif	Positif
22	1/4/2009	JPR 22	3	L	37,5	Panas 4 hari	H 1/320	Negatif	Negatif
23	1/5/2009	JPR 23	22	L	38,5	Panas 4 hari	H 1/320	Negatif	Positif
24	17-02-09	JPR 24	7	L	37,5	Panas 1 minggu,diare 1 minggu	O 1/320, H 1/320	Negatif	Negatif
25	19-02-09	JPR 25	38	P	37,5	Panas 4 hari	O 1/320	Negatif	Negatif
26	20-02-09	JPR 26	47	P	37,5	Panas 4 hari	O 1/320	Negatif	Positif
27	23-02-09	JPR 27	35	P	37,5	Panas 1 minggu	O 1/320	Negatif	Negatif
28	4/4/2009	JPR 28	40	P	38	Panas 1 minggu	O 1/160	Negatif	Negatif
29	5/4/2009	JPR 29	23	P	37,5	Panas 3 hari	O 1/160, H 1/320	Negatif	Negatif
30	6/5/2009	JPR 30	11	L	38,5	Panas 1 minggu	O 1/160	Negatif	Positif
31	6/5/2009	JPR 31	30	L	38,5	Panas 3 hari	O 1/160	Negatif	Negatif
32	12/5/2009	JPR 32	44	L	37	Panas 3 hari	O 1/320	Negatif	Negatif
33	16/05/09	JPR 33	21	P	37,5	Panas 3 hari	O 1/320	Negatif	Positif
34	17/05/09	JPR 34	23	P	38	Panas 1 minggu	O 1/160,OB 1/320	Negatif	Negatif
35	22/05/09	JPR 35	23	P	37,5	Panas 3 hari	H 1/320	Negatif	Positif
36	24/05/09	JPR 36	24	L	38	Panas 3 hari	O 1/320, H 1/160	Negatif	Positif
37	26/05/09	JPR 37	24	L	37,5	Panas 3 hari	H 1/320	Negatif	Positif
38	29/05/09	JPR 38	18	P	37,5	Panas 3 hari	O 1/320	Negatif	Positif

TANGGAL	NAMA PASIEN	UMUR	SEX	SUHU	GEJALA KLINIS	W/DAL	KULTUR	U/P
29/05/09	JPR 39	31	L	37,5	Panas 3 hari			
1/6/2009	JPR 40	5	P	37,5	Panas 3 hari	O 1/320	Negatif	Positif
6-Jan	JPR 41	20	P	37,5	Panas 3 hari	O 1/320	Negatif	Negatif
5/6/2009	JPR 42	23	L	38	Panas 5 hari	O 1/320	Negatif	Negatif
7/6/2009	JPR 43	42	P	37,5	Panas 3 hari	H >1/320	Negatif	Negatif
7/6/2009	JPR 44	52	L	38,0	Panas 5 hari	H 1/320	Negatif	Negatif
8/6/2009	JPR 45	42	P	37,5	Panas 3 hari	H 1/320	Negatif	Negatif
9/6/2009	JPR 46	29	P	38,5	Panas 3 hari	H 1/320, O 1/160	Negatif	Positif
9/6/2009	JPR 47	28	P	38,0	Panas 3 hari	H >1/320, O 1/160	Negatif	Positif
09/06/09	JPR 48	38	P	37,5	Panas 3 hari	O 1/320	Negatif	Negatif
11/6/2009	JPR 49	50	L	38,0	Panas 3 hari	H 1/320	Negatif	Negatif
14/06/09	JPR 50	11	P	37,5	Panas 2 hari	H 1/320	Negatif	Negatif
14/06/09	JPR 51	30	P	38,0	Panas 3 hari	H >1/320	Negatif	Negatif
15/06/09	JPR 52	11	P	38	Demam ± 10 hari	O 1/320	Negatif	Negatif
16/06/09	JPR 53	28	P	37,5	Panas 3 hari, nyeri perut	O 1/320, H >1/320	Negatif	Negatif
16/06/09	JPR 54	11	L	38,0	Panas 5 hari	O 1/320, H >1/320	Negatif	Negatif
22/06/09	JPR 55	11	P	37,5	Panas 4 hari	O 1/320	Negatif	Negatif
22/06/09	JPR 56	35	L	37,5	Panas 3 hari	O 1/320	Negatif	Negatif
23/06/09	JPR 57	35	P	38,5	Panas 1 minggu	O 1/320	Negatif	Positif
27/07/09	JPR 58	26	L	39	Demam 4 hari	O 1/160, H 1/160	Negatif	Positif
29/07/09	JPR 59	9	P	38	Demam 3 hari, lidah putih	O 1/320	Positif	Positif
27/07/09	JPR 60	49	P	37	Demam 3 hari	O 1/160	Negatif	Negatif
29/07/09	JPR 61	31	L	38	Demam 3 hari	O 1/320	Negatif	Negatif
29/07/09	JPR 62	57	P	37	Demam 3 hari	O 1/320	Negatif	Negatif
29/07/09	JPR 63	42	L	37	Demam 3 hari	O 1/80		Negatif
31/07/09	JPR 64	46	L	38	Demam 3 hari	O 1/320, H 1/160	Negatif	Negatif
3/8/2009	JPR 65	15	L	37,6	Demam 3 hari, sakit perut	O 1/80		Positif
3/8/2009	JPR 66	12	P	38	Demam 4 hari, sakit perut	O 1/160	Negatif	Positif
3/8/2009	JPR 67	8	P	38	Demam 3 hari	O 1/160, H 1/160	Negatif	Negatif

## Lampiran IX

**KOMPOSISI REAGEN YANG DIGUNAKAN DALAM TEKNIK ELISA****A. Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 WHO Protocol :**

- |                              |        |
|------------------------------|--------|
| 1. $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ | 25.6 g |
| 2. $\text{NaHPO}_4$          | 5.24 g |
| 3. $\text{NaCl}$             | 1.16 g |
| 4. $\text{H}_2\text{O}$      | 2 L    |

**B. Phosphate Buffered Salin (PBS) pH 7.4 KIT Protocol 10 X Concentrated :**

- |  |        |
|--|--------|
| 1. $\text{NaCl}$                                       | 85 g   |
| 2. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 8.55 g |
| 3. $\text{KH}_2\text{PO}_4$                            | 2.54 g |
| 4. $\text{H}_2\text{O}$ (Desilleted)                   | 1 L    |

**C. Phosphate Buffered Salin (PBS) pH 7.4 1 X :**

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| 1. PBS 10X              | 100 ml |
| 2. Aquadest (Destilled) | 900 ml |

**D. Tris Buffered Saline (TBS) pH 7.4 – 7.8 10 X :**

- |                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| 1. Timbang Trizma base              | 12.1 g  |
| 2. Timbang $\text{NaCl}$            | 87.66 g |
| 3. Larutkan dalam Aquadest          | 1 L     |
| 4. Adjust pH 7.5 (dengan HCl pekat) |         |

**E. Tris Buffered Saline (TBS) pH 7.4 – 7.8 1 X :**

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| 1. TBS 10X              | 100 ml |
| 2. Aquadest (Destilled) | 900 ml |

## Lampiran IX

**KOMPOSISI REAGEN YANG DIGUNAKAN DALAM TEKNIK ELISA****A. Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 WHO Protocol :**

1. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25.6 g
2. NaHPO <sub>4</sub>	5.24 g
3. NaCl	1.16 g
4. H <sub>2</sub> O	2 L

**B. Phosphate Buffered Salin (PBS) pH 7.4 KIT Protocol 10 X Concentrated :**

1. NaCl	85 g
2. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	8.55 g
3. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.54 g
4. H <sub>2</sub> O (Desilleted)	1 L

**C. Phosphate Buffered Salin (PBS) pH 7.4 1 X :**

1. PBS 10X	100 ml
2. Aquadest (Distilled)	900 ml

**D. Tris Buffered Saline (TBS) pH 7.4 – 7.8 10 X :**

1. Timbang Trizma base	12.1 g
2. Timbang NaCl	87.66 g
3. Larutkan dalam Aquadest	1 L
4. Adjust pH 7.5 (dengan HCl pekat)	

**E. Tris Buffered Saline (TBS) pH 7.4 – 7.8 1 X :**

1. TBS 10X	100 ml
2. Aquadest (Distilled)	900 ml

**F. 10x TMB Substrat Solution (disimpan 40°C di tempat gelap)**

1. TMB sigma T288 (KIT 978) 4 mg
2. Urea hydrogen peroxide sigma 4 mg
3. Dilarutkan dalam DMSO Sigma D5879 1 ml

**G. TMB Substrat Buffer 0.1 M Sodium Acetate Citrate Buffer (simpan di tempat gelap)**

1. Na-Acetate (CH<sub>3</sub>COONaOH<sub>2</sub>O) BDH 10236 (KIT 41) 8.20 g
2. Citric Acid. 1H<sub>2</sub>O. Sigma C7129 (KIT 11) 10 g
3. Dilarutkan dalam aquadest 1 L

**H. Working Substrat Solution (ditutup aluminium foil)**

1. TMB Substrat Solution 10X 1 ml
2. TMB Substrat Buffer 9 ml

Lampiran X.  
Perhitungan Data Statistik (Deskriptif)

hasil uji Elisa Substrat TMB konsentrasi LPS  
1/500

Descriptive Statistics

	N	Range	Mean	Std. Deviation
blanko	4	.003	.05650	.001291
kontrol negatif	4	.096	.13750	.041130
if negatif 1	4	.163	.22850	.076614
if negatif 2	4	.191	.23325	.085539
if negatif 3	4	.247	.25725	.109825
if positif 1	4	.290	.26850	.125290
if positif 1 kultur	4	.396	.32700	.173630
if positif 2	4	.436	.40700	.190181
if positif 3	4	.505	.49325	.218221
if positif 4	4	.680	.61975	.299506
if kontrol positif	4	.741	.72700	.323282
Valid N (listwise)	4			

Descriptive  
1/750

Descriptive Statistics

	N	Range	Mean	Std. Deviation
blanko	4	.003	.05650	.001291
kontrol negatif	4	.077	.12475	.033896
if negatif 1	4	.170	.20450	.075958
if negatif 2	4	.190	.21850	.084532
if negatif 3	4	.248	.24525	.109995
if positif 1	4	.268	.25900	.117754
if positif 1 kultur	4	.355	.31425	.156464
if positif 2	4	.419	.38550	.179905
if positif 3	4	.473	.45975	.203187
if positif 4	4	.689	.61030	.299213
if kontrol positif	4	.744	.71325	.325574
Valid N (listwise)	4			

## Descriptives

1/1000

Descriptive Statistics

	N	Range	Mean	Std. Deviation
blanko	4	.003	.05862	.001250
kontrol negatif	4	.076	.12125	.033659
If negatif 1	4	.154	.19550	.068648
If negatif 2	4	.173	.22958	.077780
If negatif 3	4	.263	.14150	.109826
If positif 1	4	.261	.24875	.114299
If positif 1 kultur	4	.336	.29075	.147976
If positif 2	4	.393	.38975	.170875
If positif 3	4	.385	.44025	.167866
If positif 4	4	.678	.56350	.289899
If kontrol positif	4	.754	.89025	.335735
Valid N (listwise)	4			

## Hasil uji Elisa Substrat PnPP

### Descriptives

1/500

Descriptive Statistics

	N	Range	Mean	Std. Deviation
blanko	4	.004	.06575	.002062
kontrol negatif	4	.010	.07700	.004899
If negatif 1	4	.005	.08125	.002217
If negatif 2	4	.009	.08475	.004031
If negatif 3	4	.003	.08725	.001500
If positif 1	4	.008	.08650	.003786
If positif 1 kultur	4	.015	.09050	.007047
If positif 2	4	.012	.09450	.005447
If positif 3	4	.016	.08850	.006952
If positif 4	4	.015	.09025	.006131
If kontrol positif	4	.019	.09425	.008139

## Descriptives

1/750

Descriptive Statistics

	N	Range	Mean	Std. Deviation
blanko	4	.005	.06550	.002082
kontrol negatif	4	.007	.07575	.003304
lf negatif 1	4	.021	.07900	.009557
lf negatif 2	4	.003	.08425	.001500
lf negatif 3	4	.002	.08450	.001000
lf positif 1	4	.002	.08675	.000957
lf positif 1 kultur	4	.002	.08475	.000957
lf positif 2	4	.003	.09450	.001291
lf positif 3	4	.010	.08200	.004320
lf positif 4	4	.003	.08675	.001500
lf kontrol positif	4	.007	.08825	.003202
Valid N (listwise)	4			

## Descriptives

1/1000

Descriptive Statistics

	N	Range	Mean	Std. Deviation
blanko	4	.005	.06685	.002087
kontrol negatif	4	.002	.07975	.000957
lf negatif 1	4	.007	.07550	.003109
lf negatif 2	4	.011	.08912	.005138
lf negatif 3	4	.088	.06325	.042248
lf positif 1	4	.008	.08425	.003403
lf positif 1 kultur	4	.001	.08725	.000500
lf positif 2	4	.004	.09350	.001915
lf positif 3	4	.011	.09125	.005188
lf positif 4	4	.002	.08775	.000957
lf kontrol positif	4	.003	.08675	.001258
Valid N (listwise)	4			



## Descriptives

1/750

Descriptive Statistics

	N	Range	Mean	Std. Deviation
blanko	4	.005	.06550	.002082
kontrol negatif	4	.007	.07575	.003304
If negatif 1	4	.021	.07900	.009557
If negatif 2	4	.003	.08425	.001500
If negatif 3	4	.002	.08450	.001000
If positif 1	4	.002	.08675	.000957
If positif 1 kultur	4	.002	.08475	.000957
If positif 2	4	.003	.09450	.001291
If positif 3	4	.010	.08200	.004320
If positif 4	4	.003	.08675	.001500
If kontrol positif	4	.007	.08825	.003202
Valid N (listwise)	4			

## Descriptives

1/1000

Descriptive Statistics

	N	Range	Mean	Std. Deviation
blanko	4	.005	.06685	.002087
kontrol negatif	4	.002	.07975	.000957
If negatif 1	4	.007	.07550	.003109
If negatif 2	4	.011	.08912	.005138
If negatif 3	4	.088	.06325	.042248
If positif 1	4	.008	.08425	.003403
If positif 1 kultur	4	.001	.08725	.000500
If positif 2	4	.004	.09350	.001915
If positif 3	4	.011	.09125	.005188
If positif 4	4	.002	.08775	.000957
If kontrol positif	4	.003	.08875	.001258
Valid N (listwise)	4			

## DESCRIPTIVE

Hasil uji ELISA Substrat TMB konsentrasi Ag LPS 1/500 isolat JPR

Descriptive Statistics

	N	Range	Mean	Std. Deviation
seper seratus	11	1.078	.52536	.329477
seper dua ratus	11	.761	.39000	.236827
seper empat ratus	11	.505	.26364	.154149
seper delapan ratus	11	.338	.18482	.096575
Valid N (listwise)	11			

**Descriptives**  
1/750

Descriptive Statistics

	N	Range	Mean	Std. Deviation
seper seratus	11	1.068	.50500	.328970
seper dua ratus	11	.748	.36627	.224879
seper empat ratus	11	.486	.25449	.148368
seper delapan ratus	11	.325	.17764	.099007
Valid N (listwise)	11			

**Descriptives**  
1/1000

Descriptive Statistics

	N	Range	Mean	Std. Deviation
seper seratus	11	1.063	.48182	.323970
seper dua ratus	11	.726	.35309	.213903
seper empat ratus	11	.436	.24436	.139409
seper delapan ratus	11	.311	.16887	.092464
Valid N (listwise)	11			

Hasil uji elisa substrat PnPP dengan konsentrasi Ag LPS

1/500

### Descriptives

Descriptive Statistics

	N	Range	Mean	Std. Deviation
seper seratus	11	.036	.08855	.010396
seper dua ratus	11	.037	.08645	.009964
seper empat ratus	11	.035	.08482	.008965
seper delapan ratus	11	.027	.08145	.007340
Valid N (listwise)	11			

### Descriptives

Titer 1/750

Descriptive Statistics

	N	Range	Mean	Std. Deviation
seper seratus	11	.029	.08482	.007600
seper dua ratus	11	.026	.08282	.007640
seper empat ratus	11	.032	.08218	.009207
seper delapan ratus	11	.028	.08182	.007821
Valid N (listwise)	11			

### Descriptives

1/1000

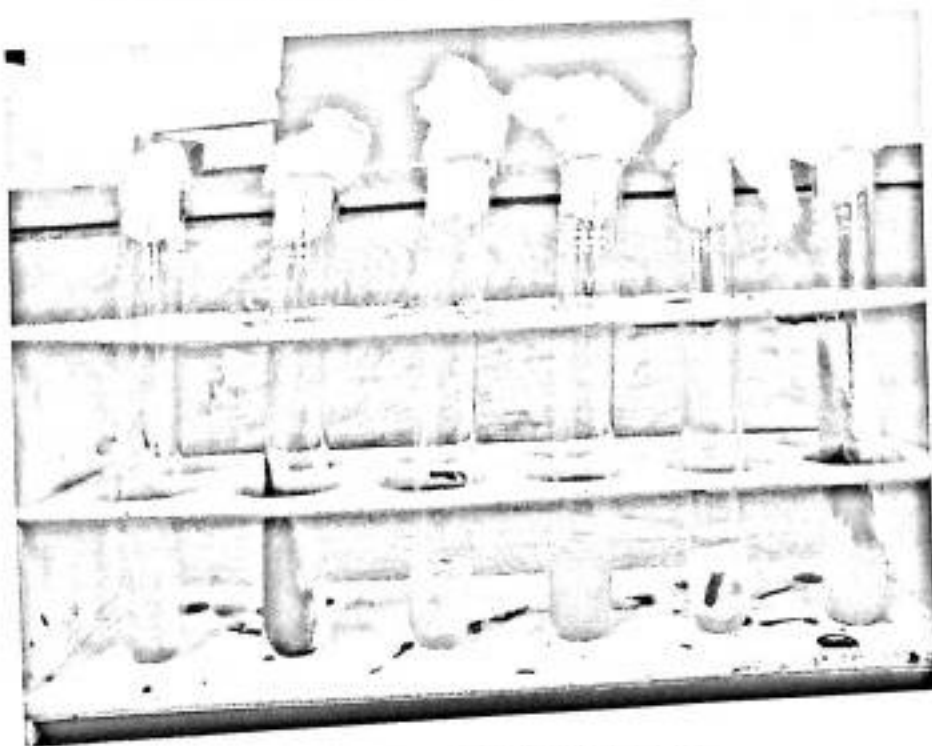
Descriptive Statistics

	N	Range	Mean	Std. Deviation
seper seratus	11	.034	.08545	.009480
seper dua ratus	11	.032	.08591	.008746
seper empat ratus	11	.027	.08409	.007609
seper delapan ratus	10	.028	.08190	.008252
Valid N (listwise)	10			

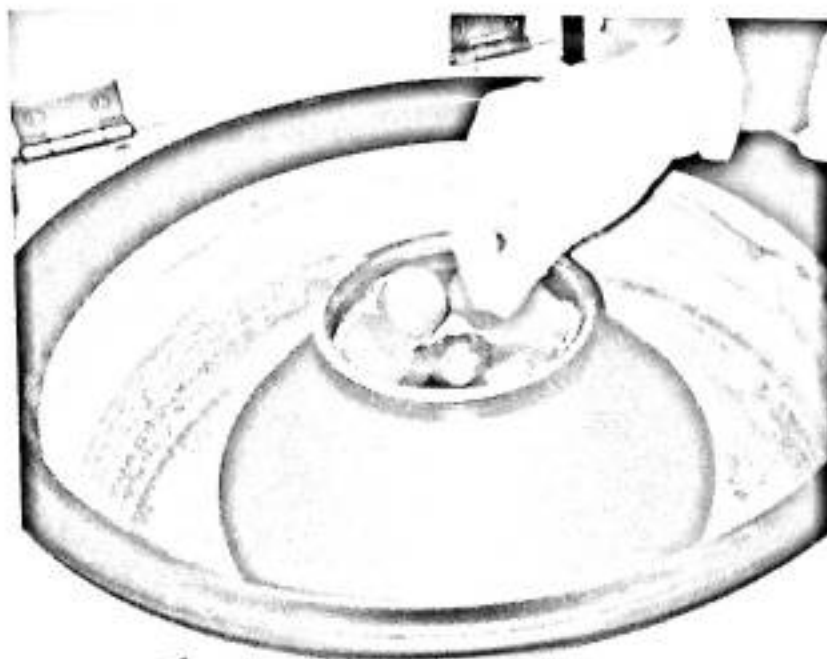
Lampiran VI.  
Foto-foto penelitian



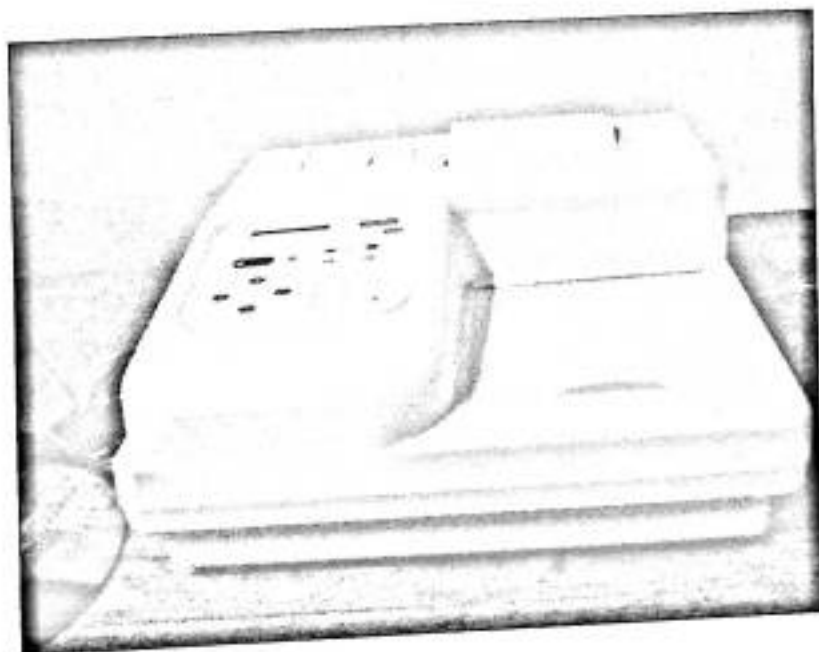
Gambar 12. Biakan *Salmonella typhi* pada medium SSA



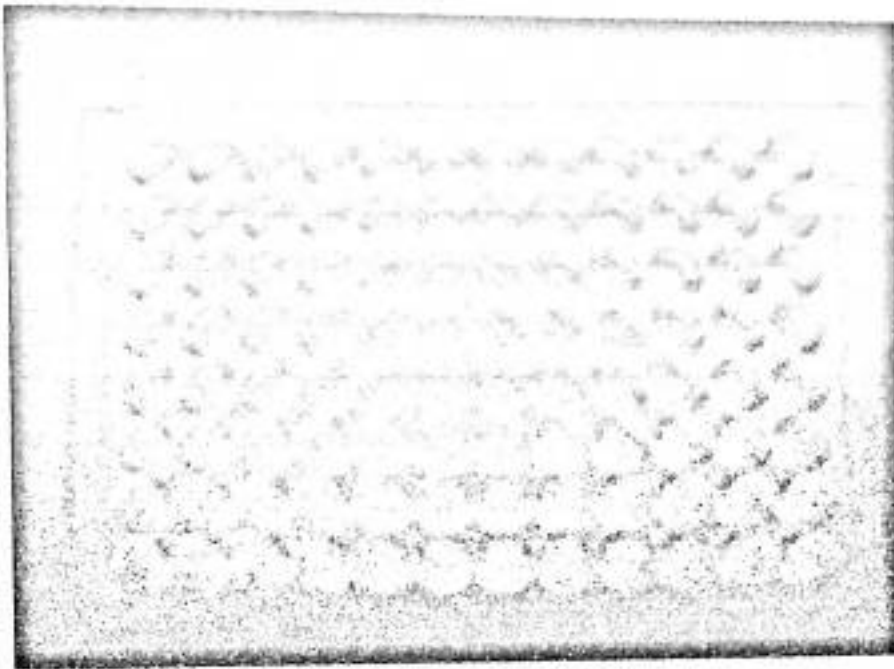
Gambar 13. Reaksi Biokimia *Salmonella typhi*



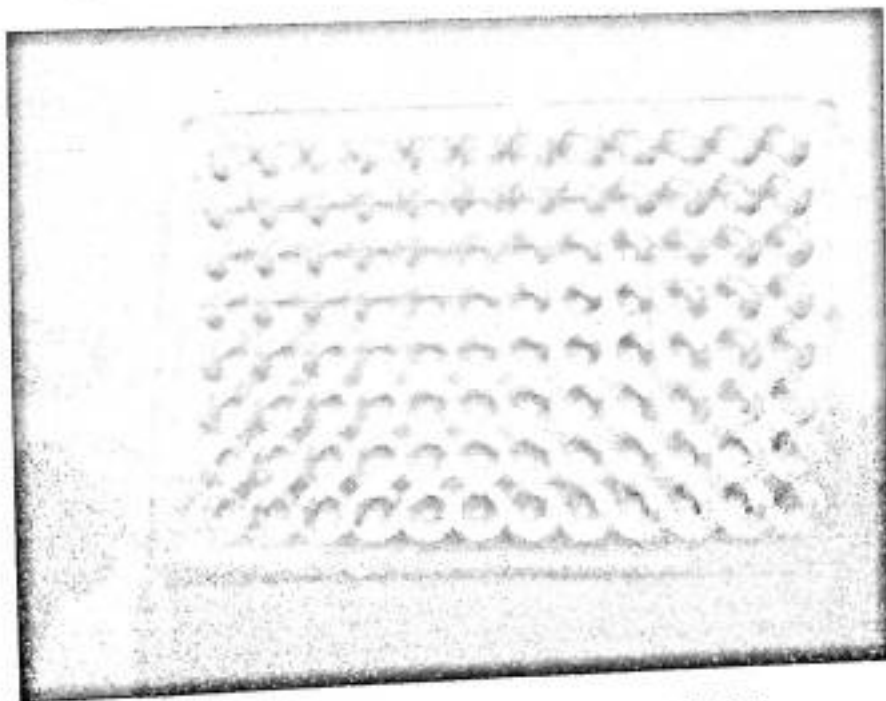
Gambar 16. Proses Sentrifugasi Antigen LPS



Gambar 17. Alat ELISA Reader



Gambar 18. Mikroplate uji ELISA substrat TMB



Gambar 19. Mikroplate ELISA substrat PnPP



### LEMBAR PERSETUJUAN PASIEN (*Informed Consent*)

1. Hari : \_\_\_\_\_
2. Tanggal : \_\_\_\_\_ Jam : \_\_\_\_\_
3. No. Pasien / Rumah sakit : \_\_\_\_\_
4. Tanggal lahir pasien : \_\_\_\_\_ umur : \_\_\_\_\_
5. Jenis kelamin : Laki-laki / Perempuan
6. Alamat : \_\_\_\_\_
7. Keadaan umum : a. normal b. sakit ringan c. sakit cukup berat d. sakit berat
8. Keluhan utama ( gejala klinis ) \_\_\_\_\_
9. Sudah berapa hari sakit ? : \_\_\_\_\_ hari
10. Suhu badan \_\_\_\_\_
11. Sebelum ini pernah berobat kemana ?  
a. tidak berobat b. dokter c. Bidan d. Puskesmas e. lainnya \_\_\_\_\_
12. Obat apa yang sudah diberikan ? \_\_\_\_\_
13. Obat anti biotik apa yang pernah diminum ? \_\_\_\_\_  
Berapa lama ? \_\_\_\_\_
14. Apakah pernah bepergian ke luar kota ? \_\_\_\_\_
15. Jika pernah, kapan dan berapa lama? \_\_\_\_\_
16. Setelah mendengar tentang penjelasan tentang maksud dan tujuan pemeriksaan, apakah / ibu / saudara / i bersedia darahnya diambil untuk keperluan yang dimaksud,?

Ya

Tidak

**Tanda tangan pasien**

\_\_\_\_\_