

DISERTASI

PENILAIAN KEGUNAAN *POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)* DALAM DIAGNOSIS DEMAM TIFOID



PRIHATINI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1996**

**PENILAIAN KEGUNAAN
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)
DALAM DIAGNOSIS DEMAM TIFOID**

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Ilmu Kedokteran pada
Program Pascasarjana Universitas Airlangga
di bawah pimpinan Rektor Universitas Airlangga

Prof. H. Bambang Rahino Setokoesoemo,dr.

Telah dipertahankan di hadapan
Rapat Terbuka Senat Universitas Airlangga
pada hari Kamis
tanggal 5 Desember 1996
pukul 10.00 WIB.

Oleh :

PRIHATINI
NIM. 98510169 D

Promotor : Prof. Dr. Kusdianto Tantular, dr.

Kopromotor I : Prof. Dr.Noor Rachman, dr.

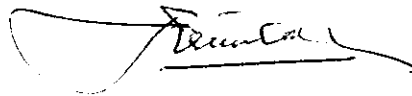
Kopromotor II : Dr . Indro Handojo, dr.,DSPK

Lembar Pengesahan
Disertasi ini telah disetujui
tanggal 30 - 1 - 1997

oleh

Promotor

Prof .DR.Koesdianto Tantular ,dr.
NIP 130 145 155




Kopromotor I



Prof.DR.Noor Rachman, dr.
NIP 130 162 010

Kopromotor II



DR.Indro Handojo,dr,DSPK
NIP. 140 030 034

Telah diuji pada ujian tertutup
Tanggal 30 Agustus 1996

PANITIA PENGUJI DISERTASI

- Ketua:** 1. Prof. Dr. Marsetio Donoseputro, dr,SpPK-K
- Anggota:** 2. Prof. Dr. Kusdianto Tantular,
3. Prof. Dr.Noor Rachman, dr.
4. Dr . Indro Handojo, dr,SpPK-K
5. Prof. Tikki Pang, PhD
6. Prof. dr. Rachmat Juwono,SpPD
7. Prof. dr. Faried Kaspan,SpPA-K

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor: 7733 / JO 3 / PP /1996
Tanggal 16 September 1996

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah yang Maha Pengasih Lagi Penyayang atas segala Rakhmat dan KaruniaNya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia c.q.Menteri Pendidikan dan Kebudayaan melalui Tim Managemen Program Doktor yang telah memberikan bantuan finansial, sehingga dapat meri-ngankan beban saya dalam menyelesaikan disertasi ini.

Selanjutnya saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Pemerintah Malaysia c.q.Institut Pengajian Tinggi Universiti Malaya (*Institute of Advanced studies University of Malaya*), Kuala Lumpur Malaysia yang telah memberikan bantuan dana, pelatihan PCR guna melengkapi pengumpulan data untuk menyelesaikan penelitian pada Program Doktor tersebut.

Dengan selesainya disertasi ini, perkenankan saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Rektor, Universitas Airlangga, Prof .dr.H.Bambang Rahino Setokoesoemo atas kebijaksanaan memberikan kesempatan dan fasilitas kepada saya untuk melanjutkan dan menyelesaikan pendidikan Program Doktor bidang Ilmu Kesehatan.

Mantan Rektor Universitas Airlangga, Prof.dr.H.Soedarso Djojonegoro yang telah memberi kesempatan saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor dan memberikan rekomendasi guna mendapatkan bantuan TMPD selama pelaksanaan pendidikan ini.

Para mantan Dekan Fakultas Pasca Sarjana selama pendidikan Program Doktor saya: Prof.drg. H.Hartono , Prof.Dr.Soetarjadi.Apt., dan Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. saat ini yang dijabat oleh Prof. Dr. H. Soedijono ,dr.,serta pengajar Fakultas Pasca Sarjana Prof. Abdul Gani, M.S, S.H dan DR. M. Zainudin, M.S, Apt.

Para mantan Dekan Fakultas Kedokteran Unair :

Prof.dr.Gde Ranuh, DSAK, Prof.dr.H.R. Soemarto, DSPD dan Dekan Fakultas Kedokteran Unair yang saat ini dijabat oleh Prof.Dr.H.Askandar Tjokroprawiro,dr, DSPD, atas pemberian izin kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor.

Selanjutnya saya sampaikan terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi tingginya kepada almarhum Prof.dr.Soeharto Setokoesoemo,yang pada awal pendidikan program S3 saya telah banyak membantu dan memberi dorongan dalam bimbingan dan saran pembuatan proposal .

Prof.Dr.Marsetio Donosepoetro,DSPK,mantan Rektor Unair, mantan Dubes Unesco, dan mantan Kepala Bagian Patologi Klinik FK Unair ,atas pemberian kesempatan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor .

Prof.Dr.FX.Budhianto Suhadi ,DSPK mantan Kepala Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Unair, dan saat ini dijabat oleh dr. S.P.Edijanto, DSPK, atas kesempatan yang diberikan pada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor.

Prof.Dr.K.Tantular ,dr.,selaku pembimbing utama yang dengan penuh perhatian dan kesabaran memberikan dorongan, bantuan bimbingan, saranan dalam pelaksanaan penyelesaian Program Doktor ini.

Prof.Dr.Noor Rachman,dr., pembantu pembimbing pertama yang dengan penuh perhatian dan kesabaran memberikan dorongan, bantuan bimbingan, saranan dalam menyelesaikan Program Doktor.

Dr.Indro Handojo, DSPK,pembantu pembimbing kedua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran memberikan dorongan, bantuan bimbingan, saranan dan membantu menghubungkan saya dengan Prof. Elka Tikki Pang,PhD, untuk memperdalam pemeriksaan PCR dalam menyelesaikan penelitian untuk Program Doktor ini.

Prof.Elka Tikki Pang, PhD, sebagai konsultan yang dengan penuh perhatian dan kesabaran memberikan dorongan, bimbingan pelatihan untuk memperdalam pengetahuan tentang PCR, pemberian saran dan kemudahan menerima bantuan dalam fasilitas serta dana dari Pemerintah Kerajaan Malaysia untuk menyelesaikan Program Doktor.

Prof. Hoepoediono Soewondo, MPH, almarhum, yang pernah memberikan bantuan dan saranan dalam menyelesaikan proposal Program Doktor.

dr.IB Djelantik DSPK, almarhum, yang pernah memberikan bantuan dan saranan dalam menyelesaikan proposal Program Doktor.

Prof. dr.R.Juwono DSPD, mantan Staf Bagian Penyakit Dalam FKUA dan Prof.dr.Edy Soewandojo Soewondo,DSPD ,Pembantu Dekan I FKUA yang pernah memberikan bantuan pengumpulan data dan saranan dalam menyelesaikan Program Doktor .

Kepala seksi Mikrobiologi Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Unair, atas kesempatan yang diberikan pada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor.

Kepala Program Studi Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Klinik ,Kepala seksi Hematologi ,Kepala seksi Kimia Klinik, Kepala seksi Imunologi, pada Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Unair, yang secara langsung maupun tidak langsung ikut memberikan bantuan saran dalam menyelesaikan Program Doktor.

Semua staf ,PPDS dan karyawan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Unair, yang secara langsung maupun tidak langsung ikut memberikan bantuan , saran dalam menyelesaikan Program Doktor.

Staf laboratorium Perubatan dan Sains IPT University of Malaya , Kuala Lumpur, Malaysia; Kuan Lin Tong, PhD, Geetha Subraniam PhD, PhD Student's: Brindha dan Tang., yang banyak berperan-serta dalam mengajari, dan membantu saya baik selama pelatihan PCR di IPT, University Of Malaya maupun setelah kembali di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Unair, juga segenap karyawan lainnya di IPT Laboratorium Perubatan dan Sains University of Malaya yang telah ikut membantu saya selama pelatihan PCR.

Kepada mantan Kepala Tropical Disease Reasearch (TDRC) Unair Prof.Gde Ranuh ,DSAK, yang sekarang dijabat Prof.Dr.Yoes Prijatna Dachlan , dr. MSc., Dr. Edy Bagus MS, DSMK ,dr.Daniel Housea; dr.Harijanto Notopoero MS, beserta Staf dan Karyawan TDRC lainnya yang telah membantu saya dalam menyelesaikan pemeriksaan PCR dilaboratorium TDRC.

dr.Siswanto Darmadi,DSPK , staf laboratorium Patologi Klinik yang telah membantu saya dalam peminjaman mesin pemeriksaan PCR di laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Unair.

Dr.Koentoro ,dr,MPH Kepala Pusat Penelitian Kependudukan dan Pembangunan Unair, yang membantu saya dalam penyelesaian analisis statistiknya.

Dr.Marie Pangestu,SE, dan Yayasan Panglaykiem yang telah berperan dalam membantu dana untuk penyelesaian penelitian Program Doktor.

dr.Maria Magdalena Padmidewi, DSPK, yang secara langsung maupun tidak langsung ikut memberikan bantuan dalam menyelesaikan Program Doktor.

Juga saya sampaikan rasa terima kasih saya kepada:

Dr.Krisnowati Djojosoedarsono, drg., Staf dosen Fakultas Kedokteran Gigi Unair yang berperan dalam menangani penulisan dan penyuntingan disertasi ini.

drg.Adi Subijanto,MS, Staf dosen Fakultas Kedokteran Gigi Unair yang berperan dalam membantu menangani penulisan komputer disertasi ini.

drg.Ny.Suzana B. Hadiwidjaja,MS., dosen Fakultas Kedokteran Gigi Unair yang berperan dalam membantu hubungan internet.

Bu Siska Misbach, karyawan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Unair, meluangkan waktu dalam membantu saya dibidang tehnik dan lain-lain kegiatan dalam menyelesaikan Program Doktor ini.

Segenap panitia promosi dari laboratorium Patologi Klinik FKUA dan Program studi Pasca Sarjana Unair.

Dan akhirnya saya sampaikan rasa terima kasih saya kepada:

Ayah dan Ibu Djojosoedarsono almarhum yang telah mendidik saya dan memberi kesempatan kepada saya untuk melanjutkan kuliah ke FK Unair sampai mencapai gelar Sarjana Kedokteran, tetapi pada kesempatan yang berbahagia ini tidak dapat menyaksikan saya menempuh ujian akhir Program Doktor.

Saudara-saudara sekandung saya maupun kerabat lainnya yang secara langsung maupun tidak langsung ikut mendukung secara moril dan material dalam menyelesaikan Program Doktor ini.

Segenap handai taulan yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang secara langsung maupun tidak langsung juga ikut memberikan bantuan moril dalam menyelesaikan Program Doktor

Segenap Guru Guru saya yang telah mendidik saya sejak sekolah dasar sampai Fakultas Kedokteran Unair yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, dan atas jasa-jasa beliauah maka saya dapat mencapai tingkat jenjang pendidikan sekarang ini.

ABSTRACT

Key words : Diagnosis evaluation, PCR test, Typhoid fever.

An investigation was carried out on Polymerase Chain Reaction (PCR) a laboratory diagnostic tool based on biomolecular reaction, which supposed could overcome the difficulties in the detection of microbial etiology that cause an infectious disease in an endemic area. The back ground of the study was that the laboratory test routinely used in the government and private hospitals or others often facing difficulties in the detection of the cause which support the diagnosis. Which concluded whether the cause was from *S. typhi* origin or not. In serological test the result also did not support the diagnosis of the disease when it happened in an endemic area like Indonesia.

Nowadays, there are many factors that influenced the validity of the conventional laboratorical test, so that the results come to doubt and the treatment will be misconducted. In addition, the routine laboratorical test may also take several days before arrived to a conclusion and some times the test has to be repeated because of those contaminant factors mentioned above. That was why an effort was carried out by a study in the clinical laboratory test with a biomolecular design approach.

The objective of this study was to obtain information about PCR test particularly the evaluation of its usage, whether this test as a supporting diagnostic tool in the diagnosis of typhoid fever has the same level or different with the routinely used Widal serological test. The later test, up to now is still in use as a supporting diagnostic tool for the confirmation of the fever to endemic as well as non endemic population. Solely the PCR test has a high accuracy and precision and has a particular advantage in comparison with other laboratorical tests that routinely used by the hospital laboratory, to trace the *S. typhi* DNA.

Statements of the problem of this study consist of the following questions:

Could PCR test result increase the sensitivity as well as the specificity in the detection of *S. typhi* compared to culture test from blood sample taken in an endemic area?

Is PCR test result in diagnosing typhoid fever more sensitive and specific compared to Widal serological test?

This investigation has been carried out by using two kinds of polulations:

Firstly, those patients clinically suspected as suffering typhoid fever. Secondly those patients clinically as well as laboratorically suspected suffering non typhoid fever; whose criterion and condition defined at any age: from babies till adults. The blood 254 samples were examined at Dr. Soetomo Hospital Surabaya and at Institute of Higher Education University of Malaya Kualalumpur Malaysia. The findings were summarized after statitiscally analyzed by McNemar and Yates correction ($p = 0.05$). From this study can be concluded that both laboratory tests had a significant difference ($p < 0.001$) as well as for the efficiency of the diagnosis, the positive or negative prognosis's evaluation approaching 100%. That means the PCR test may used as a supporting tool for the confirmation of the diagnosis. From this study so far, can be concluded that the aim of the investigation to get the information for a guidance in the clinical laboratory test succeeded. The results showed:

1. PCR test is useful in the detection of typhoid fever and may use as a gold standard,
2. PCR test is useful to solve the problem in the difficulty of the confirmation of cases.

RINGKASAN

Disertasi yang berjudul *PENILAIAN KEGUNAAN POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) DALAM DIAGNOSIS DEMAM TIFOID* , dibuat berdasarkan penelitian tentang uji PCR untuk menilai kegunaannya sebagai penunjang pada penentuan / pemastian diagnosis demam tifoid.

Latar belakang masalah mengapa dilakukan penelitian ini ialah sehubungan untuk memastikan diagnosis demam tifoid dengan cara mengisolasi *S. typhi*, yang hasilnya rendah. Demikian pula uji serologi hasilnya kurang mendukung diagnosis penyakit tersebut bila dilakukan di daerah endemik seperti di Indonesia.

Saat ini banyak faktor yang mempengaruhi kesahihan pemeriksaan laboratorium rutin (konvensional), sehingga hasil pemeriksaan menjadi meragukan dan pengobatannya juga menjadi kurang tepat. Ditambah lagi proses pemeriksaan laboratorik tersebut memakan waktu yang lama dan kadang harus diulang-ulang karena faktor- faktor yang telah disebutkan tadi. Oleh karena itu dicoba dilakukan uji laboratoris dengan pendekatan biomolekuler.

Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan informasi mengenai uji PCR untuk diagnosis penyakit pada penderita dengan dugaan demam tifoid apakah setara atau berbeda dengan uji serologis Widal. Pemeriksaan yang disebut terakhir sampai saat ini masih merupakan sarana untuk membantu menentukan demam tifoid bagi populasi endemik maupun nonendemik. Secara sendiri uji PCR mempunyai ketelitian dan ketepatan yang tinggi dan mempunyai kelebihan khusus bila dibandingkan dengan uji laboratorik lainnya yang rutin dipakai di laboratorium

rumah sakit yaitu melacak DNA *S.typhi* melalui PCR

Rumusan permasalahan pemeriksaan laboratoris penunjang diagnosis demam tifoid yang diajukan adalah:

1. Apakah teknik PCR mempunyai nilai diagnostik yang lebih andal untuk menunjang diagnosis demam tifoid dibandingkan dengan uji serologis Widal?
2. Apakah uji PCR lebih peka dan khas bila dibandingkan dengan uji serologis Widal?

Informasi mengenai PCR ini perlu untuk mengetahui adakah peningkatan kepekaan dan kekhasan deteksi *S.typhi* dengan cara tersebut bila dibandingkan cara perbenihan dari sampel darah yang berasal dari daerah endemis Surabaya.

Metodologi penelitian ini merupakan kajian pengamatan laboratorik berdasarkan acuan rancangan penelitian laboratorik biomolekuler. Populasi yang diambil penderita terbagi menjadi dua kelompok populasi yang ke (I) terdiri dari mereka yang mengidap demam tifoid lengkap dengan tanda dan gejala klinis; yang ke (II) terdiri dari mereka yang diduga mengidap bukan demam tifoid menurut pemeriksaan klinis dan laboratoris. Populasi dari semua umur, jenis kelamin, baik anak maupun dewasa. Sampel yang diperiksa adalah darah yang diambil dari masing-masing populasi. Kelompok sampel I (positif dan negatif perbenihan)= 214, sampel II = 40 penderita Jumlah seluruhnya yang diperiksa dalam penelitian ini sebanyak 254 Pemeriksaan perbenihan darah (empedu) dan uji Widal dilakukan di Laboratorium RSUD Dr. Soetomo Surabaya dan penentuan PCR di Institut Pengajian Tinggi University of Malaya ,Kualalumpur Malaysia.

Analisis statistik yang dipakai untuk menguji hipotesis adalah uji statistik

McNemar dan *Yate corection* pada taraf kemaknaan $p = 0,05$

Hasil penelitian menunjukkan bahwa uji PCR dan uji serologis Widal bila diperbandingkan mempunyai perbedaan bermakna ($p < 0.001$), nilai ramal positif dan negatif mendekati 100%, demikian pula efisiensi diagnosis mendekati nilai 100%, sehingga PCR dapat digunakan sebagai penentu diagnosis pasti demam tifoid .

Dengan demikian dapat ditarik kesimpulan bahwa tujuan penelitian untuk mendapatkan informasi panduan pemeriksaan diagnostik laboratoris klinik, yaitu dengan ada / tidak perbedaan yang bermakna sebagai berikut:

- 1 . PCR berguna dalam penentuan demam tifoid sebagai standar emas.
2. PCR berguna dalam memecahkan kasus bermasalah.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xvi
DAFTAR TABEL	xx
DAFTAR GAMBAR	xxi
DAFTAR LAMPIRAN	xxiii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang masalah	1
1.1.1 Permasalahan demam tifoid secara umum ditinjau dari sudut pandang kesehatan masyarakat di Indonesia.....	1
1.1.2 Prevalensi atau angka kesakitan dan angka kematian tertinggi di Indonesia	1
1.1.3 Kecenderungan peningkatan daya tahan (resistensi) terhadap antibiotika	2
1.1.4 Masalah diagnosis demam tifoid	3
1.2 Rumusan masalah	10
1.3 Tujuan Penelitian	10
1.3.1 Tujuan umum	11
1.3.2 Tujuan khusus	11
1.4 Manfaat Penelitian	12
2. TINJAUAN PUSTAKA	13
2.1 Pengertian demam tifoid ditinjau dari masalah kesehatan	13
2.2 Epidemiologi demam tifoid	14
2.3 Gejala klinis demam tifoid	18
2.4 Patogenesis demam tifoid	19
2.4.1 Masuknya kuman (bakteri).....	19
2.4.2 Antigen <i>S. typhi</i>	20
2.4.3 Virulensi <i>S. typhi</i>	25

2.5 Masalah pembawa penyakit (<i>carrier</i>).....	30
2.6 Masalah kerentanan (resistensi) antibiotika	30
2.7 Masalah pencegahan demam tifoid	31
2.8 Masalah penetapan diagnosis	31
2.8.1 Masalah penetapan diagnosis klinik	31
2.8.2 Masalah penetapan / penentuan diagnosis laboratorik.....	32
2.9 Asas pemeriksaan PCR.....	48
2.9.1 Faktor yang mempengaruhi reaksi PCR	49
2.9.2 Awal denaturasi	50
2.9.3 Primer Oligonukleotida	52
2.9.4 Keunggulan teknik dan keuntungan PCR	53
2.9.5 PCR dalam diagnosis penyakit menular dan manfaat umumnya...54	
2.9.6 PCR dalam diagnosis salmonellosis.....	55
2.9.7 Gen sasaran untuk PCR dalam diagnosis demam tifoid	58
2.9.8 Masalah keterbatasan PCR dan pemercahannya	63
3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	66
3.1 Kerangka konseptual penelitian	66
3.1.1 Pengertian dan teori diagnosis demam tifoid	67
3.1.2 Kerangka teori diagnosis demam tifoid.....	73
3.2 Hipotesis	76
4. METODE PENELITIAN	78
4.1 Rancangan dan jenis penelitian yang digunakan	78
4.2 Bahan Penelitian.....	79
4.2.1 Populasi penelitian	79
4.2.2 Sampel penelitian dan kontrol	79
4.2.3 Besar sampel	80
4.3 Klasifikasi variabel dan definisi variabel operasional penelitian.....	81
4.3.1 Klasifikasi variabel	81
4.3.2 Definisi variabel operasional pada penelitian	81
4.4 Bahan atau materi penelitian	81
4.5 Alat , instrumen penelitian dan sarana yang terkait	82

4.5.1 Untuk persiapan sampel	82
4.5.2 Untuk pengambilan sampel	82
4.5.3 Konfirmasi hasil uji PCR	84
4.5.3.1 Pemeriksaan Hybridisasi	84
4.5.3.2 Pemeriksaan penentuan urutan DNA <i>S.typhi</i> hasil uji PCR	86
4.5.3.3 Pemeriksaan penentuan pemilihan primer	86
4.6 Tempat dan waktu penelitian	87
4.6.1 Tempat penelitian	87
4.6.2 Waktu penelitian	87
4.7 Prosedur pengambilan atau pengumpulan data	87
4.7.1 Cara pemeriksaan untuk perbenihan darah	87
4.7.2 Pemeriksaan Widal (cara tabung)	89
4.7.3 Cara pelaksanaan pemeriksaan PCR	90
4.8 Cara atau tehnik analisa data	105
4.8.1 Persiapan	105
4.8.2 Pengumpulan data	105
4.8.3 Penggolongan data variabel	106
4.8.4 Perhitungan statistik	106
5. HASIL PENELITIAN	108
5.1 Hasil penemuan pada pemeriksaan penentuan pemilihan primer (rekayasa primer)	108
5.2 Hasil penemuan pada pengujian primer dengan genom DNA	108
5.3 Hasil pemeriksaan PCR pada gel elektroforese	109
5.4 Optimisasi dan kepekaan teknik PCR dengan primer <i>rfbs</i>	117
5.5 Penggunaan PCR dalam pengujian spesimen penderita	120
5.6 Penarikan kesimpulan analisis statistik	122
6. PEMBAHASAN	123
6.1 Pembahasan hasil penelitian ditinjau dari segi teori dan empirik	125
6.1.1 perbandingan dengan metode lain	125
6.2 Merumuskan teori yang dihasilkan dari penelitian	126

6.2.1	Sanggahan terhadap cara pemeriksaan konvensional	126
6.2.2	Rumusan teori PCR untuk diagnosis demam tifoid	128
6.3	Temuan dari hasil penelitian sebelumnya serta bagaimana kaitannya dengan penelitian ini	130
6.3.1	Penilaian kesahihan (validitas)	130
6.3.2	Perbandingan antara PCR dengan <i>Omp 3&4</i> , <i>sifA</i> , <i>rfbs</i>	133
6.3.3	Temuan pada penelitian teknik PCR untuk diagnosis demam tifoid	133
6.3.4	Penggunaan PCR dalam uji serum penderita dan dalam uji saring ..	134
6.4	Kepraktisan uji PCR untuk demam tifoid	137
6.5	Keterbatasan penelitian yang dilakukan dan saran bagi penelitian selanjutnya	139
6.5.1	Keterbatasan penelitian yang dijumpai	139
6.5.2	Saran bagi penelitian dan penerapan teknik PCR selanjutnya	142
7	KESIMPULAN DAN SARAN	145
7.1	Kesimpulan	145
7.1.1	Jawaban terhadap rumusan masalah penelitian	145
7.1.2	Penjelasan dalam lingkup tujuan penelitian	146
7.2	Saran.....	147
	DAFTAR PUSTAKA	149
	LAMPIRAN - LAMPIRAN	158

DAFTAR TABEL

	HALAMAN
Tabel 2.1 Diagnosis demam tifoid melalui penentuan antigen.....	43
Tabel 2.2 Daftar gen <i>Salmonella</i> untuk PCR.....	59
Tabel 4.1 Ukuran produk amplifikasi hasil PCR dengan macam primer.....	87
Tabel 4.2 Reaksi <i>S.typhi</i> , <i>S.paratyphi A</i> , <i>S.paratyphi B</i> , <i>E.coli</i> pada media TSI,LIM dan Simon citrat	88
Tabel 5.1 Hasil pemilihan dari beberapa primer terhadap genom DNA <i>Salmonella spp.</i> dan enteropatogen lain.....	108
Tabel 5.2 Hasil pemeriksaan PCR dari genom DNA <i>S. typhi</i> dan <i>Salmonella spp</i> (Laboratorium Institut Pengajian Tinggi University of Malaya)	115
Tabel 5.3 Daftar penderita pemeriksaan malaria dengan uji Widal dan PCR.....	116
Tabel 5.4 Hasil pemeriksaan <i>S.paratyphi A</i> dan malaria dengan uji PCR dan uji Widal	121
Tabel 5.5 Perbandingan Uji PCR dan Uji Widal	121

DAFTAR GAMBAR

HALAMAN

Gambar 2.1	Bagan PCR (<i>polymerase chain reaction</i>)	48
Gambar 4.1	Bagan tata kerja tahapan penelitian	78
Gambar 4.2	Bagan cara labeling probe dengan Amersham's rediprime DNA.....	101
Gambar 5.1	Elektroforegram genom DNA (hasil ekstraksi) <i>Salmonella spp</i> dan patogen enterik lain.....	109
Gambar 5.2	Hasil amplifikasi genom DNA <i>Salmonella spp</i> dan patogen enterik lain pada gel dengan primer <i>sifA</i>	109
Gambar 5.3	Hasil amplifikasi genom DNA <i>Salmonella spp</i> dengan primer <i>Omp 1/2</i> dan <i>Omp 3/4</i>	110
Gambar 5.4	Hasil amplifikasi genom DNA <i>Salmonella spp</i> dengan primer <i>Oph1/2</i>	111
Gambar 5.5	Hasil amplifikasi genom DNA <i>Salmonella spp</i> dengan primer <i>Oev 1/2</i> dan <i>Oev 3/4</i>	111
Gambar 5.6	Hasil amplifikasi genom DNA <i>Salmonella spp</i> dengan primer <i>Os 1/2</i> dan <i>Os 3/4</i>	112
Gambar 5.7	Hasil amplifikasi genom DNA <i>Salmonella spp</i> dengan primer primer <i>rfbs 128/165</i> dan <i>rfbs</i> <i>129/130</i>	112
Gambar 5.8	Elektroforegram hasil amplifikasi primer <i>rfbs</i> dengan perbedaan suhu aniling	113
Gambar 5.9	Elektroforegram hasil amplifikasi primer <i>rfbs</i> maupun <i>Omp 3/4</i> dengan pengenceran $MgCl_2$...	113
Gambar 5.10	Elektroforegram Optimisasi PCR berbagai konsentrasi DNA <i>S.typhi</i> dengan primer <i>Omp 3/4</i> ..	114

DAFTAR GAMBAR

	HALAMAN
Gambar 5.11 Hasil hibridisasi pelabelan produk PCR (amplikon) dengan <i>Amersham's Rediprime</i> DNA	114
Gambar 5.12 Hasil penemuan urutan DNA dari hasil amplifikasi primer <i>Omp 3/4</i> pada <i>polyacrylamide gel</i>	115
Gambar 5.13 Elektroforegram hasil uji PCR pada penderita yang diduga demam tifoid dari serum dengan primer <i>rfbs 129/130</i> dan primer <i>Omp 3/4</i>	116
Gambar 5.14 Hasil amplifikasi <i>S.typhi</i> dari berbagai daerah (negara)	117
Gambar 5.15 Hasil PCR dengan primer <i>Omp 3/4</i> pada penderita diduga demam tifoid	118
Gambar 5.16 Hasil amplifikasi <i>S.typhi</i> dengan primer 304 dan primer <i>rfbs 129/130</i>	119

DAFTAR LAMPIRAN

	HALAMAN
Lampiran 1 Daftar urutan Nukleotida dari gen <i>Omp C S. typhi</i> (<i>Nucleotide sequence of S. typhi OmpC gene</i>)	158
Lampiran 2 Daftar urutan Nukleotida dari gen <i>Omp S1 S. typhi</i> (<i>Nucleotide sequence of S. typhi OmpS1 gene</i>)	159
Lampiran 3 Daftar urutan Nukleotida dari gen <i>pho E S. typhi</i> (<i>Nucleotide sequence of S. typhi phoE gene</i>)	160
Lampiran 4 Daftar urutan Nukleotida dari gen <i>OmpR S. typhi</i> (<i>Nucleotide sequence of S. typhi OmpR gene</i>)	161
Lampiran 5 Daftar urutan gen <i>SifA S. typhi</i> (<i>Sequence of S. typhi SifA gene</i>)	163
Lampiran 6 Data pemeriksaan perbenihan uji Widal dan PCR pada penderitanya yang diduga demam tifoid	167
Lampiran 7 Surat Pernyataan	172

BAB 1

Bab 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

1.1.1 Permasalahan demam tifoid secara umum ditinjau dari sudut pandang kesehatan masyarakat di Indonesia .

Demam tifoid merupakan penyakit infeksi yang angka kesakitannya masih tinggi di Indonesia, sebab penyakit ini berlangsung terus selama rantai penularan tidak terputus. Demam tifoid menyerang anak maupun orang dewasa, terutama yang berusia antara 3 - 20 tahun. Penularan penyakit ini sangat mudah, yaitu ditularkan melalui makanan dan minuman yang kurang memenuhi persyaratan kesehatan dan tercemar kuman *S.typhi*. Apabila *S typhi* dimungkinkan dapat hidup dan berkembang biak dalam usus ia dapat menyebabkan perforasi usus, perdarahan usus, meningitis dan sebagainya. Hal tersebut menimbulkan kerugian pada penderita karena ia harus tirah baring lama, berarti ia kehilangan jam kerja atau jam belajar (minimal 2-3 minggu) yang cukup lama. Di beberapa daerah yang belum pernah terjangkit demam tifoid , penyakit ini dapat timbul akibat perpindahan penduduk maupun perhubungan antar pulau yang semakin lancar. Pemutusan rantai penularan dapat dilakukan dengan membuat diagnosis yang tepat sehingga pengobatannya sesuai. Untuk sarana diagnosis yang tepat diperlukan cara pemeriksaan yang andal, praktis dan murah biayanya.

1.1.2 Prevalensi atau angka kesakitan dan angka kematian di Indonesia

Demam tifoid adalah penyakit infeksi tropik yang disebabkan oleh bakteri *S.typhi* yang diperkirakan angka kesakitannya masih cukup tinggi di Indonesia dan negara-negara dunia ketiga lainnya. Menurut laporan Direktorat Jendral

Pemberantasan Pencegahan Penyakit Menular (Ditjen P2M) Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI), selama 6 tahun (1981-1986) terjadi adanya peningkatan jumlah penderita demam tifoid sebanyak 35,8 % (dari 19 596 menjadi 26 606). Menurut Sudarmono (1992), insiden penyakit ini berkisar sekitar 350 - 900 kasus per 100 000 populasi per tahun (dikutip dari Sudarmono, 1992).

Angka kesakitan demam tifoid tidak dipengaruhi musim, baik pada musim panas maupun musim hujan penyakit ini tetap ada. Selain itu tergantung kepada sanitasi lingkungan maupun higiene pribadi. Besarnya prevalensi demam tifoid akan menentukan besarnya jumlah kematian.

Menurut laporan Ditjen P₂ M Depkes RI (dikutip dari Soewondo, 1992), infeksi tifoid masih menduduki tempat teratas diantara penyakit menular jenis lainnya. Walaupun demikian pelaporan yang digunakan Depkes RI sampai saat ini masih berdasarkan pelaporan angka kesakitan dan gejala klinis saja, bukan berdasarkan hasil pemeriksaan laboratorium yang pasti. Apabila rumah sakit sudah mempunyai sarana laboratorium klinik yang lengkap, maka diharapkan dapat dilaporkan hasil tersebut secara lebih pasti, sehingga angka kesakitan yang sesungguhnya dapat diketahui.

Menurut data yang ada saat ini (Sudarmono 1992; Ivanoff, 1994), angka kematian karena demam tifoid di Indonesia dibandingkan dengan yang ada di negara maju masih termasuk cukup tinggi.

1.1.3 Kecenderungan peningkatan daya tahan (resistensi) mikro-organisme terhadap antibiotika.

Beredarnya berbagai macam antibiotika serta mudahnya cara mendapatkannya, memudahkan pula penderita meminum obat secara tidak tepat dan

cukup. Hal ini menjadi salah satu penyebab kerentanan mikro-organisme terhadap beberapa macam antibiotika berkurang, sehingga mikro-organisme tersebut masih tetap dapat berkembang biak walaupun penderita telah diberi antibiotika. Dengan demikian pemutusan rantai penularan penyakit dapat menjadi terhambat (Rao et al. 1981; Eykyn, 1987; Supardi, 1992).

1.1. 4 Masalah diagnosis demam tifoid

1.1.4.1 Masalah diagnosis klinis

Diagnosis demam tifoid ditentukan dari hasil pemeriksaan klinis dan laboratoris (Keusch, 1994). Gejala klinis ditandai dengan demam berkelanjutan (lebih dari tujuh hari), dengan gejala khas: nyeri perut, terdapat bercak merah (*rose spot*) di kulit, pembesaran limpa (*splenomegaly*) dan hati (*hepatomegaly*). Kadang-kadang demam ini sukar dibedakan dengan demam yang disebabkan oleh penyakit lain seperti demam berdarah, atau demam malaria. Macam demam tersebut hanya dapat dipastikan dari hasil pemeriksaan laboratorium saja.

Pada minggu pertama, demam yang terjadi pada demam tifoid biasanya intermiten (berjeda), kemudian remiten (turun-naik). Penderita tanpa komplikasi suhunya akan menjadi normal, tetapi bila terjadi komplikasi mendadak suhunya meningkat. Gejala klinis saja sukar digunakan sebagai pedoman diagnosis tunggal demam tifoid.

1.1. 4. 2 Masalah diagnosis laboratoris

1. Pemeriksaan perbenihan / tidak langsung

- a) Perbenihan darah (Ewing, 1982, Finegold et al. 1982; Escamilla, 1984, Vallenias, 1985, Koneman et al, 1988, Baron et al. 1994).

Hasil pemeriksaan laboratorik dengan cara perbenihan memberikan diagnosis yang memastikan dan memberi hasil positif saat minggu pertama dan pada saat bakteremia. Berbagai kelemahan yang menyebabkan kurang berhasilnya isolasi kuman disebabkan karena dikerjakan isolasi *S. typhi* dari darah (Barua,1983; Edelman & Levin, 1986; Calva et al., 1988; Soewondo,1991; Boekitwetan et al.1992; Rubin et al.1992; Hadisapoetro,1992) dengan keadaan:

- i) penderita sudah minum antibiotika atau kemoterapeutika; menurut Hornick (1985) apabila penderita sudah pernah minum antibiotika, cara pengambilan sampel darah adalah kurang tepat, karena menyebabkan hasil perbenihan rendah sekitar 40%.
- ii) pengambilan darah bukan pada saat bakteremia;
- iii) jumlah kuman dalam darah per milimeter relatif rendah; sehingga tidak dapat tumbuh dalam media pembiakan ,
- iv) faktor-faktor lain dalam darah yang dapat mengurangi pertumbuhan *S. typhi* yang beredar, seperti sifat fagositosis sel darah putih, dan
- v) perbenihan darah memerlukan media khusus dengan kemungkinan ada faktor -faktor penghambat di dalam bahan media yang belum diketahui.

Cara diagnostik melalui perbenihan darah memerlukan waktu minimal 3 sampai 5 hari, sebab jumlah *S. typhi* secara *in vivo* sangat rendah dalam

peredaran darah. Ditafsirkan hanya 5 - 15 mikro-organisme per ml darah dan sebagian berada di dalam sel fagosit (intraseluler).

- b) Perbenihan sumsum tulang (Finegold et al.1992; Barua, 1983; Vallenias et al., 1985; Koneman et al.,1988; Baron et al.,1994).

Hasil perbenihan sumsum tulang memberi kepekaan hampir 100%, sebab *S. typhi* di dalam sumsum tulang sukar dijangkau antibiotika atau kemoterapeutika. Selain itu kemungkinan sel makrofag masih belum sempurna dan berfungsi baik. Kelemahan cara pemeriksaan ini adalah pengambilan sampel yang invasif, sehingga kurang menyenangkan bagi penderita.

- c) Perbenihan tinja atau air seni (urin) (Gilman, et al.1975; Ewing,1982; Finegold,1982; Barua,1983; Vallenias et al., 1985; Koneman et al.,1988; Baron et al.,1994).

Perbenihan dilakukan pada awal minggu ketiga dan minggu selanjutnya. Kelemahan dari hasil perbenihan ini adalah walau ada pertumbuhan *S.typhi* belum berarti bahwa penderita dalam keadaan sakit. Karena hal semacam ini terjadi pula pada penderita pada fase penyembuhan dan pada pembawa penyakit (*carrier*). Perbenihan tinja dan air seni (urin) biasanya memberikan hasil positif bila dikerjakan pada minggu ke tiga atau ke empat waktu sakit.

2. **Pemeriksaan Langsung/ Pemeriksaan serologi** (Ewing,1982 ; Koneman et al.,1988; Baron et. al.,1994; Pang ,1995).

Penentuan antibodi terhadap *S. typhi* mempunyai banyak kelemahan antara lain:

- a) adanya reaksi silang, sehingga menyebabkan derajat kekhasannya rendah, apalagi kalau penderita berasal dari daerah endemis,

- b) antigen yang dibuat untuk menentukan antibodi , tidak khas terhadap *S. typhi*, misalnya antigen somatik (O) dan flagela (H) dari *S.paratyphi A,B* yang terdapat pada beberapa *Salmonella spp.* lain atau bakteri enteropatogenik lain,
- c) sistem kekebalan seluler maupun humoral terganggu menyebabkan produk antibodi amat berkurang, sehingga sukar digunakan sebagai patokan diagnosis bagi penderita demam tifoid yang juga mengalami imunodefisiensi seperti AIDS, DM dll.
- d) pengaruh imunisasi dengan vaksin tifoid

2.1 Pemeriksaan Widal (Lingga & Sutedia, 1964; Schroeder, 1968; Joewono,1980; Moechtar & Soetomo,1981; Pang & Puthucheary,1983; Prihatini,1989).

Uji Widal mempunyai kelemahan sebagai berikut:

- a) sukar untuk membedakan penderita di daerah endemis dengan orang sehat atau yang baru sembuh,
- b) bahan antigen untuk reagen Widal dapat memberi kesimpulan berbeda-beda apabila antigennya dibuat dari strain yang berbeda ,
- c) kemungkinan reaksi silang dapat timbul apabila terdapat infeksi dengan *Salmonella sp* atau enteropatogenik lain (positif palsu pada *salmonellosis non tifoid*),
- d) tidak terdapat korelasi antara uji Widal dan perbenihan *S. typhi*.

2.2 Pemeriksaan Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay)

menggunakan LPS atau *flagellin* sebagai antigen (Nardiello et al.,1984;Sippel et al., 1989; Pang et al .1989; Sadallah et al.,1990).

- a) Kelemahan cara pemeriksaan ini hampir sama dengan cara Widal, tetapi Elisa lebih peka (sensitif). Untuk daerah endemis penentuan titer IgG untuk diagnosis lebih sensitif dari pada IgM, sedangkan untuk daerah non-endemis pemeriksaan IgM lebih sensitif daripada IgG.
- b) Kemungkinan terjadi reaksi silang tak dapat dihindari apabila antigen untuk pelapis (*coating*) kurang khas (spesifik) terhadap *S. typhi*.

2.3 Pemeriksaan *Enzyme immunoassay Dot (Typhi dot)* (Vullo, et al. 1987, Hilderbrand, 1979, Ismail et al., 1992)

Caranya praktis dan mudah, cuma kelemahannya hampir sama dengan Elisa, yaitu kemungkinan terjadi reaksi silang akibat reaksi antibodi dari beberapa *Salmonella spp.* atau enteropatogen lain, sehingga derajat kekhasannya (spesifitasnya) rendah. Hal tersebut tergantung pada kemurnian antigen yang dipakai (Ismail et al. 1992).

2.4 Penentuan antigen *S. typhi* (Rigby, 1984; Appasakij et al., 1987)

- a) Lebih khas dibandingkan dengan cara penentuan antibodi, tetapi diperlukan antibodi yang spesifik untuk menentukan reaksi antigen tersebut, agar hasilnya dapat memastikan diagnosis.
- b) Untuk membuat antibodi tersebut sehingga memperoleh kekhasan (spesifitas) yang tinggi diperlukan teknik khusus misalnya digunakan antibodi monoklonal khusus terhadap antigen *S. typhi*.
- c) Kelemahan lain ialah apabila antigen tersebut terdapat pada kuman mati hasilnya tetap positif. Hal ini terjadi pada penderita baik yang masih sakit maupun yang sedang sembuh (*convalescent*). Cara penentuan antigen *S. typhi* untuk diagnosis demam tifoid lebih tepat dan khas, tetapi memerlukan waktu yang cukup lama dalam

pembakuan (standardisasinya) dan penentuan nilai ambang batasnya (*cut off value*) (Nardiello et al. 1984;dikutip Voller & Bidwell , 1986; Sippel et al. 1989; Porstmann & Hiessig, 1992; Handojo,1995)

2.5 Penentuan pelacak DNA (Rubin, 1989,1992)

Akhir-akhir ini telah dikembangkan cara pemeriksaan yang menggunakan pelacak (*probe*) DNA (*deoxyribo nucleic acid*) (Rubin et al.,1992). Dengan cara tersebut berhasil ditemukan pengenalan (identifikasi) *S. typhi* dalam darah tanpa dipengaruhi oleh pemberian antibiotika. Kepekaannya sama dengan perbenihan sumsum tulang. Cara tersebut juga tidak berbahaya karena tidak mengandung bahan radio aktif.

Dibandingkan dengan cara perbenihan penentuan dengan pelacak (*probe*) DNA waktunya lebih singkat , sederhana , peka dan khas.

Menurut Rubin (1992), pemeriksaan pelacak DNA dapat menemukan *S.typhi* pada 97 %(28/29) penderita, dibandingkan dengan cara perbenihan darah sebesar 79 % (23/29) penderita.

Pelacak DNA dari mikro-organisme penyebab terdapat didalam DNA (nukleotida), dengan demikian cara pelacakan tersebut khusus hanya dimiliki oleh mikro-organisme yang bersangkutan.

Kelemahan pada pemeriksaan pelacak DNA ini adalah diperlukannya perbenihan terlebih dahulu (lebih 500 sel) dan cara tersebut sukar dilakukan dengan otomatisasi.

2.6 Cara *Polymerase chain reaction (PCR)* (Stackebrant & Goodfellow,1991; David,1992; Rolfs,1992; Persing et al., 1993; Towner,1993; Luk,1994,Song et.al,1993, Hashimoto,et al.1995, Zhu et al., 1996).

Akhir-akhir ini dikembangkan juga cara penentuan DNA melalui PCR yang menghasilkan produk penguatan (amplifikasi) berupa urutan khas DNA (*specific DNA sequence*) yang menghasilkan berjuta-juta cetakan atau salinan (*copy*) dalam waktu singkat (3 jam). Cara PCR ini pelaksanaannya lebih singkat, peka, khas, dan tahapan tekniknya cukup sederhana.

Memperhatikan bahwa penentuan diagnosis pasti demam tifoid yang memakan waktu cukup lama dan menyebabkan keterlambatan waktu pengobatan pada penderita, dapat memperbesar peluang timbulnya penyulit dan biaya perawatan, maka perlu dicari diagnosis yang cepat, tepat dan khas.

Cara PCR diperkirakan dapat digunakan sebagai pengganti pemeriksaan perbenihan apabila dengan cara biasa sukar untuk mengisolasi kuman penyebabnya. Meskipun biayanya mahal, cara tersebut mempunyai beberapa keuntungan yaitu dapat:

- a) mengurangi biaya rawat inap penderita;
- b) menentukan pengobatan dengan tepat karena penderita segera diketahui diagnosisnya secara dini;
- c) digunakan pula sebagai sarana pencegahan, terutama untuk menemukan pembawa penyakit (*carrier*) dan selanjutnya ditangani secara seksama.

Meskipun cara tersebut di atas baru dalam taraf penelitian di beberapa negara termasuk Indonesia ,tetapi perlu juga diteliti apakah cara PCR cukup

tepat guna (efisien) dan berdaya guna (efektif) dalam pemakaian untuk tujuan diagnostik ?

1.2 Rumusan Masalah

Memperhatikan perihal tersebut di atas, timbul permasalahan yang berhubungan dengan cara pemeriksaan konvensional, waktu pemeriksaan perbenihan yang lama dan kepekaan hasilnya yang rendah. Sebab hal tersebut dapat memperlambat diagnosis dan menyebabkan pengobatan yang tidak sesuai. Oleh karena itu perlu dicari cara diagnosis alternatif yang cepat, peka dan khas untuk *S. typhi*.

Memperhatikan juga bahwa cara pemeriksaan dengan amplifikasi DNA seperti pada PCR waktunya singkat, tahapan tatacaranya cukup sederhana, hasilnya peka dan khas, maka perlu dilakukan penelitian untuk meyakinkan daya guna cara pemeriksaan yang tersebut di atas sebagai cara diagnosis alternatif yang diharapkan. Dalam hal ini perlu dilakukan penelitian untuk menentukan nilai diagnosisnya pada demam tifoid dan membandingkannya dengan uji serologis Widal yang sudah rutin dipakai di Indonesia. Berdasarkan pembahasan latar belakang permasalahan dapat dirumuskan masalahnya sebagai berikut.

a. Apakah tehnik PCR mempunyai nilai diagnostik andal untuk menunjang diagnosis demam tifoid ?

b. Apakah uji PCR lebih peka dan khas bila dibandingkan dengan uji serologis Widal ?

1.3 Tujuan penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mencari cara diagnosis alternatif demam tifoid yang khas (spesifik) dan peka (sensitif).

1.3.1 Tujuan umum

Tujuan penelitian secara keseluruhan yang ingin dicapai ialah untuk mendapatkan cara atau sarana diagnosis demam tifoid yang cepat dan andal (*reliable* = sensitif dan spesifik), sehingga dapat membantu menegakkan diagnosis demam tifoid dalam waktu singkat, sehingga dapat memperpendek waktu rawat penderita dan mencegah timbulnya penyulit penyakit.

1.3.2 Tujuan khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini ialah .

- 1) Untuk menentukan nilai diagnostik (kepekaan dan kekhasan) uji PCR dengan memakai cara perbenihan dari sampel penderita sebagai standar emas (*gold standard*)
- 2) Untuk membandingkan kepekaan dan kekhasan uji PCR dengan uji serologis Widal dalam menentukan diagnosis demam tifoid.

Dengan demikian akan diperoleh informasi untuk menentukan cara pemeriksaan guna mendukung diagnosis demam tifoid yang peka dan khas. Yaitu cara pemeriksaan yang dalam waktu singkat diketahui hasilnya sehingga dapat ditentukan pengobatan yang lebih tepat dan cepat agar infeksi tidak menyebar atau menjalar ke sekitarnya.

Selanjutnya dari hasil penelitian ini diharapkan akan diketahui pula:

- a) Apakah pemeriksaan amplifikasi DNA (PCR) mempunyai nilai diagnostik yang andal, bila perbenihan darah dipakai sebagai standar emas?
- b) Apakah kepekaan dari diagnosis laboratorik antara cara penentuan antibodi uji Widal dan penentuan amplifikasi DNA berbeda?
- c) Apakah pemeriksaan amplifikasi DNA (PCR) dapat digunakan sebagai pengganti hasil perbenihan (ada korelasi yang baik dengan hasil perbenihan)?

- d) Apakah hasil pemeriksaan amplifikasi DNA tidak memberi reaksi silang dengan *Salmonella sp.* lain ?
- e) Apakah kekhasan dan kepekaan (sensitivitas dan spesifitas) tergantung kepada genom DNA masing-masing primer ?

1.4 Manfaat penelitian

Manfaat penelitian adalah untuk perkembangan ilmu pengetahuan dan penerapan praktisnya, yaitu:

1. Pengetahuan dan pemahaman uji PCR berguna bagi pengembangan ilmu biomolekuler terutama dalam penelitian bidang diagnostik penyakit menular di daerah endemik;
2. Pelaksanaan uji PCR berguna untuk memecahkan kasus-kasus bermasalah di bidang tersebut terutama peranannya sebagai standar emas;
3. Pemanfaatan uji PCR di bidang kesehatan terutama sebagai alat bantu diagnostik dalam rangka pemberantasan dan pencegahan penyakit menular serta penekan angka kematian;
4. Hasilnya dapat bermanfaat bagi masyarakat, dengan diketahuinya ketepatan uji PCR, diharapkan secara tidak langsung dapat menurunkan pembawa *S.typhi* (*carrier*) di samping dapat meningkatkan upaya kesehatan;
5. Pemanfaatan uji PCR di masa mendatang sebagai salah satu upaya dalam membuat vaksin yang tepat dan paling sesuai khususnya untuk penangkal demam tifoid

BAB 2

Bab 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pengertian demam tifoid ditinjau dari masalah kesehatan

Demam tifoid sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan baik di negara maju maupun negara yang sedang berkembang. Penyakit tersebut dapat timbul setiap saat, tidak mengenal musim, baik pada musim hujan maupun pada musim panas. Karena itu menjangkitnya penyakit ini menjadi beban yang merugikan bagi penderita dan secara tak langsung bagi pemerintah. Akibat demam tifoid dapat menyebabkan komplikasi berat maupun ringan, yaitu perdarahan di saluran cerna atau perforasi di usus halus dan sebagian daripadanya berakibat fatal. Angka kematian (*case fatality rate*) akibat perdarahan di saluran cerna atau perforasi di usus halus masih cukup tinggi, yaitu berkisar antara 20-80 % (Hadisapoetro, 1990).

Menurut catatan medik Unit Pelayanan Fungsional (UPF) bedah RSUD Dr. Sutomo (Sudjatmiko, 1995) dalam kurun waktu lima tahun didapatkan 33 penderita tifoid dengan komplikasi perforasi, terbanyak pria 28 orang (84 %) sedang angka kematian 2 orang (6%) .

Menurut laporan Puspongoro dan Syamsuhidayat (1990) sungai Ciliwung merupakan sumber infeksi *Salmonella* dan jumlah penderita demam tifoid di Jakarta masih cukup tinggi. Juga terdapat meningkatnya penderita dengan batu empedu, yang mungkin berkaitan dengan pembawa *S typhi* (*carrier*). Oleh sebab itu perlu dilakukan pencegahan dan penentuan diagnosis dini agar angka kesakitan dapat ditekan.

Keberhasilan pemberantasan demam tifoid terutama tergantung kepada sistem penyediaan air bersih dan pembuangan limbah yang baik. Adanya daerah endemis di negara berkembang disebabkan oleh kurang mutunya penyediaan air bersih dan sarana pembuangan limbah yang tidak memenuhi syarat kesehatan. Selain itu juga masih terbatasnya sarana untuk penemuan kasus pembawa penyakit tifoid (*typhoid carrier*) (Hornick, 1985).

2. 2 Epidemiologi demam tifoid

Manusia merupakan pejamu alami untuk *S. typhi* dan hampir semua umur dan jenis kelamin mempunyai kepekaan yang sama terhadap infeksi demam tifoid. Infeksi cacing menahun (*Schistosomiasis*) merupakan faktor yang mempermudah terjadinya penyakit demam tifoid maupun pada pembawa infeksi menahun (*carrier stage*). Biasanya infeksi menahun terjadi pada wanita yang berusia di atas 50 tahun. Diperkirakan persentase pembawa infeksi menahun sekitar 3 %. Pembawa infeksi menahun mengeluarkan (ekskresi) sebanyak 10 bakteri per g tinja secara terus-menerus sepanjang tahun. Kejadian seperti ini merupakan sumber infeksi baru bagi masyarakat sekitarnya. Berkala, kuman *S. typhi* dapat hidup lama dalam air, es, debu atau di dalam sampah kering, bahan-bahan tersebut diperkirakan menjadi sumber infeksi yang potensial (Butler, 1977).

Edelman dan Levine (1986) memperkirakan kasus demam tifoid yang setiap tahun timbul di negara-negara dari seluruh dunia sebesar 12,5 juta, belum termasuk yang dari negara Cina. Angka tersebut diperoleh dari 365 kejadian kesakitan per 100.000 penduduk dan 540 kejadian per 100.000 penduduk di negara berkembang, sedangkan angka kematian diperkirakan 1%. Dari angka sensus penduduk

diperkirakan bahwa terdapat 6,89 juta kasus per tahun di Asia Selatan dan di Asia Timur (1,369 juta penduduk), 749 000 kasus di Asia Barat (98 juta penduduk), 15 000 kasus di Mesir (43 juta penduduk), 406 000 kasus di Amerika Latin dan kepulauan Pasifik Selatan (369 juta penduduk) dan 23 000 kasus di negara berkembang (1.131 juta penduduk).

Menurut Chee et al., (1990) di negara jiran Malaysia yang alam dan penduduknya mirip dengan di Indonesia, penularan penyakit terutama terjadi melalui makanan dan minuman. Meluasnya hubungan dengan penduduk dari luar Malaysia yang semakin banyak seperti antara lain karena kedatangan tenaga kerja dari Indonesia maupun pendatang lain yang semakin sering, dapat mempermudah penularan penyakit. Selain itu penularan penyakit juga dapat terjadi karena kebiasaan makan di luar rumah, karena taraf kebersihan penyajiannya tidak terjamin.

Angka kesakitan dilaporkan beragam, pada th.1978 - 1990 yaitu 1715 - 2962 kasus per tahun atau 10,2 kasus sampai 17,9 kasus per 100 000 penduduk dengan angka kematian di bawah 0,0016 - 0,0104 per 100 000 penduduk (Chee et al.,1992)

Menurut (Edelman dan Levine, 1986; Hornick, 1986) faktor-faktor yang mempengaruhi angka kesakitan penyakit demam tifoid antara lain ialah:

- a. Peningkatan jumlah penduduk yang cepat,
- b. Peningkatan urbanisasi yang cepat,
- c. Fasilitas pembuangan kotoran manusia yang tidak memadai,
- d. Kurangnya jumlah dan mutu penyediaan air bersih,

- e. Bahan makanan dan minuman yang kemungkinan besar tercemar,
- f. Pembawa penyakit (*carrier*), yang dibiarkan tak tertangani,
- g. Higiene perseorangan, tidak memenuhi syarat kesehatan,
- h. Kebersihan yang tak memenuhi syarat kesehatan,
- i. Sanitasi lingkungan masyarakat yang buruk, dan
- j. Gambaran angka kesakitan dengan tifoid yang diperoleh lebih rendah dari yang sebenarnya, baik karena diagnosisnya keliru maupun karena pengobatannya tanpa pengawasan medis yang baik, atau itu dapat pula karena tidak pernah dilaporkan kejadian penyakitnya kepada Departemen Kesehatan.

Pada tahun 1981 jumlah kasus demam tifoid di Indonesia adalah 19.596 orang dan pada tahun 1986 ditemukan kenaikan 35.8 % sehingga kasusnya menjadi sebanyak 26.606 (Sudarmono dan Radji, 1992).

Menurut Edelman dan Levine (1986), di Indonesia demam tifoid termasuk lima besar penyebab kematian. Soedarmo (1992) melaporkan bahwa angka kesakitan demam tifoid sekitar 350 - 810 kasus per 100 000 penduduk per tahun atau berkisar 600 000 sampai 1 500 000 kasus per tahun.

Menurut catatan medik RSUD Dr.Sutomo th.1982 angka kematian demam tifoid sebesar 2 - 3,5 % (Prihatini et al.,1989), hal itu berarti bahwa terdapat sekitar 50 000 kematian per tahun. Angka kesakitan demam tifoid di Indonesia adalah yang tertinggi di dibandingkan dengan negara-negara lain. Seperti yang dilaporkan pada survai Budiarso dkk. dari th. 1983 -1988 di daerah Sumatera Selatan dan Jawa Barat didapatkan angka kesakitan daerah semirural sekitar 358

per 100 000 populasi per tahun, dan 760-810 per 100 000 populasi per tahun di daerah urban.

Populasi utama kelompok risiko adalah balita sampai remaja (murid sekolah) yang berumur sekitar 3 -19 tahun. Dilaporkan bahwa angka kematian di daerah urban dan daerah pertumbuhan (*growing areas*) di Indonesia lebih tinggi dibandingkan dengan di negara lain. Angka kematian di RS Cipto Mangunkusumo berkisar sekitar 3,5 - 5 %. Di Asia Tenggara terdapat 600 000 sampai 1 200 000 kasus dengan angka kematian per tahun sebesar 20 000 (Sudarmono dkk,1992).

Ivanoff (1994) dari WHO melaporkan bahwa angka kesakitan mencapai 16 juta per tahun di seluruh dunia dan menyebabkan kematian sebesar 600 000 orang per tahun. Rata-rata penyakit ini banyak terjadi di negara berkembang .Tercatat 150 kasus per 10⁵ penduduk per tahun di Amerika Selatan, dan sampai 900 kasus per 10⁵ penduduk per tahun di Asia.WHO berpendapat bahwa angka kesakitan berada di bawah perkiraan (*underestimate*) dari besarnya masalah tifoid. Tampaknya tidak ada kesamaan pendapat mengenai definisi yang dipakai untuk kasus tifoid. Beberapa negara memakai sebagai tolok ukur yang berbeda yaitu adanya gejala klinis, pemeriksaan bakteriologis, diagnosis serologis melalui uji Widal (kepekaannya sedang). Beberapa sistem pelaporan menggunakan kombinasi ketiga kriteria terse-but. Seringkali penyakit tifoid tidak dapat dibedakan dengan kelompok penyakit atau keadaan demam yang tidak diketahui penyebabnya (*pyrexia of unknown origin*), apakah itu disebabkan *Salmonellosis*, infeksi *Salmonella Shigella*, gastro-enteritis atau demam enterik. Pada keadaan tersebut

sukar sekali menyeragamkan kriteria pelaporan dan memperbaiki pengawasannya (Hornick, 1985).

Sepengetahuan penulis selama ini pelaporan yang disampaikan ke Dinas Kesehatan Kota maupun Departemen Kesehatan secara pasti belum jelas besar angka kesakitan demam tifoidnya. Hal tersebut disebabkan karena tidak dijelaskan dasar pemeriksaan pasti apa yang dilakukan oleh pelapor dalam melaporkan jumlah kasusnya, apakah dengan perbenihan *S. typhi* yang positif ataukah hanya berdasarkan pelaporan data klinis saja.

2. 3 Gejala klinis demam tifoid

Gejala klinis demam tifoid yang khas seperti yang tercantum pada sub pokok bahasan **1.1.4.1 Masalah diagnosis klinis**. Lama demam diperkirakan lebih dari tujuh hari, dan sifat demamnya berselang-seling (*intermiten*). Hampir semua demam tifoid disertai diare, tetapi gejala ini biasanya tidak umum. Kematian biasanya disebabkan karena toksemia, perdarahan usus, atau perforasi usus. Pengobatan dengan kloramfenikol dan antibiotika jenis lain akan memperpendek lama demam dan menurunkan angka kematian (Buttler et al., 1977). Keadaan demam yang menetap lama patut diduga sebagai demam tifoid, apabila terjadi di daerah endemis atau terpapar oleh pembawa infeksi tifoid.

Menurut Khosla (1992) dalam klasifikasi klinis secara luas, demam tifoid dibagi menjadi:

- a. Demam akut, ditandai dengan demam, pusing kepala, nyeri badan, malaise, nafsu makan menurun, rasa perut tak enak dan terdapat pelbagai variasi derajat toksemia. Separuh kasus hanya mengalami demam tinggi, sedangkan beberapa

- kasus lainnya menderita demam tinggi dengan toksemia berat. Yang terakhir ini disebut status tifoid (*typhoid state*) dan berlangsung selama 1 atau 2 hari,
- b. Demam dengan infeksi saluran nafas atas dengan batuk, dan radang tenggorok terdapat pada 10 % kasus,
 - c. Demam dengan gejala saluran pencernaan yang menonjol dan disertai *diarrhea*, dan muntah-muntah, rata-rata terdapat pada 10 % kasus,
 - d. Demam tifoid ditandai dengan serangan ringan sesuai dengan gambaran klinis yang klasik menurut buku acuan. Yaitu demam yang dimulai dari panas badan tidak begitu tinggi, atau meningkatnya demam sesuai dengan gambaran tangga (*stepladder*) dan mencapai puncaknya kira-kira sesudah seminggu; toksemia terjadi setelah waktu tersebut dan kira-kira 20 % dari kasus yang dijumpai memberikan gambaran klinis seperti itu.
 - e. Demam dengan serangan penyulit; pada beberapa kasus demam tifoid dijumpai gejala penyulit neuropsikiatri, kegagalan sirkulasi perifer, perdarahan, renjatan (*shock*), perforasi usus, miokarditis dan sebagainya; hal tersebut ditemukan pada 10 % kasus.

2. 4 Patogenesis demam tifoid

2.4.1 Masuknya kuman (bakteri)

Infeksi demam tifoid dimulai dari awal masuknya *S. typhi* ke dalam saluran cerna bersama makanan dan minuman yang tercemar. Setelah melalui penyekat (*barier*) asam lambung, bakteri akan sampai di usus kecil dan kemudian berkembang biak. Di dalam epitel usus bakteri dimakan oleh sel makrofag dan masuk ke dalam tompok Peyer (*Peyer's patches*), selanjutnya masuk ke dalam

saluran getah bening dan melalui mesenterium masuk ke dalam peredaran darah umum melalui duktus toraksikus sehingga timbul bakteremia pertama. Keberhasilan bakteri menembus ke dalam epitel dipengaruhi oleh keasaman lambung, waktu pengosongan lambung dan jumlah bakteri minimal 10^5 yang melalui mulut. Penembusan ke dalam epitel usus terjadi dengan cara menempel, melekat dan kemudian menembus epitel usus, keadaan ini dipengaruhi oleh faktor pejamu dan lingkungan.

Di dalam sel, bakteri mampu berkembang biak di lamina propria dan dimakan oleh sel makrofag. Kemudian bakteri masuk ke dalam sistem organ retikuloendotelial di seluruh tubuh terutama hati, limpa dan sumsum tulang. Dari sini bakteri mengikuti aliran darah sehingga timbul bakteremia kedua yang sifatnya simptomatis yang mengakibatkan demam, menggigil, kembung dan sebagainya. Bakteri dalam hati dapat masuk ke dalam kantung empedu dan dapat dikeluarkan bersama cairan empedu ke dalam usus atau ke saluran air seni. Tidak semua mikroorganisme masuk ke dalam organ tersebut, sebagian akan ditangkap oleh makrofag dan masuk ke dalam organ nonfagosit dan sel parenkim, kemudian berkembang biak tanpa menimbulkan gejala (Hsu, 1989).

S. typhi hanya menimbulkan gejala pada manusia karena bersifat *serovar* secara genetik yaitu hanya hidup dan berkembang biak di dalam tubuh manusia.

2.4.2 Antigen *S.typhi* (Ewing,1982; Szu et al.,1987; Sarasombath, 1992)

Komponen antigen utama *S. typhi* terdiri dari:

a) **Kapsul polisakarida Vi**, antigen yang berada dilapisan luar *S. typhi* berupa homopolimer linier dari ikatan 1.4 N *acetyl galactosaminumoric acid*, variabel O-

acetylated berada pada posisi C-3. Mempunyai paling sedikit 2 antigen determinan (kelompok imunodominan) dan masing-masing mempunyai gugusan N-acetyl dan gugusan karboksil. Baik N-acetyl maupun gugusan karboksil diperlukan untuk reaksi antigen antibodi. Ukuran molekul antigen Vi sekitar 65.5×10^3 kDa. Seperti diketahui antigen ini merupakan antigen sel T yang independen dan dapat langsung merangsang sel B tanpa perantaraan sel T. Diperkirakan kapsul Vi yang berperan sebagai pelindung *S. typhi* terhadap antibodi anti-*S. typhi* di dalam pejamu. Strain yang tidak mempunyai antigen Vi ternyata kurang virulen terhadap manusia.

Pada penelitian dengan menelan 10^7 bakteri yang mengandung antigen Vi ditemukan penyebab penyakit yang lebih berat dibandingkan dengan yang tanpa antigen Vi. Antigen Vi diduga ikut berperan dalam proses fagositosis, yaitu proses penelanan bakteri oleh sel lekosit polimorfonukliir (Hornick, 1985). Menurut Franco et al (1992), terdapat hubungan antara strain dengan sifat yang khas dan beratnya penyakit. Penyelidikan mereka dengan strain *S. typhi* dari Peru dan Indonesia terdapat persamaan pada antigen flagela j (Hl-j) yang dibuktikan dengan analisis immunoblot dan PCR.

b) Antigen O (lipopolisakarida, LPS) yang dikenal sebagai endotoksin, merupakan rantai heteropolisakarida dari satuan oligosakarida (antigen O) yang berhubungan dengan heteroligosakarida (*core*). Macam-macam komposisi O-polisakarida yang ada merupakan petanda dari spesies bakteri dan anggota spesies yang sama, tetapi inti (*core*) dan lipid A strukturnya hampir sama pada sebagian besar bakteri negatif Gram. Dinding sel basil tifoid mengandung endotoksin disebut lipopolisakarida. Endotoksin mempunyai sifat biologis yang memegang

peranan pada timbulnya gejala klinis demam tifoid. Endotoksin merangsang tanggapan seluler mononuklir dengan melepaskan pirogen endogen yang menyebabkan rangsangan koagulopati, sehingga terjadi perdarahan, dan kejadian tersebut dapat merangsang terjadinya vasokonstriksi. Bila pelepasannya banyak, maka dapat menyebabkan iskemia atau destruksi sel dan sehingga menimbulkan perdarahan dan perforasi. Endotoksin mengaktifkan komplemen dan merangsang kaskade pembekuan darah (*clotting cascade*) dan dapat berkembang menjadi renjatan sepsis (*septic shock*).

Salmonella mempunyai lebih dari 65 macam antigen O yang berbeda. Tipe 9 dan 12 dari antigen O merupakan antigen yang khas untuk *S. typhi*, tetapi tipe tersebut juga terdapat pada 140 jenis *salmonella* lainnya

Lapisan tengah dinding sel *S. typhi* adalah inti R(*ough*), yaitu susunan lapisan dinding sel menjadi non - patogen. Inti R mungkin berperan pada perlindungan terhadap infeksi, terbukti dengan percobaan pada kelinci dengan *S. minnesota*.

c) Antigen H (protein *flagella*)

Dalam satu spesies *Salmonella* , antigen *flagella* mungkin terjadi pada salah satu atau keduanya dalam dua bentuk yaitu dapat berubah dari fase yang satu ke fase lain. Organisme cenderung pindah (mutasi) dari salah satu fase kelainnya. Fase 1 mengandung antigen yang lebih spesifik dari pada fase 2. Flagela mempunyai struktur kompleks terdiri dari protein polimer, disebut *flagellin* dengan berat molekul 51-57 kDa. Pada percobaan lapangan, korelasi kadar antibodi terhadap antigen H dengan ketahanan terhadap penyakit bervariasi. Keadaan klinis yang menyerupai infeksi *Salmonella spp* lain, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*,

S. paratyphi C, seringkali diagnosis dibuat sebagai demam tifoid karena perjalanan penyakit-penyakit tersebut hampir sama.

d) *Outer membrane protein* (membran protein luar).

Omp (*Outer membrane protein*) adalah suatu lapisan luar dari bakteri Gram negatif yang mempunyai struktur khusus dan lapisan peptidoglikan dan membentuk hubungan antara sel dengan lingkungan luar. *Omp* merupakan barier fisik dan fungsional berada antara tubuh sel dan lingkungan sekitarnya (Osborn dan Wu, 1980). Struktur kimia utama *Omp*, terdiri dari susunan lemak yang dirangkai dalam struktur dua lapis yang asimetris dengan lipopolissakarida pada lapisan luarnya .

Menurut Osborn dan Wu (1988) peranan dan fungsi *outer membrane protein* adalah sebagai saluran yang bersifat hidrofilik dan dapat dilalui (difusi) solut dengan berat molekul lebih kecil dari 6000 dalton.

Calva (1992) melaporkan bahwa berdasarkan strukturnya *Omp* (*outer membrane protein*) *S. typhi* yang dibuat oleh gen tertentu, dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu porin yang merupakan komponen utama, terdiri dari protein *OmpC*, *OmpD*, *OmpF*, dan *PhoE*. Osmolaritas ditentukan dan diatur oleh *OmpR* varian regio yang hidrofilik dengan kemungkinan terpapar regio tersebut.

Menurut Mora (1994), produksi *OmpC* dirangsang oleh keadaan anaerob. Hal tersebut kemungkinan hanya terjadi pada saat infeksi berlangsung secara *in vivo*.

OmpC merupakan antigen terpenting dalam respon imun pada demam tifoid.

Peranan *Omp* dalam respon imun dari demam tifoid khas dan dapat dipakai sebagai antigen untuk diagnostik dan mungkin juga bersifat protektif sehingga mungkin

dapat dipakai untuk pembuatan vaksin . Masih dipertanyakan apakah ada perbedaan dalam respon imun dari bermacam- macam *Omp* tersebut.

Calderon et al., (1986) pertama kali mengenalkan adanya antibodi spesifik terhadap sediaan *Omp*, terutama *OmpC* dan *OmpF* dalam suatu penelitian yang dilakukan pada penderita tifoid akut dari Chili.

Dalam penelitian Rodriguez et al., (1993) dibuktikan bahwa peranan *Omp* sebagai antigen dalam diagnosis demam tifoid amat potensial dan dapat digunakan baik untuk daerah endemis maupun non-endemis melalui pemeriksaan *EIA (enzym immuno assay)*. Kadar *Omp* cukup berarti selama infeksi masih ada dalam tubuh manusia dan dapat ditunjukkan pada permukaan sel kuman. Keuntungan antigen *Omp* ialah kemampuannya untuk merangsang pembentukan antibodi dengan afinitas yang tinggi dan dapat menimbulkan imunitas mediasi seluler (*cell mediated immunity*) yang menghasilkan perlindungan yang lama terhadap bakteri. Selain itu *Omp* tidak menimbulkan reaksi silang dengan enteropatogen lain dan sebagian *Salmonella sp.* Pada *Omp* dibuktikan pula tidak terdapat perbedaan antara beberapa *S. typhi* dari beberapa daerah atau negara lain.

Hasil penelitian Ortiz et al., (1988), membuktikan bahwa porin (*Omp*) dari *S. typhi* merupakan antigen imunogenik utama dalam merangsang proliferasi respon imun *in vitro* pada limfosit T dari tikus. Ada kemungkinan pula bahwa *Omp* berperan dalam mekanisme daya tahan tubuh terhadap *S. typhi* penderita demam tifoid.

Ismail et al., (1991) menunjukkan bahwa antigen *Omp* 50 kDa adalah antigen yang khas untuk *S. typhi*. Dengan pemeriksaan *SDS PAGE* didapatkan bahwa antigen dengan berat molekul sebesar 50 kDa berada pada membran luar (*outer*

membrane) *S. typhi* dan bukan berasal dari kapsul *Vi*, *dH* (flagela) atau O9 (somatik). Pita 50kDa bukan suatu glikoprotein seperti LPS dalam *SDS PAGE*, *Omp50kDa S. typhi* merupakan suatu imunogen yang baik. Pool serum dari penderita demam tifoid dengan perbenihan positif mengandung IgG dan IgM spesifik terhadap terhadap 50 kDa antigen.

Menurut penelitian Singh et al., (1992), antibodi monoklonal terhadap *S.typhimurium OmpC* dan *OmpD* mempunyai variasi dalam derajat reaksi silangnya dengan porin dari *Salmonella* lain, *E. coli* dan lain *Enterobacteriaceae*. Kira-kira sepertiga antibodi monoklonal diketahui mengenali epitop yang sama di antara berbagai bakteri ini.

2.4.3 Virulensi *S. typhi*

Menurut Leung et al.,(1991) infeksi terjadi melalui tiga tingkatan: invasi, hidup dalam sel (*survival intracellular*), dan berkembang biak intraseluler (*intracellular replication*) .Virulensi *S.typhi* di pengaruhi oleh beberapa faktor (Mills and Finlay, 1994).

2.4.3.1 Penembusan (invasi)

Penembusan ke dalam epitel usus dipengaruhi oleh mikrovili bakteri, dan membran vakuol dari sel pejamu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri yang masuk ke dalam sel diliputi membran vakuol pejamu sehingga bakteri tetap hidup dan berkembang biak dalam sel pejamu. *S.typhi* mempunyai kaitan dengan penembusan dan gen yang terlibat dalam proses ini telah diidentifikasi melalui pendekatan genetika molekul (Liu et al.,1988; Gallan & Curtis 1991; Altmeyer, 1993; Gallan, 1994).

2.4.3.2 Faktor yang mempengaruhi penembusan.

Tartera dan Metcalf (1993) melaporkan bahwa *S. typhi* dapat mengikat dan menembus secara efektif ke dalam sel epitel bila berada di dalam perbenihan jaringan (epitel sel manusia) dalam suasana aerob dengan media cair LB (Luria Bertani) yang mengandung 0,3 M NaCl atau sukrose. Hal tersebut berbeda dengan *S. typhimurium*, yang memerlukan suasana anaerob pada fase stasioner.

2.4.3.3 Kemampuan gerak (motilitas)

Kemampuan gerak memegang peranan penting pada virulensi *S. typhi* selain invasi, seperti penetrasi ke dalam mukosa dan penyebaran sistemik.

2.4.3.4 Interaksi dengan sel epitel pejamu

- a. *Salmonella sp.* memproduksi protein yang dapat mengikat permukaan epitel sel pejamu. Induksi protein menimbulkan regulasi lingkungan mikro (rendah oksigen), fase pertumbuhan dan, munculnya molekul-molekul antigen pada permukaan sel pejamu. Apabila molekul bakteri tidak menginduksi protein, maka bakteri tidak dapat melekat atau menembus sel epitel. Dalam proses masuk ke dalam sel eukariotik diperlukan molekul-molekul bakteri yang khas pada *Salmonella spp.* Sampai saat ini ditemukan struktur gen yang kompleks dan paling sedikit ada enam molekul yang terlibat, misalnya lipopolisakarida dan toksin lain, *iron siderophore Salmonella spp* dan masih ada beberapa faktor lain yang mempengaruhi penembusan.
- b. Internalisasi dan pertukaran sinyal (*Internalization and Signal exchange*). Bahan yang menghambat pembentukan mikrofilamen dapat mengurangi daya masuknya *Salmonella*. Mikrofilamen berfungsi dalam endositosis (internalisasi)

S. typhi. Sinyal akan dikeluarkan oleh sel pejamu (internalisasi bakteri kompleks), sehingga komponen transduksi terpapar, termasuk dalam hal ini tirosine protein kinase. Apabila *Salmonella spp* berada pada permukaan sel pejamu maka terjadi transduksi 'signal penangkap' (*transduction "uptake signal"*) pada sel pejamu yang digunakan untuk memperkuat dan menyusun filamen yang diperlukan untuk internalisasi bakteri.

c. Parasit intraseluler dalam mikro vakuol

Di dalam sel pejamu, *Salmonella sp* berada dalam vakuol yang diliputi membran yang sama dengan dinding sel. Bakteri di dalam sel dapat hidup, tergantung pertahanannya terhadap makrofag, fagosom lisozom, pH dan makanan yang terbatas. Vakuol sel pejamu mempengaruhi kadar Mg^{++} dan Fe^{++} sehingga memungkinkan *Salmonella* dapat membentuk (sintesis) faktor untuk menetralkan lingkungan pejamu di dalam vakuol. Pada waktu yang sama dapat dibuktikan, bahwa lingkungan sisa makanan meningkatkan kemungkinan untuk dapat memperbanyak diri.

d. Replikasi intraseluler

Sesudah lebih kurang 4 jam, *S. cholerasuis* dan *S. typhimurium* memperbanyak diri di dalam sel (intraseluler). Dengan menggunakan prosedur yang kaya dengan bahan mirip ampisilin sebagai lingkungan untuk mematikan bakteri yang memperbanyak dirinya di dalam epitel sel, dapat ditemukan beberapa transposon mutan di dalam *S. typhimurium* yang tidak dapat memperbanyak diri dalam sel (Leung et al., dikutip dari Pang et al., 1991).

e. Fimbriae

Fimbriae adalah ujung protein pada permukaan bakteri yang memudahkan pelekatannya dengan sel pejamu, dan berperan dalam kolonisasi dan infeksi pada jaringan pejamu. Tetapi peranannya sebagai faktor virulen masih belum jelas.

f. Lipopolisakarida

Lipopolisakarida *S. typhi* diduga mempunyai peranan dalam menghambat fungsi Imunokompeten dari sel tikus. (Sulttzer, et al., 1992, dikutip dari Mills and Finlay 1995)

g. Toksin

Toksin yang diproduksi *S. typhi* dalam jumlah kecil, peranannya dalam virulensi *S. typhi* masih belum jelas (Askhenazi, et. al., 1988, dikutip dari Mills and Finlay 1995)

h. Antigen Vi.

Mengenai peranan antigen Vi dalam virulensi *S. typhi* terdapat pendapat yang berbeda-beda. Menurut Hashimoto, 1993 antigen tersebut berperan pada strain yang mengandung antigen Vi, sedangkan menurut Pickard (1993), produksi antigen Vi diatur oleh *OmpR*. Juga terdapat *S. typhi* yang memiliki antigen Vi dengan virulensi rendah. (dikutip dari Mills and Finlay 1995),

2.4.3.5 Multiplikasi intraseluler

Telah dibuktikan bahwa *S. typhi* memperbanyak diri dalam sel makrofag pejamu, yaitu dari hasil percobaan perkembang biakan bakteri di dalam sel HeLa yang merupakan dasar perhitungan sel hidup dengan pemeriksaan mikroskopik.

2.4.3.6 Kelangsungan hidup di dalam makrofag

Pada penelitian untuk menentukan kelangsungan hidup *S. typhi* banyak dilakukan dengan *S. typhimurium* yang dapat hidup dalam makrofag manusia atau hewan. Untuk mengetahui perbedaan kelangsungan hidup di dalam makrofag dari pejamu yang khas dari kedua spesies diperlukan penelitian yang rinci. Pada hasil penelitian Contreras et al., (1994) ditemukan bahwa gen tertentu dari *S. typhi* merangsang suasana anaerob, yaitu keadaan yang sangat diperlukan oleh kuman pada saat penembusan dan pembiakan. Hal ini penting selama infeksi terjadi dalam tubuh manusia.

2.4.3.7 Variasi genetika dan biologi molekuler

Menurut Altweg (1994) pendekatan dengan cara penentuan macam tipe (*typing*) *S. typhi* sejauh ini hanya melalui penentuan macam faga (*phage typing*) dan ribo (*ribotyping*) yang paling efektif dalam penentuan strain *S. typhi*.

Thong (1994) dengan cara pemeriksaan *PFGE* (*pulse field gel electrophoresis*) pada 28 isolat mendapatkan adanya delapan kelompok klon yang dibedakan berdasarkan gambaran *PFGE*. Pengelompokan tersebut sesuai dengan *ribotyping* *PFGE*. Selain itu juga diperkirakan bahwa kromosom *S. typhi* mempunyai ukuran kira-kira sebesar 4,5 mega pasangan basa (*basepair*). Sukosol (1990) menunjukkan bahwa kloning dari gen dengan lambang 52 kDa protein adalah khas untuk *S. typhi* (Pang et al., 1992).

2.4.3.8 Peranan mediator dalam demam tifoid

Keuter et al., (1995) membuktikan bahwa konsentrasi mediator PLA2 (*extracellular phospholipase A2*) dalam sirkulasi dari penderita demam tifoid mengalami penurunan pada saat penyembuhan dan akan meningkat apabila terjadi

komplikasi. Kemungkinan PLA2 berasal dari macam sel lain dan bertindak sebagai perantara (mediator).

2.5. Masalah pembawa penyakit (*carrier*)

Pembawa penyakit (*carrier*) demam tifoid dapat terjadi pada orang sehat atau baru sembuh dari sakit (*convalescent*). Bakteri dikeluarkan melalui tinja atau air seni. PHLS *working party* (1964) melaporkan bahwa pada pengambilan bahan perbenihan dari tinja dengan interval 1 minggu diperoleh 70 - 80 % pembawa penyakit dari 29 kasus yang diperiksa, sedang Ramsey (1964) mendapatkan bahwa 78 % dari 55 kasus dengan sekali pemeriksaan adalah pembawa penyakit. Isolasi *S.typhi* dari manusia memerlukan perencanaan matang dalam hubungan dengan cara pengambilan dan pengiriman spesimen serta pemilihan dan pengawasan metoda laboratoriumnya (Heuser, 1964). Pemeriksaan air minum atau air limbah menunjukkan adanya cemaran dengan kotoran manusia.

Di negara berkembang Cotton dan Forbes (1983), melaporkan bahwa jarang ditemukan pembawa *S. typhi* (kurang dari 3% jumlah penderita demam tifoid) yang dijumpai penderita setelah pengobatan batu empedu. Cara isolasi *S.typhi* dengan *string capsule* pada penderita tifoid lebih efisien dibandingkan dengan pengambilan pemeriksaan tinja (Gilman, 1979).

2.6 Masalah kerentanan (resistensi) antibiotika

Rao et al. (1981) melaporkan kebal majemuk (resisten multipel) dari 4 strain *S. typhi* tipe faga O terhadap kloramfenikol, streptomisin, furazolidine dan cotrimoxazole di daerah endemik. Obrien et al., (1982), pada penelitian serotipe dari hewan ternak dan manusia, didapatkan kebal majemuk terhadap antibiotika

salmonella yang tersebar pada hewan dan manusia. Di beberapa negara yang endemis tifoid seperti India Selatan, Meksiko, Asia Tenggara dan Bangladesh dilaporkan terdapat strain *S typhi* yang kebal terhadap *chloramphenicol*, dan ditemukan plasmid yang khas kebal terhadap kloramfenikol pada strain dari Meksiko. Perlu dilakukan pemantauan terhadap strain yang kebal kloramfenikol secara berkesinambungan. Pada strain *S. typhi* terdapat plasmid yang memberi kekebalan pada kloramfenikol dan *co-trimoxazole*, diduga bahwa gen yang kebal *co-trimoxazole* tersebut diperoleh dari pindahan plasmid *Klebsiella*.

2.7 Masalah pencegahan demam tifoid

Pencegahan risiko infeksi demam tifoid merupakan salah satu cara penekanan angka kesakitan demam tifoid, melalui sanitasi dan kebersihan individu maupun lingkungan. Proses ini perlu dilakukan secara tuntas untuk mengurangi atau menekan penularan lebih lanjut.

Pada pencegahan dengan vaksinasi perlu juga difikirkan pemakaian vaksin yang efektif, selama ini masih digunakan vaksin par enteral sebagai salah satu cara pencegahan (Depkes RI 1971), sedang cara per oral di Indonesia menurut Simanjuntak (1991) masih dalam tahap penelitian disamping itu biayanya cukup mahal.

2.8 Masalah penetapan diagnosis

2.8.1 Masalah penetapan diagnosis klinis

Diagnosis klinis yang dipakai sampai saat ini ditegakkan berdasarkan adanya gejala demam lebih dari 37° C selama tujuh hari atau lebih, penderita tampak sakit, nafsu makan menurun, lidahnya kotor, dan sembelit. Selain itu penetapan diagnosis

juga berdasarkan pada tanda-tanda fisik, seperti perut kembung, limpa dan hati membesar. (Soewondo,1991; Nelwan 1992,)

2.8.2 Masalah penetapan diagnosis laboratorik

2.8.2.1. Pemeriksaan perbenihan sampel

Diagnosis pasti demam tifoid sampai saat ini masih ditentukan dengan adanya mikroorganisme penyebab yaitu apakah ada atau tidak ada *S. typhi*. Padahal dari beberapa pengalaman dan informasi kepustakaan didapatkan banyak kendala yang menyebabkan kesulitan dalam mengisolasi kuman dari perbenihan. Faktor-faktor penyebab kegagalan pemeriksaan perbenihan darah antara lain:

- a. Konsentrasi kuman dalam darah sangat rendah, sehingga diperlukan waktu untuk mengisolasinya atau perlu perlakuan khusus. Menurut Rubin et al. (1989), pada penderita tifoid konsentrasi sekitar 15-20 kuman per ml darah atau kurang dari jumlah tersebut. Selain itu terdapat faktor penghambat antara lain komplemen, enzim, antibodi, antibiotika dan kemoterapeutika (Edelman dan Levine, 1986).
- b. Pengambilan terokan bukan saat terjadinya bakteremia, hal ini akan mengurangi jumlah isolasi mikroorganisme. Beberapa jenis media yang digunakan perlu diteliti manakah faktor penghambat pertumbuhan di samping sebagai faktor penyubur di RSUD dr Sutomo , Anniwati (1991) mendapatkan kepekaan sebesar 43,3 % dengan media empedu (Oxgail) sedang Hartini (1995) mendapatkan 34,3 % dengan media trypticase phosphate broth (TPB). Menurut catatan laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo tahun 1994, 20 pembedahan positif dan 212 uji Widal positif dari 623 sampel. Sampai saat

ini penentuan diagnosis demam tifoid bertumpu pada penemuan mikro - organisme penyebab , yaitu dengan mengisolasi *S. typhi* dari darah, air seni maupun tinja. Waktu untuk pembedahan bervariasi antar 3 - 10 hari tergantung pada masa pembedahan mikroorganisme tersebut maupun jumlah bakteri yang beredar dalam darah penderita (Barua, 1983). Dari gambaran diatas didapatkan kepekaan pembedahan sekitar atau kurang dari 40 %.

c. Pengaruh waktu pengambilan sampel pembedahan .

Variasi penemuan keadaan pembedahan juga tergantung pada masa pembedahan dan jumlah bakteri yang beredar dalam darah penderita .Waktu terbaik pengambilan sampel ialah pada minggu pertama atau 10 hari sejak jatuh sakit . Pada sebagian besar kasus, ditemukan pembedahan positif dari darah pada minggu kedua dan ketiga (Barua, 1983). Pembedahan darah untuk memperoleh hasil *S. typhi* positif kurang dari 90 % pada minggu pertama dan kurang dari 50 % pada minggu ketiga . Pada akhir minggu ketiga tampak peningkatan hasil isolasi dari pembedahan tinja dan air seni. Pembedahan sumsum tulang jauh lebih peka dibandingkan dengan pembedahan darah (Buttler et.al., 1977, Barua 1983, Hoffman, et al ., 1983; Vallenas et al., 1985)

d. Pengaruh volume darah sampel (Barua , 1983)

Volume darah untuk pembedahan darah bervariasi dan sangat menentukan hasil uji, karena jumlahnya bervariasi antara 0,5 sampai 22 kuman per ml dengan jumlah rata-rata 7,6 kuman per ml. Pengambilan sampel darah antara 5-10 ml dengan penipisan media cair 5 sampai 10 kali dan dengan cara pencampuran yang baik mungkin untuk mencegah pembekuan darah , sehingga organisme

tidak terperangkap dalam bekuan darah dan gagal untuk tumbuh. Selain itu dengan penipisan antimikroba yang terdapat dalam serum juga memungkinkan kuman tumbuh dengan lebih baik. Ternyata jumlah perbandingan darah dan media berpengaruh dalam pertumbuhan kuman, yaitu 8 sampai 10 ml darah, dalam volume media sebesar 35 ml dengan kecepatan isolasi (*isolation rate*) 50 %, sedangkan dalam volume media sebesar 50 ml kecepatan isolasi 80 %,

e. Pengaruh pengobatan pada perbenihan .

Akibat pengaruh pengobatan dengan kloramfenikol pada perbenihan darah, adalah dapat menurunkan sensitivitas perbenihan darah menjadi lebih rendah dibandingkan dengan perbenihan dari aspirasi sumsum tulang (Punjabi, 1981). Pengaruh kloramfenikol pada sel bakteri atau metabolismenya terjadi melalui gangguan di dalam sintesis asam nukleat sel tersebut. Menurut Hornick (1985), hasil pembedahan darah yang positif pada penderita yang belum mendapat pengobatan terentang antara 60%-70%, sedangkan yang sudah menerima pengobatan hasilnya kurang dari angka tersebut yaitu hanya sekitar 40%. Hasil yang diperoleh di Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. Sutomo, Surabaya menurut catatan tahun 1981, 1982 dan 1992 ternyata sangat rendah, yaitu kurang dari 6 % (Hartini, 1995). Kemungkinan hal ini disebabkan oleh karena penderita sudah menerima pengobatan antimikroba atau pengambilan darah dilakukan di luar kurun waktu bakteremia. Selain itu mungkin ada faktor-faktor lain seperti tanggapan imun (*immune response*) yang menghambat isolasi dari mikro-organisme penyebab, atau teknik perbenihan yang dipakai kurang memenuhi syarat standar yang diperlukan

f. Pengaruh cara pengambilan sampel,

Pemeriksaan darah utuh (*whole blood*) lebih peka dibandingkan dengan perbenihan yang menggunakan darah beku, yaitu cara yang masih dipakai oleh beberapa laboratorium (Hartini, 1995). Bahkan ada pula bahan media yang bersifat bakterisid, sehingga dapat menghambat pertumbuhan *S.typhi*. Pengaruh antikoagulan streptokinase dan liquoid memperbaiki hasil perbenihan. Selain sebagai antikoagulan pengaruhnya juga untuk menetralkan pengaruh faktor antibakteri dalam serum penderita (Finegold, 1982). Perbenihan dari luahan (sekret) usus (*duodenal string capsule*) juga memberikan hasil lebih peka dan khas daripada dengan darah, sebab mikroorganisme berada dan berkembang biak di dalam kantung empedu. (Hoffman, et al, 1983) Vallenias et al., (1985) melakukan perbandingan perbenihan antara cara *string capsule*, usap dubur (*rectal swab*), darah, dan sumsum tulang serta mendapatkan hasil positif berturut-turut sebesar 42 %, 65 %, 44 % dan 84 % Pada anak-anak umur 2 sampai 6 tahun cara perbenihan *string capsule* hanya memberi keuntungan yang kecil saja, sedangkan perbenihan tinja pada anak lebih menguntungkan dibandingkan dengan yang dilakukan pada orang dewasa (Hoffman ,et al., 1983).

Pemeriksaan perbenihan melalui aspirasi sumsum tulang memberikan hasil mendekati 100 %, sebab di daerah tersebut mikroorganisme dapat hidup lebih lama daripada dalam darah dan sukar dijangkau oleh obat antimikroba. Walaupun demikian kedua cara tersebut di atas kurang menyenangkan bagi penderita (Gilman, 1979; Barua 1983; Hoffman et al., 1983, 1986). Untuk menentukan diagnosis, pengambilan sampel darah harus dilakukan berulang kali

sedangkan hasil yang diperoleh kurang memuaskan. Hal tersebut menyebabkan rawat inap penderita bertambah lama dan meningkatkan beban biaya bagi penderita.

Hasil perbenihan berbeda-beda, menurut Rocha et al.,(1971) dan Escamilla et al.,(1984), dengan media empedu cair memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan media TSB maupun dengan gumpalan darah dalam empedu. Rubin et al.,(1990) melaporkan, bahwa perbenihan sampel penderita tifoid dari fraksi sel mononuklir dapat memperpendek waktu isolasi mikroorganismenya, yaitu menjadi hanya 18 jam dan selanjutnya diidentifikasi selama 10 menit dengan cara ko-aglutinasi, sedangkan dengan cara konvensional diperlukan waktu 3 hari atau lebih.

2.8.2.2 Masalah penetapan dan penentuan diagnosis melalui pemeriksaan antibodi penderita dengan dugaan demam tifoid

Pemeriksaan serologis bergantung kepada respon imun humoral dan seluler. Pada penderita yang sudah mendapatkan pengobatan antibiotika atau kemoterapeutika, jumlah mikroorganismenya akan menurun sehingga rangsangan untuk membangkitkan respon imun humoral menurun dan mempengaruhi pembentukan antibodi. Mengingat hal tersebut di atas, perlu diteliti lebih lanjut tentang peran antibodi terhadap bagian dari sel *S. typhi*. Manakah yang paling khas dan peka dalam membantu menegakkan diagnosis demam tifoid. Selain kepekaan dan kekhasan hasil pemeriksaan perlu juga diteliti cara manakah yang paling mudah (kepraktisannya) dan murah. Cara pemeriksaan antibodi kurang spesifik terutama bila penderita berasal dari daerah endemis. Selain itu juga tergantung kepada antigen yang khas, sebab kemungkinan terjadi reaksi silang dengan entero patogen

yang lain. Pemeriksaan kekebalan seluler sukar dan kurang khas, dan juga ada kemungkinan entero patogen yang lain akan memberikan reaksi yang sama.

2.8.2.3 Cara aglutinasi

1. Pemeriksaan Widal

Pemeriksaan Widal adalah cara penentuan antibodi terhadap *S. typhi* yang umumnya digunakan untuk membantu menegakkan diagnosis demam tifoid, sebelum *S. typhi* dapat diisolasi. Cara penanganannya sangat sederhana, demikian pula cara pembuatannya sehingga dengan menggunakan cara tersebut biayanya menjadi sangat murah. Sayangnya hal tersebut kurang berarti bagi daerah endemis karena uji Widal memberikan nilai diagnosis yang rendah. Diagnosis yang bernilai rendah tersebut disebabkan oleh karena pada beberapa orang yang diduga sehat, didapatkan nilai yang tidak berbeda dengan orang yang menderita demam tifoid. Menurut Lingga dan Sutedjo (1964) titer uji Widal di atas 200 mempunyai nilai diagnostik untuk penderita anak-anak.

Faktor lain yang dapat mempengaruhi titer uji Widal (Reynolds et al.,1970; Protel et al.,1971;Juwono,1981; Rockhill et al.,1981; Pang et al., 1983,1989, dan Prihatini et al.,1989) adalah seperti berikut:

- a) Titer dasar uji Widal di daerah endemis berbeda-beda tergantung angka kesakitan di daerah tersebut, dan tanggap imun (*immune reponse*) seseorang. Di daerah endemis diagnosis demam tifoid pada anak di bawah 10 tahun dapat ditegakkan melalui uji Widal, sedangkan titer lebih

- tinggi didapatkan pada orang dewasa di daerah non-endemis (Senewiratne, 1977; Levin et al., 1978; Rockhill et al., 1981),
- b) Uji Widal peka tapi tidak khas apabila terdapat reaksi silang dengan *Salmonella spp* lain atau patogen enterik lain (Schroeder, 1968; Rockhill, 1981). Dari penelitian Ewings (1962), Reynolds et al. (1970), Pang et al. (1989) ditemukan beberapa infeksi strain *Salmonella spp.* (*S. enteridis*, *S. blockley*, *S. typhimurium*) yang dapat memberi nilai uji Widal positif palsu).
 - c) Nilai diagnosis uji Widal menurun tajam jika batas titer yang berarti melebar,
 - d) Uji Widal di Indonesia tidak peka dan khas dan oleh karena itu penggunaan dalam diagnosis demam tifoid harus dilakukan dengan hati-hati, sebab sesudah vaksinasi TAB kesimpulan dari hasil uji Widal sukar diambil, (Hardi et al 1992)
 - e) Pemberian obat antibiotika mungkin mempengaruhi titer uji Widal, seperti kejadian menurunnya titer O, (Hornick, 1985)
 - f) Pembakuan hasil uji Widal dari berbagai daerah atau laboratorium tidak sama karena pembuatan antigen tidak berdasarkan pembakuan pokok (standar), sehingga menyulitkan pembuatan kesimpulan hasilnya (Schroeder, 1968),
 - g) Kemungkinan titer O dan H pada penderita tifoid terdapat kenaikan 79,9%, uji Widal dapat digunakan pada minggu pertama saat sakit,

- h) Tidak terdapat korelasi antara hasil perbenihan darah dengan uji Widal pada pemeriksaan penderita di laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr.Sutomo, Surabaya (Prihatini, et al. 1989)
- i) Uji Widal tunggal tidak dapat digunakan untuk menegakkan diagnosis demam tifoid, tetapi makna hasil dapat disimpulkan sebagai penyebab karena pengetahuan hal tersebut terbatas. Uji Widal dapat membantu diagnosis demam tifoid untuk usia muda dan kurang mendukung untuk usia dewasa di daerah endemis (Levine et al, 1986; Supardi et al., 1986; Buck et al., 1987),
- j) Menurut Freter (1980) hasil uji Widal tergantung kepada letak geografis dan metode yang digunakan di masing-masing laboratorium, terdapat faktor rematoid yang mempengaruhi reaksi kompleks imun dan penafsiran hasil uji Widalnya (Sarma, 1978, Rajagopalan et al., 1982),

2. Cara hemaglutinasi.

Cara hemaglutinasi dibandingkan dengan uji Widal lebih praktis, sederhana dan hasilnya dapat diperoleh dengan cepat. Selain itu hasil pemeriksaan juga lebih peka untuk antigen O, tetapi kurang terhadap antigen H (Coovadia et al., 1986)

3. Cara Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay)

Cara Elisa lebih peka dan khas dibandingkan dengan cara Widal Seperti yang ditemukan pada penelitian Listiyani (1994), dapat diketahui bahwa derajat kekhasan hasil uji Elisa tergantung kepada antigen *S. typhi* yang digunakan untuk mendeteksi antibodi yang akan ditentukan. Dengan antigen lipopolisakarida derajat kepekaan untuk IgG sebesar 95,3 % dan untuk IgM

sebesar 92,5%, sedangkan derajat kekhasan untuk IgG adalah 98,2% dan untuk IgM 94,4 %. Handojo (1995) dengan cara sama memperoleh hasil kepekaan sebesar 93,1 % untuk IgG dan hanya 69 % untuk IgM. Perbedaan kepekaan antara IgG dan IgM ternyata bermakna ($p < 0,05$).

Rodrigues et al., (1993) memperoleh kepekaan dan kekhasan sebesar 100 % pada penderita dengan biakan darah positif untuk pemeriksaan antibodi terhadap porin atau protein membran luar (outer membrane protein).

4. Cara imunodot (*typhi dot*)

Sukosol et al., (1994) menemukan bahwa antigen 52 kDa yang terdapat pada flagellin *S. typhi*, merupakan antigen yang amat khas (98 %), tetapi kepekaannya rendah 53,5 %. Menurut Ismail (1991) antigen 50 kDa yang terdapat dalam Omp antigen *S.typhi* adalah paling khas dan kepekaannya cukup tinggi yaitu sebesar 95 - 100 % pada penderita demam tifoid dengan perbenihan positif.

2.8.2.4 Pemeriksaan serologis untuk melacak antigen *S. typhi*

Menurut Tsang (1991) diagnosis dini dan cepat dari spesimen klinis dapat ditentukan melalui deteksi antigen *S. typhi*. Berbagai sasaran antigen yang dilacak antara lain O, H dan antigen Vi *S. typhi*. Selain itu peneliti lain (Apsakij, 1987) menentukan antigen sasaran dengan antisera poliklonal 9-0, d-H dan antisera antigen Vi; atau menggunakan *hyperimmune serum* yang dibuat dari sel utuh *S. typhi*. Kebanyakan para peneliti (Ekpo et al., 1990; Singh, 1995) menggunakan antibodi monoklonal dari 9-0 dan d-H untuk menentukan antigen *S. typhi*.

Rockhill et al.,(1980) memakai cara ko-aglutinasi selama 18 jam dengan menggunakan protein A dari *S.aureus Cowan I* untuk mengikat IgG anti-antigen Vi dari *S.typhi* dapat menentukan antigen *Salmonella C₁*. Pada air seni penderita demam tifoid, D dan Vi mempunyai derajat kepekaan 97% dan kekhasannya 83 %.

Wong (1991) menentukan antigen *S. typhi* melalui cara aglutinasi lateks yang dilapisi antibodi monoklonal IgM *Salmonella* 0-9 dan diperoleh hasil dalam waktu hanya 1 menit dengan kepekaan sebesar 87,5-100 % dan kekhasan sebesar 97,8-100%.

Qadri (1990) menentukan antigen *S. typhi* melalui teknik *Elisa double antibody sandwich (EDAS)* pada sampel plasma dan mendapatkan korelasi 100 % dengan biakan darah penderita yang positif .

Chaicumpa (1988) menentukan antigen *S. typhi* melalui teknik *EDAS* dan mendapatkan hasil kepekaan sebesar 65 % dan kekhasan sebesar 100 % pada satu kali pemeriksaan air seni penderita . Selanjutnya Chaicumpa (1992) juga melaporkan hasil penelitiannya dengan *dot enzyme immunoassay* untuk melacak antigen *S. typhi* dalam air seni.

Hasil pelaporan yang dilakukan oleh peneliti-peneliti tersebut di atas mempunyai perbedaan yang besar. Hal tersebut kemungkinan dipengaruhi oleh perbedaan:

1. Antigen sasaran yang ditentukan (antigen O,H, atau Vi, *crude antigen protein*);
2. Cara penentuan antigen (koaglutinasi, CIE, ELISA);
3. Jenis antibodi yang digunakan, yaitu apakah monoklonal atau poliklonal;
4. Bahan sampel yang digunakan: apakah serum,plasma, atau air seni;

5. Waktu pengambilan sampel, apakah pada awal, atau stadium lanjut dari perjalanan sakitnya;
6. Peredaran dan pembersihan (*clearance*) antigen *S. typhi* dalam tubuh penderita;
7. Faktor kompleks imun selama berlangsungnya infeksi, kemungkinan dapat mempengaruhi pelacakan antigen *S. typhi*;
8. Pembakuan cara pelacakan (*methods*) dan sebagian reagen yang dipakai perlu dibakukan.

Pada tabel. 2.1 terdapat beberapa hasil kepekaan terhadap penentuan antigen *S.typhi*. Dari spesimen yang berbeda-beda , ternyata terlihat :

Tabel 2.1 Diagnosis demam tifoid melalui penentuan antigen (dikutip dari Tsang and Chau, 1992)

Sasaran anti-gen <i>S. typhi</i>	Cara Menemukan	Spesimen	Kepekaan	Kekhasan	Rujukan pustaka
<u>Dengan menggunakan antisera poliklonal:</u>					
Antigen tak murni (crude)	CIE	Serum	92%	100 %	Gupta & Rao, 1979
Antigen tak murni (crude)	CIE	serum	25%	?	Sundararaj, 1983
Antigen tak murni (crude)	CIE	serum	5.7%	?	
O,H& Vi,	COAG	serum	81%	96 %	Shatty, 1985
Vi,	COAG	air seni	97%	83 %	Rockhill, 1980
Vi	COAG	air seni	87%	92 %	West, 1989
Vi	ELISA	air seni	62%	52 %	Taylor, 1983
Vi	COAG	air seni	34%	54 %	
Barber's protein Antigen (s)	Elisa	serum	84%	88 %	Appassakij et.al, 1987
<u>Menggunakan antibodi murin Monoklonal:</u>					
AntigenTy-9	ELISA	air seni plasma	65% High back-ground Unsatisfactory	100 %	Chaicumpa et al. 1988
AntigenFlagella d-H	ELISA	serum	96%	92 %	Sadallah et.al., 1990

* COAG = Coagglutination

2.8.2.5. Diagnosis demam tifoid melalui teknik DNA

1. Pelacak (*probe*) asam nukleat

Pelacak suatu sintetik oligonukleotida yang berlabel enzim, substrat antigen, *chemiluminescent moiety* atau radioisotop yang dapat mengikat dengan spesifitas tinggi urutan asam nukleat yang komplementer. Pelacak DNA dapat digunakan untuk mengidentifikasi bermacam bakteri patogen, virus, jamur, parasit dan cacing patogen (Tenover dan Unger, 1993).

Rubin et al. (1985, 1988) melakukan pemeriksaan penemuan DNA berdasarkan cara pelacak DNA sebagai dasar untuk menemukan *S. typhi* dengan sasaran lokus *viaB* dari gen *Vi*. Pada penelitiannya digunakan pelacak DNA yang khas untuk gen *Vi* dan juga untuk gen *d-H (flagellin)* *S. typhi*. Setelah pertumbuhan dalam nutrient agar dengan cara ini dapat ditemukan DNA tifoid dalam 13, sedangkan perbenihan darah memberikan hasil perbenihan positifnya pada 17 dari 32 penderita demam tifoid (53%). Manfaat penelitian tersebut digunakan sebagai cara menemukan *S. typhi* di dalam darah penderita tifoid. Cara-cara hibridisasi dalam menangani penentuan yang khusus masih belum merupakan cara yang sempurna.

Rubin et al. (1992) melakukan pemeriksaan dengan menggunakan pelacak DNA terhadap gen *Vi* untuk melakukan identifikasi *S. typhi* dalam darah penderita demam tifoid dan penderita pembawa penyakit menahun (*chronic carrier*). Keuntungan cara tersebut adalah terdapat cukup kepekaan, spesifik, waktu pengenalan lebih singkat, tidak dipengaruhi oleh pemberian antibiotika, kepekaan teknik sama dengan perbenihan sumsum tulang. Pemeriksaan dengan pelacak DNA dapat menemukan *S. typhi* pada 28 dari 29 penderita tifoid (97%) sedangkan

dengan cara perbenihan darah hanya ditemukan sebesar 23 (79%) di antara 29 penderita. Cara tersebut tidak berbahaya, karena tidak memakai bahan radio aktif. Namun untuk negara berkembang, cara pemeriksaan tersebut biayanya masih cukup mahal .

Pemeriksaan seperti itu dapat digunakan sebagai pengganti pemeriksaan perbenihan apabila dengan cara biasa sukar untuk mengisolasi kuman penyebabnya. Meskipun biayanya mahal tetapi dapat mengurangi biaya rawat inap, karena penderita segera dapat diketahui secara dini diagnosisnya. Dengan demikian pengobatannya dapat ditentukan secara lebih awal dan tepat. Selain itu dapat pula dipakai sebagai salah satu cara pencegahan, terutama untuk menemukan pembawa penyakit (*carrier*). Pelacak dapat digunakan untuk mengenali bakteri yang khas dan dikembangkan dalam penyaringan masal melalui restriksi genom fragmen DNA. Pelacak DNA yang khas untuk *Salmonella spp* telah dikembangkan oleh beberapa peneliti. Masing-masing pelacak terdiri dari satu atau lebih fragmen genom DNA yang khas dimiliki genom DNA *Salmonella spp*. (Tompkins et al 1986; Goppo et al 1988). Untuk penentuan pilihan bakteri sasaran diperlukan waktu sekitar 18-48 jam (Swaminathan et al., 1994). Cara pelacak DNA lengkapnya memerlukan waktu paling sedikit 3 hari. Cara tersebut termasuk pelabelan pelacak (*probe labelling*), *slot blot*, hibridisasi dan marka untuk penentuannya.

Dalam perkembangan pemeriksaan pelacak DNA untuk diagnosis demam tifoid dan pelacakan pembawa penyakit belum didapatkan kemajuan yang berarti. Keterbatasan deteksi cara pelacak DNA yaitu perlu sedikitnya 500 bakteri / ml darah, padahal kadar bakteri pada penderita demam tifoid sekitar 10 -15 bakteri /

ml darah (Pang, 1995). Jadi cara pelacak DNA masih kurang cepat dan peka untuk diagnosis demam tifoid (Tsang and Chau, 1992)

2. PCR (*polymerase chain reaction*) atau amplifikasi DNA

Uji PCR adalah suatu cara pemeriksaan untuk mengamplifikasi sasaran urutan asam nukleat yang dikenalkan oleh Saiki (1985). PCR membutuhkan enzim polimerase termostabil untuk menghasilkan salinan ganda (*multiple copies*) dari regio asam nukleat yang spesifik secara cepat dan eksponensial, termasuk regio DNA yang tidak seperti bagian gen. Manfaat untuk diagnostik, yaitu memberikan gambaran sederhana dari hasil PCR dengan ukuran yang karakteristik sebagai indikasi didapatnya urutan sasaran DNA dari sampel asli. (Towner dan Coykane, 1993).

2.1 Prinsip dasar PCR

PCR adalah suatu cara amplifikasi eksponensial yang selektif terhadap fragmen DNA tertentu. Amplifikasi dilakukan dengan enzim polimerase DNA termostabil, sepasang primer oligonukleotida dan empat *deoxyribonucleoside triphosphatase* (dNTP) baku (standar) yang tergabung (*incorporated*) dalam DNA yang baru disintesis. Reaksi spesifik di kontrol oleh untai oligonukleotida DNA dan direplikasi langsung dari *intervening* regio. Reaksi terjadi secara eksponensial dan urutan sasaran asli diamplifikasi dalam jutaan kali atau lebih dalam beberapa jam saja.

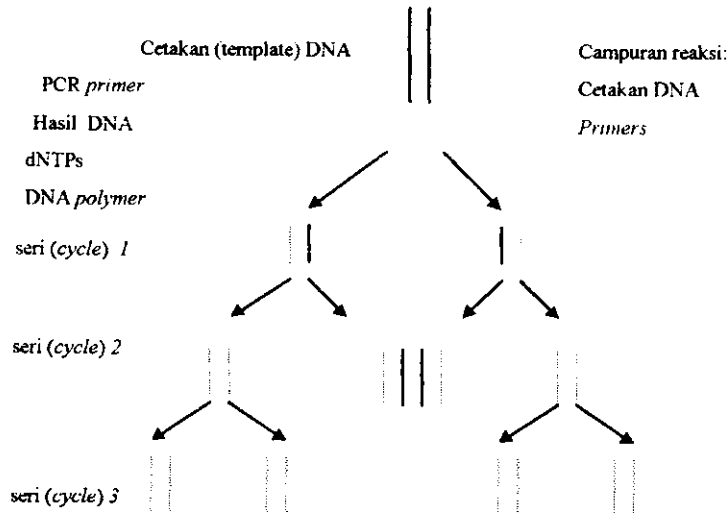
2.2 Pengenalan dasar dan konsep PCR (Stackebrandt et al., 1991; Rolf et al., 1992; Persing et al., 1993)

Pemeriksaan PCR adalah reaksi untuk amplifikasi gen yang diperkenalkan oleh Saiki et al.(1985) dan Mullis (1985). Menurut Saiki (1988) dan Mullis (1987), PCR menggunakan urutan sasaran primer DNA yang khas. Selain itu cara ini lebih cepat dan sederhana daripada cara hibridisasi langsung serta hanya memerlukan DNA sasaran tunggal (*single target DNA*) yang tidak perlu dimurnikan.

Penggunaan pemeriksaan PCR terutama untuk menentukan penyebab suatu infeksi yang dengan cara biasa sukar ditemukan misalnya bakteri, virus dan jamur. Kepekaan dari pemeriksaan tergantung kepada amplifikasi asam nukleat (*nucleic acid*) dan sasaran primer. Yaitu suatu teknik untuk membuktikan kepekaan pemeriksaan sederhana pada asam nukleat melalui otomatisasi dan tidak menggunakan bahan radio aktif.

Dari cara -cara di atas yang banyak dipakai di laboratorium Biologi Molekuler adalah cara PCR. Cara ini menggunakan ulangan sintesis langsung oligonukleotida DNA yang dilakukan secara *in vitro* terhadap gen sasaran urutan (*sequence*) asam nukleat tertentu. Urutan oligonukleotida ditentukan oleh sasaran asam nukleat yang disintesis untuk sisi aniling dalam untai yang berbeda (*plus minus strand*) dari urutan sasaran DNA. Jarak di ditentukan secara empirik yang tergantung banyak antara primer-primer. Umumnya primer untuk diagnosis yang digunakan berukuran 50 -1500 bp (*base pair*) nukleotida. (Stackebrandt et al.,1991; Rolf et al., 1992; Persing et al., 1993)

2.9 Asas pemeriksaan PCR



Gambar 2.1 Bagan PCR (*polymerase chain reaction*) menggambarkan 3 siklus Reaksinya melalui tiga tingkatan : (dikutip dari Stackebrandt dan Goodfellow, 1991,p179)

- Mencairkan dan memisah-kan sampel dupleks DNA.
- Aniling (perlekatan) dari kedua primer yang berlawanan dengan untai DNA.
- Ekstensi dari primer oleh enzim DNA *polymerase* menghasilkan turunan gen.

Kekhasan reaksi PCR ditentukan oleh primer oligonukleotida yang melakukan hibridisasi terhadap lawan untai DNA sasaran dan secara langsung menghasilkan replikasi dari daerah yang bersangkutan (*intervening region*). Cara reaksi PCR sederhana yaitu sintesis DNA diarahkan oleh primer (*primer directed DNA synthesis*) dengan proses secara berulang - ulang dalam 30-40 seri (siklus). Pada beberapa jam sasaran amplifikasi menghasilkan DNA berlipat juta atau lebih (lihat bagan pada gambar 2. 1).

PCR adalah mutlak dalam reaksi enzimatik untuk membuat banyak cetakan segmen DNA yang khas. Proses amplifikasi ini memerlukan primer oligonukleotida, enzim termostabil DNA polimerase (*Taq DNA polymerase* dari *Thermus aquaticus*) dan 4 deoksi-ribo-nukleotida trifosfatase untuk sintesis DNA sasaran. Reaksi PCR berdasarkan pengulangan siklus dengan berbagai tingkatan: **tingkat pertama** denaturasi DNA dengan pemanasan, **tingkat kedua** aniling dari

satu atau dua untaian (*strand*) cetakan (*template*), tingkat ketiga adalah pemanjangan (*extension*) pada ujung 3' dari DNA *polymerase*. Ketiga tingkatan tersebut merupakan satu seri dari reaksi PCR. Oleh sebab akhir 3' dari primer-primer berhadapan satu dengan lain, maka ulangan seri denaturasi, aniling primer dan hasil ekstensi primer menghasilkan akumulasi eksponen dari fragmen terbatas (diskret) yang ujungnya ditentukan oleh OH 5' yaitu akhir dari primer. Amplifikasi eksponen meningkat karena pengembangan produk sintesis seri fungsi "n" sebagai cetakan dalam seri "n+1" Panjang generasi produksi sebanding dengan jumlah panjang dari kedua primer dan jarak dalam daerah sasaran DNA yang terletak pada sisi dari kedua primer. Dengan enzim *Taq* polimerase, PCR berjalan sederhana dengan pemanasan dan pendinginan dari bahan pemeriksaan dan secara mudah dapat diotomatisasi. Dengan program bertingkat melalui pemanasan dan pendinginan bertingkat, suhu tertentu secepat mungkin akan dapat dicapai (Saiki, 1989).

2.9.1 Faktor yang mempengaruhi reaksi PCR

1. Peralatan harus dibakukan, mutu pengendali (kontrol) harus baku,
2. Suhu, waktu dan seri pemanasan (*thermal cycling*)
3. Konsentrasi *Taq* polimerase DNA,
4. Konsentrasi *Deoxynucleotide triphosphatases* (dNTP),
5. Struktur dan jumlah primer,
6. Lapisan minyak dan volume reaksi,
7. Sampel DNA,
8. Besar dan struktur produk amplifikasi,
9. Rencana yang disiapkan.

10. Suhu dan waktu seri pemanasan (thermal cycling)

Parameter seri yang didapat pada seri pemanasan yang sesuai dengan balok logam (*metal block*) (*DNA Thermal Cycler*, *DNA Thermal Cycler 480*, *GeneAmp PCR system 9600*, Perkin Elmer Cetus *Instruments*, USA; *Polychain I*, *Polychain II*, *Polygen FRG*) atau sirkulasi pemanasan air (*Thermocycler 60/1*, *Thermocycler 60/2*, *Biomed*, FRG) dengan tabung reaksi 500 ul (Eppendorf *Safelock*; Perkin Elmer *Gene-Amp*) dengan volume akhir reaksi sebesar 25 - 100 ul .

2.9.2 Awal denaturasi

1. Persiapan

Sebelumnya dilakukan persiapan pemanasan 95 °C 10 menit, waktu yang cukup untuk menghilangkan pengaruh kloroform dan protease. Pemanasan campuran PCR selama 3 - 5 menit pada 95 °C cukup untuk denaturasi kompleks lengkap dari genom DNA , sehingga primer dapat mengadakan aniling sesudah pendinginan. Genom DNA tidak dapat merenaturasi pada siklus pemanasan. Waktu paruh *Taq* DNA polimerase selama 40 menit terjadi pada suhu 95 °C (Gelfand dan White, 1990). Pemanasan merusak DNA meningkatkan pemecahan nukleotida (*misincorporation*) selama PCR berlangsung (Eckert dan Kunkel 1991). Keterbatasan PCR dalam hal pengukuran bagian yang diamplifikasi, yaitu harus mengetahui urutan sasaran DNA. Ukuran terbesar sasaran yang diamplifikasi biasanya sebesar 10 kb dan pada umumnya amplifikasi dilakukan pada segmen DNA yang lebih pendek yaitu dibawah 2 kb.

2. Aniling primer (Rolf's et al., 1992; Persing et al, 1993)

Selama PCR tahap aniling primer merupakan fase dengan suhu terendah. Pelaksanaannya dimulai dengan pemanasan komponen optima, yaitu untuk penentuan PCR dipilih pada suhu aniling. Menurut Ruano (1991), pada siklus pertama analisis PCR dengan genom DNA sebagai cetakan, terlebih dahulu pada primer harus dilakukan penyaringan genomik (*genomic screening*) sampai diperoleh aniling yang sesuai. Kemungkinan dan kekhasan primer aniling tergantung kepada suhu, waktu dan hasil konsentrasi dari sasaran untai tunggal (*single stranded target*). Pada keadaan yang tepat pada seri pertama konsentrasi sasaran meningkat dua kali pada tiap seri dan penurunan jumlah primer relatif tak usah diperhatikan. Kemungkinan berhasilnya aniling karena pada seri pertama ditentukan dengan jumlah sasaran cetakan dan cukupnya waktu penyaringan genom untuk mendapatkan sasaran pada suhu aniling tersebut. Apabila suhu terlalu tinggi aniling tidak terjadi pada semua proses. Bila suhu terlalu rendah, maka aniling tidak khas akan terjadi secara drastis. Semua primer mengadakan aniling pada ujung akhir 3' tanpa mengindahkan aniling khas atau tidak, pemanjangan berakhir pada ujung 3' bahkan pada suhu aniling. Sintesis *Taq polimerase* berlaku pada kadar 24 nukleotida/ detik pada suhu 55° C dan 1,5 nukleotida/ detik pada suhu 37° C. Pada suhu rendah, primer mengadakan hibridisasi pada sisi genom dengan sebagian pengisian tidak termasuk 3' dan tidak dapat digunakan sebagai penyaring. Penentuan suhu optimum dilakukan secara empirik yang kadang-kadang tergantung pada cara isolasi DNA. Suhu

menurut definisi adalah suhu pada keadaan 50% untai lipatan oligonukleotida (*double stranded*) meleleh. PCR baku dilakukan dengan volume 50 atau 100 ul dalam tabung *polypropylene* 0,5 atau 1,5 ml yang mengandung reagen *Buffer* DNA, *MgCl₂*, *deoxyribonucleoside triphosphate* (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan *Taq DNA polymerase*.

2.9.3 Primer Oligonukleotida

Primer Oligonukleotida adalah sepasang primer yang khas untuk pelacak DNA. Pola amplifikasi primer merupakan pasangan primer dari pelacak hibridisasi yang harus ikut berperan. Tiap pasang primer pelacak relatif harus khas untuk sisi ikatannya, bila satu atau kedua pasang primer gagal hibridisasi, maka tidak dapat menghasilkan produk PCR. Bila primer yang mengadakan hibridisasi tidak khas maka produk PCR yang diturunkan dengan hibridisasi tersebut rendah dan menghasilkan amplifikasi yang tidak spesifik. Pemilihan primer yang khas sangat penting, sebab primer menentukan gagal tidaknya reaksi PCR. Biasanya primer berukuran 20 -30 nukleotida dan mempunyai komposisi 50 -60 % G + C. Ukuran tersebut sesuai dengan kekhasan dan ketepatangunaan kerjanya. Perkalian suhu mencair (T_m) dari untai untuk pasangan primer harus seimbang. Menurut Thein dan Wallace (1986) hitungan tersebut mengikuti rumus dikalikan dengan 2 °C untuk A atau T dan 4 °C untuk G dan C tergantung dari amplifikasi T_m di antara 55° dan 80° C.

$$\text{Suhu Wallace } [2^{\circ} \text{Cx} (\text{A} + \text{T}) + 4^{\circ} \text{Cx} (\text{C} + \text{G})]$$

A=Adenine T= Thymine C = Cytosine G = Guanine

Ada beberapa panduan yang dipilih atau dirancang dalam perekaan pasangan primer (Saiki, 1989; Rappaolee, 1990):

1. Dasar dari komposisi primer-primer ini harus seheterogen mungkin. Bahkan campuran dari 4 primer dasar (*base*) terdiri dari *polypurine*, *polypyrimidine* atau lain urutan yang tidak biasa akan ditolak. Sedapat mungkin kandungan GC dari primer sama dengan fragmen yang diamplifikasi.
2. Primer dengan struktur interna sekunder seperti batang jepit rambut halus (*hair pin stem*) tidak dapat digunakan sebab akan menghasilkan pemanjangan primer itu sendiri. Urutan *palindromic* dalam primer ditolak. Program komputer memudahkan memudahkan perekaan (*design*) primer untuk menunjukkan susunan yang sesuai.
3. Primer harus berada dalam bagian yang sangat terpelihara dari spesies genom yang dianalisis dan primer harus khas untuk keluarga sasaran gen.

2.9.4 Keunggulan tehnik dan keuntungan PCR

1. Lama waktu yang digunakan untuk pengenalan penyebab patogen cukup pendek, rata-rata kurang dari 10 jam, (Persing,1993; Hashimoto et al.,1995). Luk (1994) membuktikan dengan kombinasi PCR dan EIA (*enzym immunoassay*), waktu yang diperlukan kira-kira hanya 6 jam.
2. Jumlah spesimen yang diperlukan sedikit tetapi sudah dapat digunakan untuk analisis PCR.
3. Menurut Zhu (1995) daya lacaknya tinggi sampai 29 sel *S.typhi* (0,01pg)
4. Kepekaan dan kekhasan tergantung kepada urutan sasaran (*target sequence*) dari untai molekul (Song et al.1993)
5. Cara cukup sederhana dan praktis (Giovannoni,1991;Persing, 1993),
6. Tidak memerlukan vektor, *cloning*, isolasi plasmid (Rolf,et l,1992).

7. Tidak mengandung bahan radio aktif.
8. Hasil pemeriksaan tidak dipengaruhi pengobatan antibiotika.

Pelaksanaan pembuktian cara sederhana sintesis mutan protein diperoleh dari perubahan cetakan DNA. Menurut Punyabi (1991) pemeriksaan PCR merupakan pendekatan diagnosis suatu penyakit infeksi di masa mendatang yang menunjang pemeriksaan klinis, epidemiologis dan laboratoris. Selain itu PCR merupakan cara yang efektif, cepat dan tepat untuk kepentingan diagnosis penyakit infeksi

2.9.5 PCR dalam diagnosis penyakit menular dan manfaat umumnya

PCR umumnya dapat digunakan sebagai penunjang diagnosis klinis suatu infeksi yang dapat disebabkan antara lain oleh:

1. Bakteri patogen : *M. tuberculosis* , *Vibrio cholerae*, *H. pylori*, *T. pallidum*,
Shigella, *Enteroinvasive E. coli*, *C. trachomatis*,
2. Virus patogen: *Hepatitis virus B*, *Human Immunodeficiency Virus Type I*,
Cytomegalovirus, *Epstein Barr Virus*,
- 3 Parasit patogen: *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium spp.*, *Entamoeba histolytica*,
4. Fungi patogen: *Cryptococcus neoformans*, dan *Pneumocystis carinii*
5. Untuk menemukan agen infeksi yang sukar dibiakkan seperti:
Tropheryma whippelii, *Human herpesvirus*, *M. leprae*, *M. tuberculosis*,
Chlamydia spp, virus,
6. Lokus resistensi antimikroba:
 - a. *Rifampin Resistance Mutations* pada *M. tuberculosis* dan *M. leprae*.
 - b. Mutasi dari *Human Immunodeficiency Virus drug*,
 - c. Penemuan gen tahan terhadap *erythromycin*
 - d. Pengenalan strain / gen yang rentan *methicillin* pada *S. aureus*,

- e. Penemuan strain / gen pembentuk *penicillinase* dan *N. gonorrhoeae*
 - f. Penemuan dan pengenalan gen untuk ekstensi spektrum beta *laktamase*
7. PCR pada penemuan penyakit heriditer
- Penyakit heriditer seperti *thalassemia*, *duchene muscular dystrophy* dapat ditemukan dengan cara PCR berdasarkan informasi genetik maternal dan paternal, penentuan seks kromatin ,
8. Memantau hasil pengobatan kanker: misalnya PCR dapat memantau 1 sel kanker dalam 10^6 sel normal dibandingkan cara *Southern blot* yang hanya mampu menemukan 1 sel kanker dalam 100 sel normal.

2.9.6 PCR dalam diagnosis *Salmonellosis*

Salmonellosis menjadi masalah penyebab enteritis terutama yang berasal dari makanan. Di USA, penyakit *salmonellosis* bila ditinjau dari segi pengobatan dan produksi kerja memerlukan biaya yang tidak sedikit sehingga merugikan negara. PCR berpotensi besar dalam diagnosis *Salmonellosis* dan pencegahan terhadap konsumsi karena makanan atau minuman yang tercemar *Salmonella spp.*, yang disebut terakhir itu merupakan hal yang merugikan negara.

Di negara-negara maju angka kesakitan demam tifoid rendah atau hampir tidak ada, sementara pemeriksaan PCR sudah berkembang terlebih dahulu. Di tempat tersebut banyak ditemukan spesies *Salmonella spp.* antara lain dari makanan ataupun minuman.

Thelfall dan Frost (1990), menyimpulkan bahwa penentuan sidik jari (*fingerprinting*) *Salmonella* secara PCR bermanfaat untuk membedakan strain *Salmonella spp* dengan strain yang lain pada penyelidikan epidemiologi.

Widjoatmodjo et al. (1991) melakukan pemeriksaan dengan *magnetic immuno PCR assay (MIPA)* untuk menemukan *Salmonellae spp* pada sampel tinja. Pelaksanaanya menggunakan antibodi monoklonal dan pemisahan ini memurnikan sel sasaran guna menghindari bahan penghambat PCR dalam tinja. Kepekaan *MIPA* untuk pemeriksaan tinja sebesar 50 cfu dan kepekaan tersebut sama dengan yang didapat pada perbenihan bakteri.

Rahn (1992) mengadakan pemeriksaan PCR untuk menemukan *Salmonellae spp* dengan amplifikasi segmen 284 bp dalam gen *invA*. Gen *invA* adalah salah satu kelompok gen (*invA,B,C,D*) dari *Salmonellae spp* yang memberi sifat kemudahan memasuki sel epitel. Hampir semua strain *Salmonellae* menghasilkan produk amplifikasi sebesar 284 bp kecuali *S. lichfield* dan *S. senftenberg*.

Kantama et al. (1993) melaporkan hasil- hasil penelitian pada kejadian luar biasa akibat infeksi *S. enteritidis* yang berasal dari daging dan telur ayam. Dengan pemeriksaan PCR, ditemukan adanya kenaikan angka kejadian infeksi *S. enteritidis* 1,4% (1990) menjadi 16,7%. (1993)

Cano (1993) menguji saring *Salmonellae* dalam makanan, dengan sasaran DNA untuk segmen PCR 206 bp segmen dari IS200. Cetakan diekstraksi dari bahan makanan atau dilakukan perbenihan. Kemudian hasil PCR segera dipindah dan ditanam pada lempeng berlapis oligonukleotida CovaLink NH untuk hibridisasi fluoresen DNA. Hasilnya dibaca pada *CytoFluor 2300 Fluorescent Measurement System (Millipore)* (FD-PCR). Penemuan dari pemeriksaan tersebut PCR berhasil mengenali sekitar paling rendah sekitar 1 -10 cfu bakteri. Hasil pemeriksaan cara FD-PCR dibandingkan dengan cara perbenihan mempunyai kepekaan 100 %, tetapi kekhasannya hanya 74.3 %. Dengan demikian dapat diambil kesimpulan bahwa

Fluorescent DNA-Based (FD-PCR) dapat digunakan sebagai uji saring terhadap makanan yang tercemar *Salmonellae*.

Doran et.al. (1993) melaporkan diagnosis *Salmonellosis* berdasarkan pelacak DNA dengan sasaran *agfA*, ternyata khas untuk *Salmonella spp.*

Way (1993) menggunakan tiga pasang primer dengan multipleks PCR untuk menemukan *Salmonellae spp* yang bersasaran DNA berdasarkan gen *phoP/phoQ*, *Hin/H2* dan *H-li flagellin*. Kepekaan penemuan 100 cfu sesudah 25 siklus PCR dan 10 cfu sesudah 50 siklus PCR. Multipleks PCR bermanfaat untuk penemuan *Salmonellae spp* dari sampel hewan, makanan dan bahan buangan seperti air dan tanah.

Bej (1994) melakukan pemeriksaan PCR untuk penemuan *Salmonellae spp* dari sampel *oyster* dengan dasar gen *hima* dari *S. typhimurium*. Kepekaan cara tersebut untuk penemuan *Salmonellae spp* dalam *oyster* adalah 1 sampai 10 sel dan dibuktikan bahwa primer mempunyai kekhasan tinggi terhadap *Salmonella spp.*

Kongmuang et al. (1994) meneliti efisiensi tiga macam cara pemeriksaan tinja yaitu sentrifus, pemisahan imunomagnetik (*immunomagnetic separation*) dan pemilihan media untuk perbenihan. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemeriksaan PCR dengan perbenihan semalam adalah cara proses terbaik yang dapat menemukan paling sedikit 10 macam bakteri.

Oleh Pelkonen et al.(1994) dilaporkan bahwa telah ditemukan di dalam daging ayam dan lembu, isolat dari 8 genotip dan 7 genotip salmonella yang berasal dari manusia. Diketahui pula perbedaan antara *Salmonella infantis* dari manusia dan binatang menurut genotipnya.

Pada tabel.2.2 dapat dibaca daftar *Salmonella spp* dan patogen enterik dengan sasaran gen untuk pemeriksaan PCR.

2.9.7 Gen sasaran untuk PCR dalam diagnosis demam tifoid

1. Gen Omp

Gen Omp berasal dari oligonukleotida dari *outer membrane protein S.typhi OmpB* DNA *S. typhi* dipengaruhi oleh gen *ompR* dan *OmpZ*, regio kodenya saling tumpang tindih dengan empat pasangan dasar dan terdiri dari 239 dan 450 asam amino. Kedua asam amino dari *OmpR S. typhi* dan *E. coli* tersebut sama (identik) atau 100 %, dan gen *EnvZ* adalah sebesar 95,3 %. Hanya ada satu residu dari *S. typhi EnvZ* yang berada pada posisi 354, yaitu *Cys* diganti oleh *Gly* yang tidak ditemukan pada *S. typhimurium* dan *E.coli*. Sistem pengatur tanda (*signal transducing sensor*) Gen *EnvZ/OmpR* yang sama dengan yang ditemukan pada *E.coli* dan *S. typhimurium*, tetapi apakah mereka mempunyai fungsi sama masih belum diketahui (Calva and Puente,1995)

2. Gen sifA

Salmonella merangsang filamen gen A (*sifA*) yang terpapar dalam susunan tubulus lisosom. Gen untuk *sifA* dalam *S. typhimurium* intraselular berukuran 1008 bp, berat molekul 38 kD dan mengandung 41 % G (*lycine*) + C(*ystine*). Oligonukleotida ini dapat digunakan untuk amplifikasi isolat *S. typhi*. Dari data Stein 1994) dapat ditunjukkan bahwa gen *sifA* terdapat pada sebagian besar *Salmonella spp* dan *Enterobacter spp*.

Tabel 2.2 Daftar gen *Salmonella* untuk PCR(dikutip dari Zhu, 1995)

Organisme	Sasaran	Rujukan pustaka
<i>E.coli</i> , <i>Salmonella Shigella</i>	<i>lamB</i> gene	Bej.et.al 1991
<i>Salmonella</i>	genusA 469	
<i>Salmonella spp.</i> , <i>Salmonella</i>	<i>agfA</i>	Doran et al,1993
	fragment (in the clone CT)	
	<i>him A</i> gene	Bej.et.al 1994
	<i>SpvR</i> virulence gene	Mahon et.al. 1993
	Segment of IS 200	Baquar,et al,1993;Cano et.al. 1993
	virulence plasmid	Helmuth 1993
	A 2.3.kb <i>Salmonella</i> specific fragment	Aabo et.al.1993
	<i>phoP/phoQ</i> loci , <i>hin/H2</i> and <i>H-li</i> flagellin gene (multiplex PCR)	Way et.al.1993
	origin of DNA replication (Magnetic Immuno PCR Assay),oriC	Widjoatmodjo et.al.1991 and 1992
	<i>flicC</i>	Kilger and Grimont ,1993
	<i>ompC</i>	Pang et al ,1994
<i>Salmonella</i> serogroups (A,B,C2,D)	specific <i>HindIII</i>	Nguyen et al. 1994
<i>Salmonella</i> subspecies I	<i>rfb</i> gene	Luk et al.,1993
<i>Salmonella typhimurium</i>	A 93 bp genetic sequence	Chevier et.al.1995
	<i>invA</i> gene	Rahn et al.,1992
	<i>araC</i> gene ; <i>invE</i> and <i>invA</i>	Stone et.al.,1994
<i>Salmonella typhi</i>	gene <i>sifA</i>	Aksenov et.al. 1994
	<i>rfbS</i> gene	Stein et al.,1995
	<i>rfbE</i> gene	Luk et al.1994
	flagellin gene	Ezaki etal,1995
	ViaB gene	Song et.al.1993;1994
		Hashimoto et.al.1995

3. Gen *rfbS* (tyvelose precursor synthase)

Kelompok Gen *rfb* yang memberi respon biosintesis antigen O dari LPS *Salmonella*, yang menjadi sasaran adalah marka diagnostik molekuler untuk organisme ini. Cloning dan sequencing gen *Salmonella rfb* menampakkan variasi urutan DNA bahan di antara gen antigen O. Dasar dari perbedaan gambaran sidik jari (*finger print*) molekuler boleh dirancang sebagai panel primer-primer (dari) untuk *Salmonella* dan diuji kekhasan primernya di antara variasi serologis (*serovar*) *Salmonella* spp. Kemampuan uji PCR

untuk penemuan *Salmonella* grup serum B, C, D dari tinja penderita. Luk (1994), menemukan hubungan kepekaan sesudah uji PCR pada agarose gel dengan perbenihan bakteri kira-kira 10^3 bakteri.

4. Gen *flagellin*

Song et.al (1993) mengadakan penelitian primer PCR yang berasal dari oligonukleotida sintetik berdasarkan urutan gen flagelin *S. typhi*, yaitu pasangan *ST1, ST2, ST3* dan *ST4*. Dapat disimpulkan dari hasil penelitian tersebut, bahwa PCR dengan *ST1* dan *ST2* lebih khas dibandingkan dengan *ST3* dan *ST4*. Hal tersebut disebabkan *ST1* dan *ST2* sangat khas, hanya dapat menemukan *S. typhi* saja. Sebaliknya *ST3* dan *ST4* kurang khas, karena juga mengamplifikasi DNA dari *S. muenchen* dan *S. typhi*.

5. Gen *ViaB*

Hashimoto et.al (1995), telah merancang primer berdasarkan urutan DNA dari gen antigen Vi dan disebut regio *ViaB*. Primer ini digunakan sebagai dasar diagnosis *S. typhi*. Pada penelitian tersebut diuji 4 pasang primer yaitu *R1, R2, C1* dan *A1*, dan diperiksa manakah di antaranya yang paling khas untuk menemukan *S. typhi*. Hasil yang diperoleh ternyata *R1* lebih khas dibandingkan dengan primer yang lain, yaitu dapat mengamplifikasi *S. typhi* dan *S. paratyphi C*. Primer *C1* mengamplifikasi semua strain dengan antigen Vi positif dan primer *A1* mengamplifikasi semua strain dengan antigen Vi positif kecuali *C. freundii*. Pada penelitian tersebut dapat bahwa hanya primer *R1* yang paling khas dan peka. Cara tersebut dapat digunakan untuk pemeriksaan penemuan *S. typhi* dari semua jenis spesimen klinis sebaik spesimen darah.

6. Gen *phoP*, *Hin*, *H-li*

Oligonukleotida *phoP* spesifik terhadap lokus *phoP/phoQ* yang berasal dari bentuk bakteri koli patogenik seperti *Salmonella spp*, *Shigella*, *E.coli* dan *Citrobacter spp*. Gen tersebut dapat digunakan sebagai perkiraan penunjuk bakteri enterik. Menurut Way et al. (1993) pada penelitian mereka yang dilakukan pada *Salmonella spp*. dengan cara *multiplex PCR*, diperoleh hasil bahwa primer *phoP*, *Hin*, *H-li* dapat menemukan *S.typhi* selain spesies *Salmonella* dan beberapa *Enterobacter spp*. lainnya. Cara tersebut terutama digunakan untuk pemeriksaan air dan tanah guna membedakan cemaran dari *Salmonella spp* dengan non-*Salmonella spp*.

Bagaimana peranan PCR dalam diagnosis demam tifoid?

Uji PCR merupakan teknik penentuan *S. typhi* yang amat khas (Song et al., 1993; Luk, 1994; Hashimoto et al., 1995; Zhu et al. 1996). Teknik amplifikasi DNA menggunakan pasangan primer (oligonukleotida) yang sesuai dengan sasaran DNA dari *S. typhi*.

Frankel (1989) menggunakan PCR untuk amplifikasi *S. typhi* gen *HI-j* (*flagellin*). Gen *HI-j* merupakan derivat gen *HI-d* dengan membuang 261 bp fragmen dari regio sentral. Hasil amplifikasi dari gen *HI-d* dengan primer adalah 1530 bp dan dari gen *HI-j* 1269 bp. Penelitian menunjukkan bahwa strain dengan gen *HI-j* lebih dekat dengan gen *HI-d* dari 25 isolat *S. typhi* dari Jakarta, Indonesia.

Menurut Threfall dan Frost (1990) PCR menguntungkan sebab *S. typhi* tidak membawa plasmid dibandingkan dengan *Salmonella spp*. lainnya. Pemeriksaan PCR untuk diagnosis demam tifoid mulai dikembangkan sejak tahun 1990, terutama di negara-negara Asia karena di daerah tersebut sudah makin sukar

pemakaian antibiotika sebelum pemeriksaan laboratorium atau mungkin ada faktor lain dari agen sendiri atau dari lingkungannya. Menurut Zhu et al. (1995) PCR adalah suatu cara yang peka untuk diagnosis demam tifoid dan dapat digunakan sebagai salah satu cara mencegah penyebaran penyakit yang ditularkan dari makanan.

Chaudry et al. (1995) menyimpulkan bahwa pemeriksaan PCR adalah cepat, peka dan khas untuk mengenali gen dH *flagellin* dari *Salmonella*.

Song et al. (1993) menentukan diagnosis dengan tifoid dengan cara PCR yang menggunakan primer ST3 dan ST4 dengan sasaran gen flagelin. Dua pasang primer diuji dengan *nested* PCR untuk mengamplifikasi fragmen gen flagelin *S.typhi*. Hasil amplifikasi reaksi pertama dengan pasangan primer pertama sebesar 458 bp dan pada reaksi kedua dengan menggunakan primer dalam (*internal primer*) sebesar 343 bp. Hasil PCR tersebut dikonformasi dengan menggunakan α^{32} P untuk menandai pelacak terhadap fragmen 343 bp. Cara *nested* PCR ini dapat melacak 10 organisme *S. typhi* seperti yang ditemukan melalui penipisan DNA dari *S. typhi*. Pada tahun 1994 tidak didapatkan strain dengan gen HI-j di Korea seperti yang diisolasi di Jakarta. David et al. (1991) melaporkan hasil penelitiannya dengan sasaran gen 16SrRNA *S. typhi* untuk amplifikasi. Kepekaan cara PCR adalah 1 pg *S. typhi* dari perbenihan murni. Luk (1994) melakukan penelitian cara PCR *immunoassay* dengan sasaran gen *rfb S. typhi*. Hasil amplifikasi dipindah dalam lempeng mikro dan dikenali dengan Elisa. Daya lacaknya (*detection limit*) adalah 10 sel bakteri.

Hashimoto et al. (1995) menentukan *S. typhi* dengan sasaran gen Vi (ViaB) dengan metode *nested* PCR. Didapatkan kesimpulan bahwa semua *S. typhi* dan juga *S. paratyphi* C memberi hasil positif. Pemeriksaan ini dapat digunakan untuk pemeriksaan *S. typhi* pada tingkatan satu sel (*singel cell level*).

Zhu et al. (1995) menentukan *S. typhi* dengan pemeriksaan PCR mengamplifikasi gen rRNA dan ditemukan sepasang primer yang khas terhadap 54 strain *S. typhi* dari 27 tipe faga yang berbeda. Semua *S. typhi* menunjukkan fragmen 300 bp pada pemeriksaan PCR dengan primer tersebut. Spesies *Salmonella* yang lain tidak menunjukkan 300 bp pada pemeriksaan PCR. Kepekaan pemeriksaan adalah 0,1 pg *S. typhi* murni pada genomik DNA atau kira-kira sama dengan 40 sel pada sampel. Primer yang mengamplifikasi gen rRNA 5S-23S sangat berperan untuk mempercepat diagnosis demam tifoid.

Chevrier et al. (1995) mengembangkan uji dasar PCR untuk mengenali *Salmonella*. Hasil amplifikasi dianalisis dengan hibridisasi *sandwich* dalam *Covalink* lempeng mikro menggunakan dua oligonukleotida. Ikatan oligonukleotida melekat secara kovalen (*covalent linked*) di atas permukaan sumur lempeng mikro. Pengenalan oligonukleotida dilakukan dengan label biotin. Molekul hibrid ditemukan dengan konjugat avidin dan alkalinefosfatase sebagai substrat kromogenik. Sasaran DNA yang dipilih adalah gen *stain S. typhi* yang terlibat dalam penembusan sel Hela. Batasan penemuan adalah kurang dari 10 sel pada setiap reaksi.

2.9.8 Masalah ,batasan PCR dan pemecahannya

1. Ada beberapa masalah yang perlu diperhatikan pada penggunaan uji PCR yaitu:

- a) kesalahan dalam penanganan , teknik amplifikasi yang peka dapat tercemar sehingga memberi hasil positif palsu,
- b) banyak ragam spesimen klinis mengandung komponen yang dapat menghambat PCR, seperti bilirubin, garam empedu , hemoglobin dan heparin,
- c) PCR dalam kebutuhan teknik , spesifik dan yang dapat diulang hasilkan (*reproducible*) sering menghadapi masalah praktis sehari-hari, yaitu PCR tidak dapat membedakan mikroorganisme mati atau hidup karena hasil amplifikasi dari keadaan tersebut tetap ada;
- d) Hasil dievaluasi dengan elektroforese gel berupa pita yang spesifik maupun non-spesifik, tetapi dengan pengamatan mata saja kadang-kadang pita spesifik dan non-spesifik sukar membedakannya.

2. Beberapa cara pemecahannya.

- a. Penggunaan peralatan canggih dan mahal dapat dilakukan dengan bekerja sama antara laboratorium yang menggunakan cara pemeriksaan PCR.
- b. Teknik yang rumit dikerjakan oleh tenaga yang cermat, trampil dan mengetahui dasar pemeriksaan PCR
- c. Semua tahapan dikerjakan sesuai dengan tata cara yang telah dibakukan, dengan menghindari cemaran sekecil mungkin melalui penggunaan ruangan khusus yang tidak tercemar dengan pemeriksaan lain (*laminar flow*).
- d. Dilakukan pemeriksaan PCR dengan pengendalian mutu (*quality control*) yang baik,

- e. Apabila hasil pemeriksaan PCR kurang sensitif dapat dicoba metode *nested* PCR, atau kombinasi dengan *enzym immuno assay*,
- f. Pemeriksaan secara visual dengan menggunakan pelabelan secara radioaktif maupun non radioaktif akan lebih sensitif.

BAB 3

Bab 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Berdasarkan tinjauan pustaka pada artikel-artikel tentang unsur-unsur dalam diagnosis demam tifoid yang dijumpai, maka dapat ditarik simpulan sebagai berikut:

1. Hasil perbenihan *S. typhi* masih tetap sebagai tolok ukur diagnosis pasti demam tifoid,
2. Belum ada kesepakatan mengenai diagnosis demam tifoid berdasarkan uji serologis titer antibodi (Widal) dan uji serologis antigen,
3. Ditemukan beberapa gen pada *S. typhi* yang berperan dalam tanggapan imun, proteksi kuman maupun pada patogenesis demam tifoid.,
4. Terdapat perbedaan pendapat mengenai penafsiran hasil pemeriksaan laboratorium klinik dalam diagnosis demam tifoid untuk daerah non endemis dan daerah endemis, karena bakuan panduan pokok diagnosisnya berbeda ,
5. Belum ada patokan diagnosis laboratoris demam tifoid untuk populasi daerah endemik di Indonesia dengan menggunakan pemeriksaan rutin yang peka dan khas, kecuali lewat pemeriksaan khusus.

Memperhatikan simpulan di atas penulis berpendapat perlu dicari tatacara pemeriksaan lain yang memenuhi kriteria dan persyaratan kepekaan dan kekhasan hasil pemeriksaannya untuk menunjang diagnosis demam tifoid yang lebih menentukan.

3.1.1 Pengertian dan teori diagnosis demam tifoid

Teknik diagnosis demam tifoid yang dipakai selama ini pada umumnya terbatas pada :

1. Hasil isolasi dan temuan kuman penyebab (*Salmonella typhi*) dari darah penderita,
2. Penentuan produk infeksi yaitu antibodi terhadap kuman penyebabnya dalam bentuk uji serologis.

3.1.1.1 Kerangka pengertian diagnosis demam tifoid

Berdasarkan pada keterangan yang diacu dari beberapa artikel tentang diagnosis demam tifoid yang ada, maka dapat disusun kerangka pengertian (konseptual) diagnosis demam tifoid. Kerangka konsep tersebut terdiri dari gabungan beberapa pengertian yang saling berkaitan, yaitu pengertian hasil temuan pada pemeriksaan laboratorik klinis (konvensional) :

- a). pengertian pengisolasian *S. typhi*
- b). pengertian keadaan titer antibodi
- c). pengertian keberadaan antigen

Seperti telah dibahas di Bab 2. penggunaan ketiga cara tersebut di atas masih terbentur faktor-faktor yang banyak berpengaruh pada hasil pemeriksaannya, sehingga perlu dilakukan cara lain yang dapat mengatasi hal tersebut.

Dengan ditemukan teknik pelacak (*probe*) DNA dan PCR, sebagian dari masalah tersebut di atas dapat diselesaikan, sebab dengan teknik ini dapat dihasilkan uji yang amat khas dan peka, maka dapat ditambahkan pengertian hasil temuan pada pemeriksaan laboratorik klinis yang sudah ada:

- d). pengertian pelacak (*probe*) DNA,

e). pengertian amplifikasi DNA yaitu *Polymerase chain reaction (PCR)*,

Pengertian-pengertian tersebut di atas dipakai untuk mendapatkan kepastian diagnosis demam tifoid yang penjabarannya adalah sebagai berikut.

ad a. Pengertian pengisolasian *S. typhi*

Definisi pengisolasian kuman(Barua.1983; Escamilla et al. 1984; Hornick,1985; Tsang&Chau,1992; Sariff et al,1992; Choo et al.1992; Boekitwetan dan Tjaniadi et al. 1992): yaitu penemuan kuman *S. typhi* berdasarkan pemeriksaan perbenihan darah , sumsum tulang, tinja, dan air seni (*urine*). Hal-hal yang berkaitan dengan pengisolasian kuman meliputi : teknik pengambilan sampel, fase perjalanan penyakit, dan ada tidaknya bakteremia (Johnson et al 1966; Hornick et al, 1970; Gilman et al,1975; Laosombat, 1983; Washington & Ilstrup,1983).

Pada teknik pengambilan sampel tercakup masalah jenis terokan yang diambil, dan waktu pengambilan (Finegold et al,1982; Barua 1983,Koneman et al.,1988; Baron et al.,1994; Rubin,1990).

Penentuan diagnosis demam tifoid dengan ditemukannya isolat kuman *S. typhi* sampai dewasa ini, masih merupakan cara yang terbaik karena dapat memastikan diagnosis. Walaupun demikian, hal tersebut tidak selalu dapat dicapai terutama bila dipakai cara perbenihan, karena diperlukan jumlah kuman yang banyak dan hidup bila diinginkan mencapai hasil pertumbuhan kuman positif. Di samping itu perlu waktu pengeraman yang lama.

ad b. Pengertian keadaan titer antibodi

Definisi titer antibodi adalah harga kebalikan dari pengenceran serum tertinggi yang masih memberi hasil yang positif (Sarasombath et al.,1984, Hardi et

al., 1992, Supardi, 1992, Choo et al., 1992; Ismail et al., 1992; Ong et al. 1992; Wong, 1992). Hal-hal yang terkait dengan keadaan titer antibodi meliputi: teknik pengambilan sampel, lingkungan endemik /non-endemik, dan ketepatan pilihan bahan pemroses sampel (Sangpetchsong, et al. 1980).

Dalam teknik pengambilan sampel mencakup persyaratan keadaan penderita seperti:

- (1). adakah penderita minum antibiotika ?
- (2). apakah saat pengambilan terokan pada waktu penderita sedang sakit atau telah sembuh ? (Sarma, 1977, Mabel & Paniker, 1979).

Dengan demikian diagnosis demam tifoid dapat dilakukan menurut acuan daerah endemik atau nonendemik dan ketepatan pemrosesan sampel, karena dapat menunjukkan keadaan titer antibodi terhadap *S. typhi*, sehingga diagnosis dapat dipastikan dengan adanya kenaikan titer antibodi. Kekhasan hasil pemeriksaan sangat tergantung pada kemurnian antigen yang dipakai dan tanggapan kekebalan penderitanya.

Memperhatikan perihal di atas, maka cara uji titer antibodi walaupun dapat meningkatkan kepekaan tetapi sifatnya hanya menunjang diagnosis penyakitnya.

ad c. Pengertian kehadiran antigen

Definisi kehadiran antigen yaitu ditemukannya antigen *S. typhi* dalam darah dan ekskreta penderita demam tifoid (Barber & Eylan, 1976, Espersen, et al, 1980, Rockhill et al. 1980, Shetty et al. 1985, Mekara et. al, 1990,). Hal-hal yang berkaitan dengan kehadiran antigen adalah pada teknik pengambilan sampel yang mencakup persyaratan penderita, seperti perbedaan keadaan penderita saat pengambilan darah di daerah endemik / non -endemik dan /atau penderita telah minum / tidak minum

antibiotika sebelumnya (Rockhill, et al. 1980, Taylor, et al., 1983, Appassakij et al. 1987, Chaicumpa et al., 1988 West et al., 1989)

Dengan demikian demam tifoid dapat dipastikan diagnosis nya menurut acuan adanya antigen khusus untuk *S. typhi*.

ad d. Pengertian pelacak (*probe*) DNA

Definisi pelacak DNA (Gopo et al 1988, Tompkins, et al. 1986; Rubin, et al., 1990). Pelacak DNA adalah sederetan asam nukleat untai tunggal berlabel yang dapat melakukan hibridisasi pada untai pasangannya dengan cara berikatan pada basa asam nukleat. Hal-hal yang berkaitan dengan pelacak PCR ialah teknik pengambilan sampel, proses ekstraksi DNA, sehingga amat spesifik walaupun demikian pelacak (*probe*) DNA ini kepekaannya terbatas, sebab urutan DNA yang akan ditentukan mungkin hanya terdapat dalam jumlah salinan (*copy*) yang terlalu rendah untuk dilacak. Ini sudah tentu tergantung juga pada jumlah kuman yang berada dalam tubuh penderita (paling sedikit 10^4 - 10^5 bakteri). Jadi penentuan diagnosis dengan pelacak DNA masih disangsikan penerapannya untuk kepentingan dengan pelacak DNA masih disangsikan penerapannya untuk kepentingan diagnosis demam tifoid. (Tsang & Chau, 1992; Swaminathan, 1994)

Persamaan dan perbedaan PCR dan Pencarian Antigen

Persamaan

1. Tidak dipengaruhi pemberian antibiotika / kemoterapeutika
2. Tidak dapat membedakan antara kuman yang hidup dengan yang mati
3. Pengambilan sampel pada saat masih ada DNA kuman / pecahan Ag yang dicari.
4. Diperlukan teknik optimasi / pembakuan teknik yang diperlukan.

Perbedaannya**PCR:**

1. Ada amplifikasi DNA
↓
amat sensitif
2. Penentuan DNA
↓
amat spesifik

Penentuan Antigen:

1. Tidak ada amplifikasi Antigen
↓
kurang sensitif
2. Bagian tubuh kuman yang lain
→ (bukan DNA) kurang spesifik

Melalui cara PCR mampu menemukan kelompok sel dalam ukuran yang sangat kecil yaitu, 1 - 10 sel. Dengan demikian, maka uji PCR dapat dipakai untuk menentukan penyebab penyakit.

ad e. Pengertian amplifikasi dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR)

Definisi teknik PCR (*polymerase chain reaction*) (Stackebrandt & Goodfellow, 1991; Rolfs, et al. 1992; Persing, et al. 1993; Towner & Cockayne, 1993) adalah suatu cara amplifikasi sasaran segmen DNA dengan sintetik oligonukleotida dengan katalisator enzim polymerase yang mampu menyalin (*copy*) jutaan kali lebih dalam beberapa jam, sehingga dalam waktu singkat dapat dilacak DNA yang dicari (Saiki, 1985). Hal-hal yang berkaitan dengan teknik PCR ialah teknik pengambilan sampel, proses ekstraksi DNA, perekaan primer (primer design) dan deteksi produk PCR.

3.1.1.2 Kesimpulan pengertian dan teori diagnosis demam tifoid

Berdasarkan hubungan antara pengertian dan memperhatikan perumusan pengertian (konsep) tersebut di atas, maka dari pengertian dan teori diagnosis demam tifoid dapat disimpulkan bahwa ketiga unsur tersebut saling berkaitan dalam menunjang diagnosis demam tifoid. Jelasnya penderita dinyatakan mengidap

penyakit tifoid melalui pemeriksaan laboratorium perbenihan darah atau ekskreta, penemuan antigen atau penentuan titer antibodi bila diketahui ciri :

- a). ada temuan isolat *S. typhi* dalam darah, berarti penderita mengalami demam tifoid, sedangkan bila ditemukan hanya ekskreta saja dianggap sebagai pembawa *S. typhi (carrier)*;
- b). ditemukan antigen dalam darah atau ekskreta dalam hasil pemeriksaan,
- c). perubahan titer antibodi pada penderita, sebagai penunjang diagnosis demam tifoid.

Memperhatikan perumusan pengertian (konsep) tersebut di atas, maka dapat disimpulkan bahwa yang berperan dalam membantu menegakkan diagnosis demam tifoid adalah unsur pengisolasian kuman yaitu dengan ditemukannya isolat *S. typhi*, keadaan titer antibodi yang menunjukkan kenaikan titer antibodi dan keberadaan antigen penentu. Untuk hal yang terakhir pelaksanaannya memerlukan kriteria dan persyaratan tertentu.

Berdasarkan hubungan antara pengertian pelacak (*probe*) DNA dan PCR tersebut di atas, maka teori diagnosis demam tifoid dapat diuji kebenarannya dengan dua cara terakhir untuk mendapatkan hasil pemeriksaan daerah endemis.

3.1.1.3 Teori diagnosis demam dan bukan (non) demam tifoid

Teori diagnosis yang diperoleh adalah sebagai berikut:

- 1) Demam dinyatakan demam tifoid apabila terdapat gejala demam tifoid pada pemeriksaan laboratorium dengan ditemukan isolat dan satu atau lebih dari ketiga unsur yang telah disebutkan di atas;

- 2) Demam dinyatakan demam bukan tifoid apabila tidak ditemukan isolat atau antigen *S. typhi*, dan dapat ditemukan penyebab dari penyakit yang lain misalnya: *S. paratyphi*, plasmodium, dengue, atau tuberkulosis.
- 3) Bila demam ditemukan dari perbenihan darah hasilnya negatif belum menyingkirkan demam tifoid, sebab kepekaan perbenihan darah hanya 40 % sedangkan perbenihan negatif 60 % .Demam non-tifoid harus dibuktikan ada atau tidak adanya penyebab .

3.1.2 Kerangka teori diagnosis demam tifoid

3.1.2.1. Proposisi dan teori berdasarkan pengertian pengisolasian kuman, keadaan titer antibodi dan adanya antigen.

(1) Proposisi (ungkapan yang dapat dibuktikan benar tidaknya)

Berdasarkan pengertian isolasi kuman, titer antibodi , adanya antigen diperoleh rancangan usulan proposisi yang menyatakan sifat dan hubungan pengertian tersebut dan proposisi tersebut dapat diuji kebenarannya (Singarimbun dan Effendi, 1983).

Dalam hal ini adalah perihal kebenaran teori diagnosis demam tifoid yang berasal dari proposi tersebut di bawah ini.

Proposisi diagnosis nya dapat dinyatakan sebagai berikut:

- a) Ada hubungan pengertian antara ketiga unsur isolasi kuman, adanya antigen dan kenaikan titer antibodi yang menjadikan kepastian diagnosis demam tifoid
- b) Keberhasilan isolasi *S. typhi* ,adanya kenaikan titer antibodi dan ditemukan antigen, menunjukkan ciri penetapan diagnosis demam tifoid.

(2). Teori

Teori yang diperoleh dari proposisi yang diuji tersebut ialah:

- a) Diagnosis demam tifoid dipastikan dengan adanya isolat dan antigen *S.typhi* dan adanya kenaikan titer antibodi terhadap *S. typhi*,
- b) Ciri pemeriksaan laboratoris untuk diagnosis demam tifoid ditentukan adanya isolat dan antigen *S. typhi* dan adanya kenaikan titer antibodi terhadap *S.typhi*.

Berdasarkan proposisi , teori diagnosis demam tifoid tersebut di atas dan fakta yang telah disebutkan di Bab 2, untuk kasus yang berasal dari daerah non endemis dan endemis diagnosis demam tifoid, diperlukan tatacara pemeriksaan yang sesuai untuk daerah tersebut.

3.1.2.2 Proposisi dan teori pelacak (*probe*) DNA dan PCR pada diagnosis demam tifoid

3.1.2.3 Proposisi dan teori berdasarkan pengertian pelacak (*probe*) DNA dan PCR pada diagnosis demam tifoid

(1). Proposisi

- a) Penentuan diagnosis demam tifoid dipastikan dengan ditemukan isolat *S.typhi*,
- b) Isolat dalam darah sukar ditemukan pada perbenihan dalam kadar rendah (di bawah 500 sel ml darah),
- c) Dengan ditemukan metode biomolekuler, maka dengan amplifikasi DNA melalui uji PCR dapat ditemukan isolat yang dengan cara rutin (konvensional) tidak dapat atau sulit ditemukan,

- d) Dengan uji PCR masalah perbedaan hasil titer antibodi untuk daerah endemis dengan nonendemis dapat disingkirkan, sebab uji PCR tidak berkaitan dengan hal tersebut,
- e) Masalah reaksi silang hampir tidak dijumpai karena pada PCR hasil yang diperoleh adalah khas hanya dimiliki oleh *S. typhi* dan hampir tidak dijumpai pada lain spesies, hal ini tergantung pada jenis primer yang dipakai,
- f) Uji PCR tidak dipengaruhi macam sampel yang akan diperiksa dan pembakuan standarnya.

Dengan demikian uji PCR diharapkan dapat mengganti uji penentuan antigen.

(2). Teori

Memperhatikan proposisi tentang pengertian pelacak (*probe*) DNA dan PCR ada diagnosis demam tifoid, maka :

- a) Uji PCR dapat dipakai sebagai pengganti uji titer antibodi, karena tidak dipengaruhi apakah sampel berasal dari daerah endemis dan nonendemis atau tidak. Karena hasil uji PCR (amplifikasi) bernilai sama meskipun diambil dari berbagai macam sampel,
- b) Dengan uji PCR dapat dilakukan amplifikasi molekul sel tunggal DNA yang akan membentuk urutan gen (*sequence*) yang spesifik dan hanya dimiliki oleh kuman penyebab. Karena itu uji PCR dapat menentukan hasil amplifikasi DNA dari suatu penyebab (kuman), terutama bila ditemukan saat sakit,
- c) Uji PCR dapat memperluas / memperbesar untai tunggal DNA yang semula merupakan molekul sel dalam bentuk yang sama dan jumlahnya dapat jutaan,

- d) Untuk kasus di daerah endemis dapat dipastikan uji PCR dapat menggantikan kekurangan yang terdapat pada uji serologis, karena pada pemeriksaan PCR, dapat melacak amplicon (hasil amplifikasi) DNA *S.typhi* saja, tidak dipengaruhi oleh latar belakang perubahan titer antibodi seperti penderita yang berasal dari daerah endemis maupun non endemis, terjadi pada uji titer antibodi dan pada penentuan antigen.

Berdasarkan teori yang disebutkan di atas, maka cara uji ini merupakan suatu cara dini untuk mendiagnosis dengan ketepatan yang tinggi, sebab dalam jumlah kecil sudah dapat ditemukan kuman penyebabnya, sehingga dengan uji PCR diagnosis dini diharapkan dapat segera diketahui dan kemungkinan pengobatan dapat lebih awal. Hal ini sangat bermanfaat bagi penderita.

Pemastian diagnosis itu dimungkinkan karena dengan uji PCR hasil amplifikasi dapat terjadi apabila, pasangan primer yang digunakan serasi dengan gen DNA kuman penyebab yang khas dan peka untuk amplifikasi. Selanjutnya berdasarkan simpulan kerangka pengertian dalam penelitian ini, maka dapat disusun jawaban sementara terhadap masalah diagnosis demam tifoid bagi daerah endemis maupun non-endemis yang dapat diuji kebenarannya berdasarkan fakta empiris yang telah disebutkan di atas.

3.2 Hipotesis

Tujuan penelitian ini diharapkan dapat membuktikan hipotesis yang disimpulkan dari hasil penalaran dan pembahasan dalam kerangka konseptual atau landasan teori hipotesis yang dalam hal ini dapat dinyatakan sebagai berikut:

- 1) Uji PCR *S.typhi* merupakan uji laboratoris yang memiliki nilai diagnostik yang amat andal dalam menegakkan diagnosis demam tifoid.

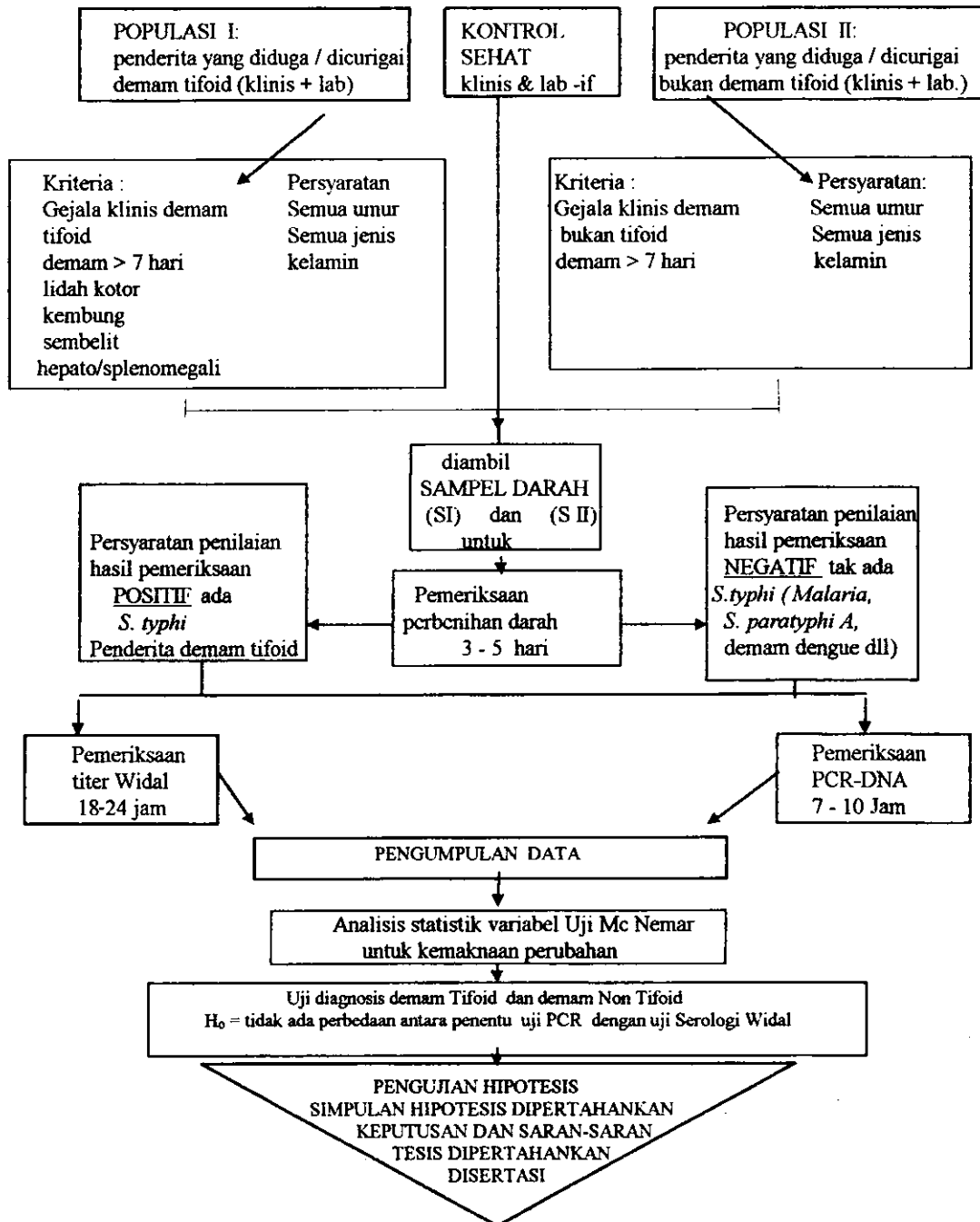
- 2) Uji PCR untuk *S typhi* memiliki kepekaan (sensivitas) dan kekhasan (spesifisitas) diagnostik yang lebih andal secara bermakna daripada uji serologis Widal.

BAB 4

Bab 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan penelitian yang digunakan



Gambar 4.1 Bagan tata kerja tahapan penelitian

4.2 Bahan dan cara penelitian

4.2.1 Populasi penelitian

Populasi penelitian ada dua :

Pertama, populasi penelitian yang terdiri dari penderita yang memenuhi kriteria dan persyaratan sebagai berikut:

Kriteria: Berdasarkan pemeriksaan klinis dan laboratoris penderita:

- a berciri panas lebih dari tujuh hari atau dengan dugaan demam tifoid,
- b terdapat gejala klinis yang mendukung : lidah kotor, perut kembung, sembelit, hati atau limpa membengkak.
- c perbenihan darah *S. typhi* (+)

Populasi ini selanjutnya disebut **Populasi I**.

Kedua, populasi penelitian yang terdiri dari penderita yang memenuhi kriteria dan persyaratan sebagai berikut:

Kriteria: Berdasarkan pemeriksaan klinis dan laboratoris penderita:

- a. berciri panas lebih dari tujuh hari atau dengan dugaan bukan demam tifoid,
- b. terdapat hasil pemeriksaan laboratoris yang mendukung selain *S.typhi* : malaria(+), *S. paratyphi* (+), Dengue blot (+) atau demam lain yang tak diketahui penyebabnya.

Populasi ini selanjutnya disebut **Populasi II**

4.2.2 Sampel penelitian dan kontrol

Sampel yang dipakai berdasarkan persyaratan hasil pemeriksaan:

1. perbenihan darah (empedu) sebagai standar emas , perbenihan *S. typhi* positif,

2. serum sehat (perbenihan darah dan Widal negatif) , sebagai kontrol negatif, terdiri dari sampel penelitian dan kontrol.

4.2.2.1 Bahan sampel penelitian

Sampel penelitian: darah diambil dari populasi I yang diduga demam tifoid dan selanjutnya disebut sampel I; sedangkan populasi II yang diduga bukan demam tifoid disebut sampel II

4.2.2.2 Bahan sampel kontrol

Sampel kontrol: sampel kontrol positif dari penderita demam *tifoid* / genom *S. typhi* dan sampel kontrol negatif dari orang sehat perbenihan dan uji Widal negatif .

4.2.3 Besar sampel

Rumus $d = [P_{\text{pcr}} - P_{\text{biakan}}]$

Diagnosis tifoid: 100 % (perkiraan PCR) 40 % (Hasil perbenihan)

$$d = [P_{\text{pcr}} - P_{\text{biakan}}] \quad 1.00 - 0,4 = 0,6$$

$$\delta_{\text{proporsi}} = P_{\text{pcr}} (1 - P_{\text{biakan}}) \quad \begin{array}{l} Z_{1-1/2\alpha} = 1,96 \\ Z_{1-\beta} = 1,65 \end{array}$$

$$P_{\text{pcr}} = 1.00 \quad P_{\text{biakan}} = 0,4$$

$$\delta_{\text{proporsi}} = P_{\text{pcr}} (1 - P_{\text{biakan}}) = 0,4 \times 0,6 = 0,24$$

$$n = \frac{ \{ (Z_{1-1/2\alpha} + Z_{1-\beta}) \delta_{\text{proporsi}} \}^2 }{d}$$

$$\frac{ \{ 1,96 + 1,65 \} 0,24 }{0,6} = 1,4$$

Jumlah sampel minimal 1,4 penderita

Sampel penderita tifoid 45 ; bukan tifoid 41 *S. paratyphi* (+), malaria (+), DBD (+)

; meragukan 169 . Jumlah sampel keseluruhan 254

4.3. Klasifikasi variabel dan definisi variabel operasional penelitian

4.3.1 Klasifikasi variabel

1. variabel bebas : *S.typhi*
2. variabel tergantung: Hasil pemeriksaan perbenihan darah dan uji Widal dari penderita yang diduga atau dicurigai demam tifoid.
3. variabel perantara : Pejamu yang peka terhadap infeksi demam tifoid.

4.3.2 Definisi variabel operasional pada penelitian

1. Variabel bebas: *S.typhi* , penyebab infeksi demam tifoid berada dalam darah penderita selama sakit dan menghilang setelah sembuh atau menetap di dalam kantung empedu sebagai *carrier* pada penderita yang sudah sembuh.
2. variabel tergantung : hasil pemeriksaan serum atau darah penderita yang diduga demam tifoid sebagai sarana untuk menyimpulkan hasil pemeriksaan atau diagnosis pasti demam tifoid

Konsep penentuan diagnosis demam tifoid dan hubungan variabelnya

Hubungan variasi dalam nilai:

penentuan diagnosis demam tifoid
diagnosis laboratorium

kekhasan dan kepekaan
penentuan *S.typhi*

Variabel:

diagnosis klinis
diagnosis pasti demam tifoid
perbenihan darah *S.typhi* positif
kenaikan titer antibodi terhadap
penentuan DNA *S.typhi*

Persyaratan Hasil Pemeriksaan :

1. Sebagai standar emas digunakan pemeriksaan pembedihan darah (empedu)
2. Kontrol negatif serum sehat (pembedihan darah dan Widal negatif)

4.4. Persiapan bahan atau materi penelitian

Bahan sampel penelitian dipersiapkan dari terokan darah penderita di ruangan menular (infeksi tropik) rumah sakit, poliklinik negeri atau swasta , dan

penderita dokter swasta yang dirawat sebagai demam tifoid, yang dikirim ke UPF Patologi Klinik RSUD dr. Sutomo Surabaya, dan ke *Hospital University*, Kuala Lumpur Malaysia. Demikian pula bahan sampel terokan darah berasal dari orang sehat yang hasil perbenihan dan uji Widalnya negatif.

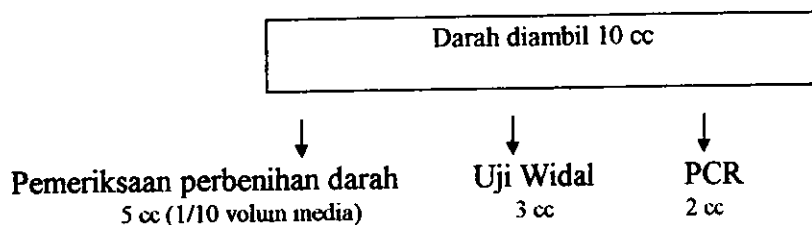
4.5 Alat, instrumen penelitian dan sarana yang terkait

4.5.1 Persiapan sampel

Untuk persiapan sampel diperlukan tenaga kerja yang terdiri dari: tenaga pengambil sampel (para medis), teknisi laboratorium, dan peneliti. Selanjutnya diperlukan bahan dan alat: semperit 10 cc, media *Oxgall*, TSB, agar SS, TSI, LIM, Simon *citrate* dan antisera *S.typhi*., inkubator, pemusing (*centrifuge*), pengering beku (*freeze dryer*), penangas air, pembeku (*freezer*) -20°C

4.5.2 Pengambilan sampel

Untuk pengambilan sampel diperlukan semperit buang sekali pakai (*disposable*) 10 cc, media cair *Oxgall* atau TSB, pengeram (inkubator). Pengambilan dilakukan secara aseptis.



a. Perbenihan darah:

Untuk peralatan perbenihan darah disediakan semprit buang sekali pakai 10 cc untuk pengambilan darah; kapas pentel beralkohol 70 %; inkubator atau alat pengeraman; media transport: *Oxgall*, TSB (*trypticase soy broth*);

media selektif : Endoagar, SS agar; media identifikasi : TSI (*triple sugar Iron*), agar *Simon citrate*, LIM (*lysine, indole motility*).

Untuk pembenihan : diperlukan darah yang mula-mula dimasukkan ke dalam media cair *Oxgall* atau TSB, selanjutnya dimasukkan ke dalam pengeram (inkubator).

b. Pemeriksaan Widal (Cara tabung):

Untuk peralatan dan bahan : Inkubator (pengeram); rak tabung Widal dan tabungnya; antigen Widal (laboratorium Patologi Klinik RSUD dr. Sutomo); larutan garam faali, pipet 10 ml, pipet Ependorff.

Untuk uji Widal: dari darah dipisahkan serum dari bekuan darah kemudian diperiksa langsung untuk uji Widal. Serum dimasukkan ke dalam tabung Ependorff untuk pemeriksaan PCR yang dapat diperiksa langsung atau disimpan dahulu -20°C .

c. Pemeriksaan *Polymerase chain reaction* (PCR)

1. Alat yang diperlukan :

- a. Mesin PCR (Thermo cycler)
- b. Pemusing (*centrifuge*) , dingin atau tanpa pendingin
- c. Alat *freeze dryer* atau beku kering
- d. Elektroforese gel dan pemasok tenaga listrik (*power supply*) 75–100 V
- e. Tabung mikro *polypropilene* 1,5 ml, 0,5 ml, 0,2 ml
- f. Ujungan (*tip*) pipet
- g. Pipet Ependorff 0,5 -10 ul, 10-100 ul, 1000 ul
- h. Lemari pendingin -20°C

2. Bahan yang diperlukan

- a. *Phenol, Chloroform, EDTA (ethylene diamine tetra acetat), dan asam borat*
- b. *Trizma base*
- c. *Enzym : Taq, dNTP*
- d. *Buffer 10x PCR*
- e. *Garam MgCl₂*
- f. *ethanol absolut dan ethanol 70 %*
- g. *Aquadestilata steril*

4.5.3. Konfirmasi hasil uji *Polymerase chain reaction (PCR)*

4.5.3.1 Pemeriksaan **Hybridisasi**

1. Alat yang disediakan:

- a. Peralatan (aparatus) *Slot-Blot* (Hoeffer Scientific Instrument, USA)
- b. Kertas Whatman
- c. *Hybond Membrane* (Amersham, UK)
- d. Transiluminator UV (Spectroline, USA)

2. Bahan pemeriksaan Ekstraksi DNA:

a. Reagen :

1) Larutan dapar (buffer) 10 xTE (TrisHCl dan EDTA)

100 mM Tris HCl
10 mM EDTA pH 8.0

2) Larutan pedenaturasi (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl)

NaOH 20 g
NaCl 87,66 g
dH₂O 1 000 ml

dibagi-tuangkan ke dalam botol plastik (Falcon) dan disterilkan di dalam autoklaf

3) Larutan penetral (0,5 M Tris HCl, pH 7,5 ; 1,5 M NaCl)

M Tris HCl, pH 7,5:	500 ml
NaCl	87,66 g
dH ₂ O qs. ad	1 000 ml

Dibagi-tuangkan ke dalam tabung *polypropylene* (Falcon) di sterilkan di dalam autoklaf

4) *Buffer Blotting* (20X SSC = *Standard saline citrate*)

3 M NaCl , 0,3 M <i>Sodium citrate</i> ,	
3 M NaCl	175,32 g
Trisodiumcitrate 2H ₂ O	88,32 g
dH ₂ O qs ad	1000 ml

Dibagi menjadi beberapa bagian kemudian disterilkan dengan autoklaf

5) Larutan 2X SSC:

steril 20X ssc	10 ml
sdH ₂ O	90 ml

b. Bahan untuk prehibridisasi :

1,5X SSPE (*Sodiumphosphate EDTA*)

0,27mM NaCl, 15 mM *Sodiumphosphate* (pH 7,7),

1,5 mM EDTA

pH dari SSPE harus tepat untuk menjamin latar belakang yang rendah (*low back ground*).

15x SSPE

NaCl	15,8 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2,340 g
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,558 g
dH ₂ O	90 ml

pH diatur sampai 7,7 dengan 1 atau 5 M NaOH ,sampai volume 100 ml dengan dH₂O.Dibagi beberapa bagian kemudian di masukkan autoklaf

1,5 X SSPE,
0,5 % (W/V) *skim milk*,
1%(w/v) SDS(*Sodium dodecyl phosphate*).
6 % PEG(*polyethylene glycol*)

4.5.3.2 Pemeriksaan penentuan urutan (*sequencing*) DNA *S.typhi* hasil uji

PCR

Alat dan bahan yang disediakan:

1. Alat :

- a. Penangas air
- b. Elektroforese vertikal
- c. Pemusing (*centrifuge*)
- d. Pengeram (inkubator)
- e. Pipet dan ujungan (*tip*) Ependorff

2. Bahan

- a. Untuk urutan (*Sequence*) yang akan ditentukan : Produk *PCR S.typhi*
- b. Polyacrylamide gel 6 %
- c. Buffer 1 X *PCR*
- d. Sequenase C
- e. Enzim dGTP(*termination mix*)
- f. DTT
- g. α^{35S}

4.5.3.3 Pemeriksaan penentuan pemilihan primer

Semua primer disintesis dengan sintesis *Custom Oligonucleotide (Genemed Biotechnologies ,Inc., San Fransisco, USA)* kecuali *Japanese primer Katsumata, 1994*). Ukuran produk amplifikasi hasil PCR dengan macam primer :

Tabel 4.2 Ukuran produk amplifikasi hasil PCR dengan macam primer

Macam primer	Gen sasaran	Ukuran produk hasil amplifikasi
<i>Omp 1 & 2</i>	<i>OmpC</i>	294 bp
<i>Omp 3 & 4</i>	<i>OmpC</i>	492 bp
<i>Oev 1 & 2</i>	<i>Env z'</i>	
	<i>OmpR</i>	240 bp
<i>Oev 3 & 4</i>	<i>OmpR</i>	470 bp
<i>Os 1 & 2</i>	<i>OmpS1</i>	271 bp
<i>Os 3 & 4</i>	<i>OmpS1</i>	456 bp
<i>Oph 1 & 2</i>	<i>pho</i>	361 bp
<i>sifA</i>	<i>sifA</i>	413 bp
<i>Japanese primer, kode 129 & 130</i>	<i>rfb</i>	250bp(?)
<i>128 & 165</i>		
<i>304</i>	<i>rfb</i>	492 bp

4.6 Tempat dan waktu penelitian

4.6.1 Tempat penelitian

1. Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. SUTOMO, Surabaya
2. Laboratorium TDRC (*Tropical Disease Research Centre*), Surabaya
3. Laboratorium Institut Pengajian Tinggi *University of Malaya*, Kuala-

Lumpur, Malaysia

4.6.2 Waktu penelitian

Pengumpulan sampel dan pengumpulan data : April 1994 sampai dengan Mei 1996

4.7 Prosedur pengambilan atau pengumpulan data

4.7.1 Cara pemeriksaan untuk perbenihan darah

1. Cara Perbenihan darah:

Darah diambil dengan semprit steril 10 cc secara aseptik , selanjutnya darah dibagi @ 5 cc dimasukkan ke wadah media cair (*oxgall* atau TSB) dengan perbandingan 1:10, 2 cc untuk pemeriksaan Widal dan sisanya dipisahkan

dari bekuan darah untuk pemeriksaan PCR. Perbenihan darah dieramkan dalam inkubator selama tiga sampai lima hari, bila tidak terdapat pertumbuhan dinyatakan negatif. Bila ada pertumbuhan pada media *S(higella) S(almonella)*, selanjutnya dilakukan pemeriksaan Gram, identifikasi secara biokimiawi dan serologi. Pewarnaan Gram terdiri Gentian violet 1%, Lugol 3%, alkohol 96% dan safranin 1 %

2. Uji biokimiawi:

Terdiri dari media TSI, *Simon citrate*, dan LMI. Hasil uji dapat ditentukan dari pembacaan seperti yang tercantum di tabel 4.2 bawah ini:

Tabel 4.3 Reaksi *S.typhi*, *S.paratyphi A*, *S.paratyphi B*, *E.coli* pada media TSI,LIM dan Simon citrat (dikutip dari Ewing,1982)

Jenis kuman	TSI				LIM			SC
	Slant	Butt	Gas	H ₂ S	Lysin	Indol	Motilitas	Sitrat
<i>S.typhi</i>	K	A	-	+w	+	-	+	-
<i>S.paratyphi A</i>	K	A	+	-	-	-	+	-
<i>S.paratyphi B</i>	K	A	+	+	+	-	+	-
<i>E.coli</i>	A	A	+	-	+	+	+	-

K = alkalis, A = asam, +W= positif lemah, slant = permukaan agar miring, butt = dasar agar

3. Uji konfirmasi

Perlu disediakan antisera terhadap *S.typhi* (Biofarma, Becton Dickinson). Dilanjutkan dengan uji konfirmasi bila terjadi pertumbuhan untuk identifikasi dengan antisera *S.typhi* O,H, Para, A, B,C (Bio Farma Bandung dan Becton Dickinson, USA). Bila terjadi aglutinasi pada salah satu antisera atau beberapa antisera dinyatakan hasilnya positif.

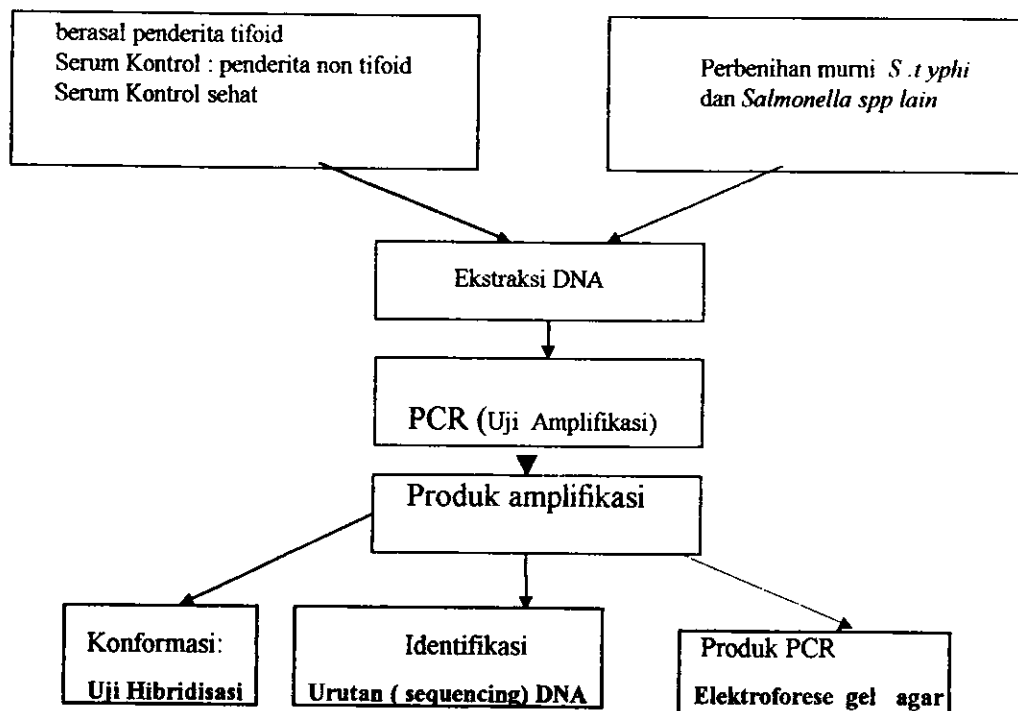
4.7.2 Pemeriksaan Widal (cara tabung)

Di dalam tabung Widal dibuat penipisan serum dengan larutan garam faali secara bertingkat mulai 1/50, 1/100 , 1/200,1/400 dan 1/800. Kemudian dimasukkan larutan antigen *S. typhi* (berasal dari pertumbuhan kuman yang diambil dari penderita demam tifoid, yang memeriksakan ke Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr.Sutomo, Surabaya). Selanjutnya dieramkan pada suhu 37° C selama 18 jam; pada dasar tabung hasil aglutinasi dibaca dengan mata telanjang . Hasil uji Widal positif apabila titer di atas 200 dan negatif apabila tidak terjadi aglutinasi atau titer di bawah 200.

Hasil pemeriksaan PCR dikelompokan berdasar hasil laboratorium seperti kelompok yang tersebut di bawah ini:

1. perbenihan darah *S. typhi* positif dan Uji Widal positif
2. perbenihan darah *S. typhi* positif dan Uji Widal negatif
3. perbenihan darah *S. typhi* negatif dan Uji Widal positif
4. perbenihan darah *S. typhi* negatif dan Uji Widal negatif
5. perbenihan darah *Salmonella sp* lain
6. sampel dari penderita demam karena penyebab lain
7. sampel penderita demam tidak diketahui sebabnya

4.7.3 Cara pelaksanaan pemeriksaan PCR



4.7.3.1 Ekstraksi DNA genomik

1. Bakteri dari perbenihan murni *S. typhi* yang berasal dari penderita demam tifoid, dan dibiakkan di dalam media cair (*nutrient broth*) semalam dalam pengering penangas air (*water bath incubator*).
2. Kemudian dipusingkan dengan pusingan berpendingin (*refrigerated centrifuge*) dengan kecepatan 10 000 rpm selama 10 menit, endapannya diisap (6 ml) dan diampai (suspensi) dengan 100 ul 0,15 M NaCl, 0,1M EDTA pH 8.0
3. Selanjutnya dituangi 50 ul (20 mg/ml) *lysozyme* dan dikocok dengan alat *vortex*
4. Kemudian dieram pada suhu 37° C selama 30 menit, lalu ditambah dengan 100 ul 1% SDS, 0,1 M Tris HCl pH 8.0

5. Selanjutnya dicampur di dalam tabung mikro dengan diisap dan dikeluarkan dalam tabung berulang kali (*up and down*)
6. Kemudian ditambahkan 50 ul 5M *sodium perchlorate* dan dikocok, lalu ditambah bufer fenol khloroform
7. Selanjutnya dipusingkan dengan kecepatan 10 000 rpm selama 10 menit
8. Kemudian fase cair dipindah ke dalam tabung mikro yang baru
Cara tersebut pada (langkah 7) diulang dua kali
9. Selanjutnya dituangkan 300 ul *ethanol* absolut dingin dan dipendakkan
10. Kemudian dipusingkan pada 10 000 rpm selama 10 menit
11. Selanjutnya dicuci dengan *ethanol* 70 %, dan pentel (*pellet*) yang kering disuspensi di dalam 200 ul TE (Tris HCl EDTA) steril. DNA disimpan pada suhu 0° C – 40 ° C.

4.7.3.2 Perekaan dan pembuatan primer untuk PCR gen *Omp* (Gene Work)

DNA yang dipakai berasal dari ekstraksi *S.typhi*, *S.enteridis*, *S.typhimurium*, *S. blockley*, *S.matopeni*, *S.sonneiae*, *B .pseudomallei*, *K.pneumoniae*, dan *V.cholerae*.

Primer yang dipilih untuk amplifikasi

1. Primer untuk amplifikasi gen *OmpC S. typhi* dengan urutan Oligonukleotida:

Omp 1: 5' GCA GGT TCC TTC GAT TAT GG -3'

Omp 2: 5' GAT TGC ATA AGT CAG CGA TCC-3'

Omp 3: 5' CCG TAA CAC CGA CTT CTT CG -3'

Omp 4: 5' CCG TTG CTG ATG TCC TTA CC-3

2. Primer untuk amplifikasi sampul (*envelope*) gen *Omp S. typhi* dengan urutan oligonukleotida

Oev 1 5' GCC TGT TCC TTA CAG CTT CG -3 '

Oev 2 5' CGG TTC TCT TGA TAA CGC G -3'

Oev 3 5' CAG GTG AAG ATG GTC TGT CG -3'

Oev 4 5' ATC TTC TTC CAC CAT ACG GC -3 '

3. Primer untuk amplifikasi gen Omp S₁ *S.typhi* dengan urutan oligonukleotida

Os 1 5' - ATC AAC GAT ATG CTG ACC GG -3'

Os 2 5' - TAT TAC GGT AGG TGG CAA CG -3'

Os 3 5' - ACA TTA AGG TGA ACA CCA CCG -3'

Os 4 5' - CAA CTT GAT TGT CCG AAC G - 3'

4. Primer untuk amplifikasi dari gen *phoE S typhi* untuk Omp dengan urutan oligonukleotida:

Oph 1 5'- AGA GCA CTC TGG CAA TAG TGG -3'

Oph 2 5'- AGG CCT CAA CAT CGT ACA GC - 3'

5. *Japanese primer gene rfbs* (kode 129/130 dan 128/165)

Semua primer disintesis dengan sintesis *Custom Oligonucleotide (Genemed Biotechnologies, Inc., San Fransisco, USA)* kecuali *Japanese primer*.

(Housea, 1996)

6. Oligonukleotida Chin 304

Chin 304 /1 : 5' - TCA CGA CTT ACA TCC TAC-3'

Chin 304/2 : 5' - CTG CTA TAT CAG CAC AAC -3'

Semua primer diuji coba manakah yang paling mendekati kekhasan dan kepekaan terhadap genom DNA *S.typhi*.

4.7.3.3 Ekstraksi DNA dari serum sampel untuk PCR

1. Serum 100 ul dituangi 13,3 ul SDS 10 %, 6,7 ul Proteinase K (1mg/ml) dalam tabung Ependorff (1,5 ml).
2. Setelah dicampur dan dieram pada suhu 37° C selama 1 jam, selanjutnya direbus pada suhu 98° C selama 10 menit.
3. Sesudah itu dilakukan ekstraksi pertama dengan 120 ul TE -Phenol dan prosedur ini kemudian diulang yang kedua dengan 120 ul bufer phenol chloroform .

4. DNA yang diperoleh dari fase cair diendapkan dengan 12 ul 3M NaOAc dan 250 ul etanol absolut -70°C selama 30 menit
5. Selanjutnya DNA yang diperoleh dipusingkan dengan kecepatan 12 000 g selama 30 menit
6. Kemudian dikeringkan dengan cara beku kering (*freeze dryer*) selama 30 menit atau pompa hampa udara, disimpan pada suhu 4°C untuk pemeriksaan selanjutnya.
7. Untuk amplifikasi DNA dari hasil ekstraksi dilarutkan dengan bufer TE atau aquadestilata steril

4.7.3.4 Penentuan konsentrasi dan uji primer genomik DNA

1. Konsentrasi DNA ditentukan dengan mengukur kepadatan optik (OD, *optical density*), dari alat *double beam* Shimadzu, yaitu mengukur panjang gelombang dan perbandingannya pada λ 260 nm dan λ 280 nm.

$$\text{Konsentrasi DNA} = \text{OD}_{260} \times \text{Faktor Penipisan} \times 50 \text{ ng/ml} \quad 1 \text{ unit OD}_{260} = 50 \text{ ng / ml DNA}$$

→

Kemurnian DNA diukur dengan OD pada Absorbans 260 dan 280

$$\text{ratio OD} : A_{260} / A_{280}$$

$$1.6 < \text{ratio OD} < 2.0$$

2. Pengujian primer dengan genomik DNA

DNA yang dipakai berasal dari ekstraksi *S.typhi*, *S.enteridis*, *S. typhimurium*, *S. blockley*, *S. matopeni*, *S. sonnei*, *B .pseudomallei*, *K. pneumoniae*, dan *V. cholerae*.

Pada pemeriksaan elektroforese tampak gambar masing-masing primer yang menunjukkan ukuran yang berbeda-beda dan kekhasan yang berbeda pula (lihat tabel 4.3.)

4.7.3.5 Bahan dan cara kerja PCR

1. Pelaksanaan PCR

- a. Reagen yang disiapkan untuk amplifikasi PCR terdiri dari:

Primer 1 & 2	2 ul (50 pmol)
25mM Mcl ₂	16 ul (2mM)
10x PCR bufer	20 ul
10 mM dNTP	20 ul (250 uM)
steril H ₂ O	124 ul

- b. 23 ul campuran larutan (a) dibagi dan dimasukkan ke dalam 8 tabung ukuran 0.5 ml atau 0.2 ml.
- c. Selanjutnya ditambahkan 1ul DNA (100 -200 ng) ke dalam masing-masing tabung, dengan bahan kontrol aquades atau serum kontrol sehat.
- d. Kemudian larutan tersebut dicampur dengan memusingkan sebentar memakai pemusing (sentrifus) mikro.
- e. Terus dipanaskan untuk denaturasi DNA dengan air mendidih atau pada mesin PCR selama 5 menit, dan dengan cepat didinginkan dalam es selama 5 menit.
- f. Kemudian dipusingkan kecepatan 10 K rpm , agar larutan berada pada dasar tabung .
- g. Selanjutnya ditambahkan *Taq* DNA yang ditipiskan dengan larutan 1x bufer PCR dengan konsentrasi akhir 0,5 U/ul.
- h. Tabung mikro kemudian dipusingkan agar larutan tercampur betul. Apabila menggunakan tabung 0,5 ml lapisan atas ditutup dengan minyak mineral, dan bila tabung 0,2 ml yang digunakan tidak perlu / tanpa dilapisi minyak mineral.

i. Pengaturan suhu mesin PCR (Thermal cycler) dilakukan dengan mengatur suhu secara otomatis sebagai berikut:

- 1) untuk denaturasi 94⁰ C selama 1 menit
- 2) untuk aniling 60⁰ C selama 1 menit
- 3) untuk ekstensi 72⁰ C selama 2 menit

Untuk: Omp 1/2 ,Omp 3/4, Oev 1/2, Oev 3/4 , Os3/4 dan Oph1/2 suhu aniling 60⁰C kecuali untuk Os 1/2 suhunya 58⁰ C.

j Produk amplifikasi dibaca dengan elektroforesis gel dengan menggunakan kontrol negatif bahan *aquadest* atau serum kontrol dan marka Φ x -174 Hae III (*double stranded DNA from 72 to 1353*) melalui iluminator UV.

k Hasilnya dibaca melalui gambar pita (*band*) sesuai dengan masing masing produk amplifikasi DNA

4.7.3.6 Elektroforesis gel agarose

Agarose gel 1 - 2 % dibuat cetakan pada tangki gel (gel tank). Beban aliran listrik sesuai dengan bufer dan tangki gel yang digunakan sebagai berikut :

Bufer	0,5 x TBE
Voltage	0 - 100 V
Gel	0,8 - 1,2 % agarosc
Nampan kecil (<i>Mini trays</i>)	
Nampan sedang (<i>Midi trays</i>)	
Nampan besar (bufer resirkulasi)	

4.7.3.7 Hibridisasi

a. Pemeriksaan hibridisasi (teknik *Slot Blot*)

Alat :

Aparatus *Slot-Blot*, kertas Whatman, Hybond Membrane, Transiluminator UV.

Bahan Reagen pemeriksaan :

1. Bufer TE

2. Larutan Denaturalisasi (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl)

NaOH	20 g
NaCl	87,66 g
dH ₂ O	1.000 ml

dibagi dalam botol plastik (Falcon) dan disterilkan di dalam autoklaf

3. Larutan Netralisasi (0,5 M Tris HCl, PH 7,5 ; 1,5 M NaCL)

1 M Tris HCL, Ph 7,5	500 ml
NaCL	87,66 g
DH ₂ O sampai	1 000 ml

Dibagi dalam botol plastik disterilkan dalam autoklaf

4. *Buffer Blotting* (20 X SSC)

3 M NaCL, 0,3 M Sodium citrate	
3 M NaCl	175.32 g
Trisodium citrate 2H ₂ O	88.32 g
DH ₂ O qs ad	1000 ml

Dibagi dalam beberapa bagian kemudian disterilkan dengan autoklaf.

5. Larutan 2X SSC

Steril 20 X SSC	10 ml
SdH ₂ O	90 ml

Cara Kerja

- 1) Sepotong membran nilon berukuran 11 x 17 cm (sesuai ukuran alat *Slot Blot*) direndam dalam bufer TE. Membran berada diantara mulut (*manifold*) *Slot Blot*.

- 2) Bagian atas blok dipasang , disejajarkan dengan penjepit dan diulir dengan kencang sampai tonjolan (*knob*) mencapai permukaan blok.
- 3) Kemudian melalui lubang (pipa) *Slot Blot* dibuat kedap udara (vakum) dengan pompa selama 5 menit .
- 4) Selanjutnya masing-masing larutan DNA bakteri dialirkan sekitar 100 ul melalui masing-masing sumuran (*wells*)

Pompa dinyalakan dan selanjutnya sebanyak 450 ul bufer TE dialirkan pada masing-masing slot (celah), dipastikan semua bufer telah terdorong melalui sumur. Cara ini diulang kembali dengan 450 ul bufer TE.
- 5) Kemudian ulir dibuka dan membran diambil sedang pompa dibiarkan tetap ditempat.
- 6) Sesudah dikeringkan dan dibungkus dengan *polyethylen*, dan disterilkan dengan sinar UV selama 5 menit sebelum proses hibridisasi.

b. Prehibridisasi :

Bahan Reagen pemeriksaan :

1,5 X SSPE

0.27 m NaCL, 15 mM *Sodiumphospate* (pH 7,7) ; 1.5 mM EDTA pH dari SSPE harus tepat untuk menjamin latar belakang yang rendah (*low back ground*)

15 X SSPE

NaCl	15.8 g
NaI ₂ P0 ₄ .2H ₂ O	2340 mg
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	558 mg
dH ₂ O	90 ml

PH diatur sampai 7,7 dengan 1 atau 5 NaOH, sampai volume 100 ml dengan dH₂O. Dibagi menjadi beberapa bagian kemudian di autoklaf.

1,5 X SSPE, 0,5 % (W/V) *skim milk*,

1 % (w/v) SDS.

6 % PEG per 1000 ml

skim milk	0.5 g
sdH ₂ O	68 ml

Larutan *skim milk* dalam sdH₂O kemudian dituangi

15 X SSPE	10 ml
10 % SDS	10 ml
50 % PEG 8000	12 ml

20 X SSC :

lihat *protokol southern transfer of DNA*

2 X SSC :

20x SSC	10 ml
dH ₂ O	100 ml

2 X SSC + 0,1 % SDS :

20 X SSC	10 ml
10 % SDS	1 ml
dH ₂ O	100 ml

0.2X SSC + 0,1 % SDS :

20 X SSC	1 ml
10 % SDS	1 ml
dH ₂ O	100 ml

Cara kerja :

(1) Membran hibond dipotong sesuai dengan luas permukaan balok *Slot*

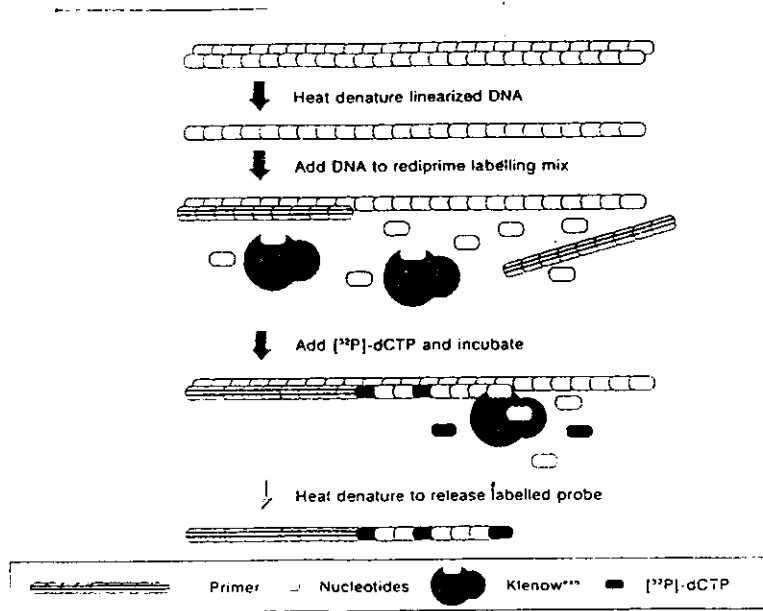
Blot sebesar 11,7 x 4,3 cm. Kemudian diberi marka pada ujung

kanan atas dan ditandai dengan pensil .

- (2) Selanjutnya membran direndam dalam larutan 2 X SSC kira-kira 5 menit
- (3) Sesudah itu diletakkan di atas alat *Slot Blot* tetapi jangan sampai ada gelembung udara, dan penanganan dilakukan secara aseptis, dengan menggunakan penjepit yang telah direndam dalam etanol 70 %.
- (4) Kemudian sekrup ditutup rapat, pompa vakum dihidupkan dengan tekanan 10 mmHg, selama 5 menit.
- (5) Ekstrak DNA yang akan diperiksa dimasukkan sebanyak 20 ul -300ul, dan tekanan pompa dinaikkan sampai 15 mmHg, selanjutnya ditunggu kira-kira sampai 5 menit.
- (6) Sesudah itu dicuci dengan larutan TE tiga kali, dan ditunggu sampai cairan di dalam alat *Slot blot* turun semua dan masuk ke dalam penampung.
- (7) Kemudian dikeringkan di udara dengan meletakkan membran di atas kertas Whatman.
- (8) Setelah itu direndam di dalam larutan denaturalisasi kira-kira selama lima menit, kemudian keringkan di atas kertas Whatman serta dinetralkan. Masing-masing pelaksanaannya memakan waktu 5 menit. Bila sudah kering disterilkan di atas transiluminator UV kira-kira selama 3 menit, kemudian dimasukkan ke dalam ruang gelap yang bersuhu 55° C semalam.

Cara prehibridisasi:

1. *Hybond membrane* yang sudah dieram semalam dipindahkan ke dalam tabung dan direndam di dalam larutan prehibridisasi kira-kira sebanyak 7ml, kemudian diputar pada *medi oven* semalam dengan suhu 42° C.
2. Setelah itu membran dikeringkan di atas kertas Whatman, kemudian baru dipindahkan ke dalam tabung yang mengandung bahan radio aktif [α -³²P] dCTP guna melabel DNA pada membran (*Amersham's rediprime DNA labelling system*), lihat gambar 4.2..
3. Selanjutnya dipusing ulang pada *medi oven* kira-kira selama 1 jam, kemudian baru dicuci dengan larutan 2x SSC suhu 45° C selama 7 menit. 2X SSC + 0,1 % SDS pada suhu 50° C selama 10 menit, selanjutnya dikeringkan di atas kertas Whatman. Semua kegiatan dikerjakan di belakang tabir pelindung radio aktif.
4. Sesudah kering baru dibungkus dengan kertas selofan dan dimasukkan kedalam *catridge* dan disimpan di dalam ruang bersuhu - 20° C untuk pemeriksaan autoradiograf selanjutnya.
5. Di dalam ruang gelap film digunting, lebar guntingan sedikit lebih besar daripada *hybond membrane*.
6. Kemudian membran diletakkan di atas kertas film negatif dengan arah DNA menghadap ke film, Selanjutnya disimpan semalam pada suhu -20°C.
7. Keesokan harinya dicuci dengan pengembang (*developer*) sampai pita-pita DNA tampak.



Gambar 4.2 cara labelling probe dengan Amersham's rediprime DNA labelling (dikutip dari Rediprime DNA labelling system)

4.7.3.8 DNA sequencing

1. Pemeriksaan sequencing (urutan) DNA

a. Alat :

Sequi-gen II electrophoresis

Pemusing (Sentrifus)

Pengeram

b. Bahan yang disiapkan:

4 enzim dATP, dGTP, dCTP, dTTP

Pasangan primer yang dipilih *Omp 3* dan *4*

Sequencing C sequenase

Film sinar X (*X ray film*)

Hasil amplifikasi DNA *S. typhi* (produk *PCR*)

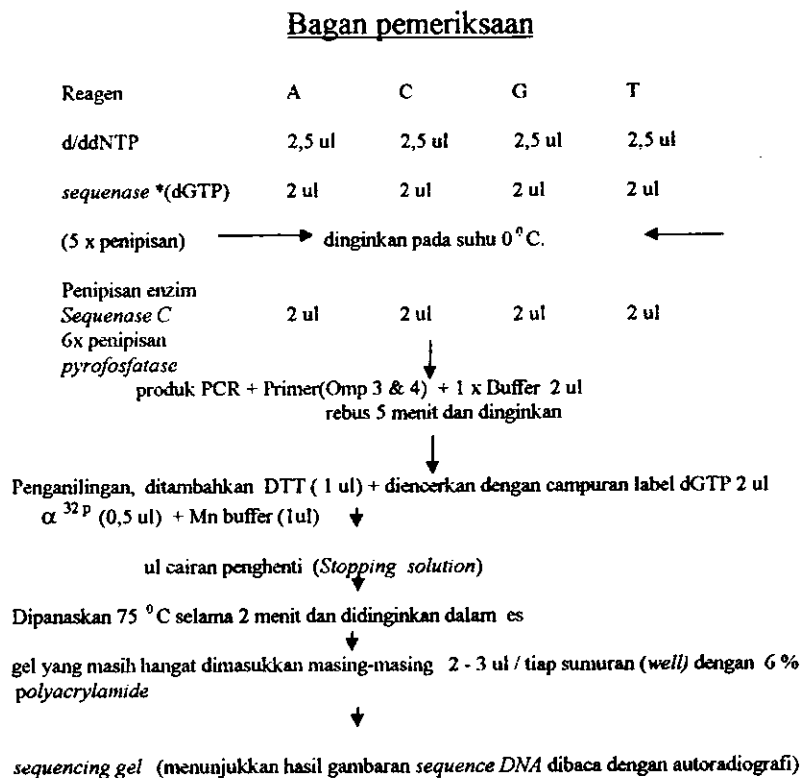
radio labelled α ³²p

c. Cara mengerjakan:

- 1) Membuat elusi *Glass milk* dari hasil PCR (metode Sanger, 1977):
- 2) Lapisan parafin yang ada di atas produk PCR dibuang
- 3) Produk PCR diekstraksi satu kali dengan besar volume yang sama chloroform untuk menghilangkan sisa parafin, kemudian di pusingkan 10 000 rpm selama 10 menit,
- 4) Fase cair kemudian dimurnikan dengan *GeneClean* (BIO 101)
- 5) Ditambahkan 2 sampai 3 volume NaI (6M) dan 10 ul suspensi *glassmilk* pada fase cair; campuran tersebut kemudian dieramkan pada suhu kamar selama 10 menit dengan sekali-kali dikocok.
- 6) Campuran kemudian dipusingkan dengan kecepatan 10 000 rpm, selama 30 detik dan lapisan atasnya (*supernatant*) dibuang,
- 7) Pentel (*pellet*) dipendak (suspensi) secara hati-hati dengan 1 ml *NEW WASH* dingin, kemudian diputar 10 000 rpm selama 30 detik, sesudah itu lapisan atasnya dibuang, cara ini dilakukan 3 kali,
- 8) Pentel yang telah dipendak dengan 40 ul aquadest steril kemudian dielusi selama 10 menit pada suhu 50⁰ C,
- 9) Campuran kemudian dipusingkan selama 2 menit pada 10 000 rpm dan lapisan atasnya dipindahkan ke dalam tabung yang baru,
- 10) Pentel kemudian disuspensi dengan 20 ul aquades steril dan dielusi selama 5 menit pada suhu 50⁰ C,
- 11) Campuran dipusingkan selama 2 menit pada 10 000 rpm, lapisan atasnya kemudian dipindahkan dan dijadikan satu dengan hasil elusi pertama (langkah 8) dan disimpan pada suhu -20⁰ C. Setelah

tahap elusi *glass milk*, maka dilakukan pelabelan dengan bahan radio aktif pelabel primer.

d. Tahap squenase:



Pada bagan tampak hasil dari urutan (*sequence*) DNA pada masing-masing lajur *agar gel*, mulai dari fragmen yang paling besar sampai yang paling kecil .

4.7.3.9 Pengendalian mutu (*Quality control*)

1. Pengendalian mutu amplifikasi DNA *S.typhi*.

a. Menentukan keabsahan pengisian ujung (*tip*) pipet; bila dilakukan pengisian bahan warna tidak terdapat bahan warna yang tertinggal pada ujung pipet; ujung pipet diisi berulang-kali naik dan turun (*up and down*) kira-kira 10 kali, kemudian dilakukan pengisian sampel positif dan negatif.

b. Hasil amplifikasi akan memberi hasil sesuai standar, apabila hasil sampel positif dan memberi hasil yang berbeda pertanda ada bahan hambatan untuk PCR (Dragon et.al 1993)

2. Reagen PCR:

- a. Oligonukleotida yang digunakan harus murni 90 %, rentang rasio A_{260} / A_{280} antara 1,6 - 1,9.
- b. Presisi dilakukan pada kontrol positif dan negatif. Selanjutnya dilakukan uji coba terhadap reagen PCR apakah bebas cemaran pada amplicon atau cetakan DNA.
- c. Sebagai kontrol positif: ekstrak DNA dari *S. typhi* strain asal Malaysia dan Indonesia atau dari sampel yang positif kuat. Apabila kontrol positif menghasilkan tanda negatif atau positif lemah, semua reagen untuk amplifikasi dan sasaran DNA diperiksa (*check*). Pemeriksaan PCR diulang apabila bila kontrol negatif memberi hasil positif.
- d. Sebagai kontrol negatif: amplifikasi dengan sampel aquadest atau kontrol penderita sehat (perbenihan negatif, uji Widal negatif)

3. Peralatan :

- a. Peralatan PCR seperti pemeram, pemangas air, pipet dan balok pemanas (*heating blocks*) harus dikalibrasi, sebab reaksi PCR memerlukan bahan dan sampel volume sangat sedikit.
- b. Kalibrasi pipet minimal dilakukan dua kali dalam setahun, peralatan lain seperti pipet, pemeram dan balok pemanas dilakukan setiap saat sebelum digunakan.

Urutan pemeriksaan yang harus dilaksanakan tiap hari (Dragon et al., 1993)

1. Periksa dan catat suhu semua pemangas air, balok pemanas dan pemeran
2. Buat larutan baru 10 % pemutih (*bleach*)
3. Sebelum bekerja, *biologic safety cabinet* dibuka dan dijalankan 30 menit sebelum bekerja
4. Pulas permukaan dengan 10 % pemutih dan 70 % alkohol
5. Semua pipet dibersihkan dari cemar dengan 10 % pemutih dan alkohol 70 %
6. Ikuti aliran kerja menurut tata cara yang telah ditentukan: selalu bekerja dari keadaan bersih di dalam sebelum PCR) sampai kotor di samping (sesudah PCR)

4.8 Cara atau teknik analisis data

4.8.1. Persiapan

- a. Persiapan borang (formulir) untuk pencatatan data hasil penelitian.
- b. Persiapan tenaga pengambil sampel, tenaga pencatat data, tenaga teknisi laboratorium yang akan membantu pelaksanaan pekerjaan penelitian.
- c. Pembuatan media: TPB, Oxgall, Endo agar, SS agar, TSI, Simon Citrate, LIM, Nutrient agar, Nutrient broth.
- d. Sterilisasi tabung Eppendorff, tip mikropipet, botol media.
- e. Pembelian polymerase Taq, marka DNA, MgCl₂, bufer PCR, reagen semprit sekali pakai 10 cc.
- f. Perbenihan darah untuk pengisolasian dan penemuan (identifikasi) *S.typhi* pemeriksaan uji Widal.
- g. Pemilihan primer untuk pembuatan genom DNA *S.typhi*, uji konformasi: hybridisasi, sequencing DNA *S.typhi*.

4.8.2 Pengumpulan data

- a. Hasil perbenihan darah (perbenihan empedu)

- b. Hasil uji Widal
- c. Hasil PCR

4.8.3 Penggolongan data variabel:

Hasil pemeriksaan PCR dikumpulkan berdasarkan :

1. Hasil perbenihan *S.typhi* dan uji Widal positif
2. Hasil perbenihan *S.typhi* positif dan uji Widal negatif
3. Hasil perbenihan *S.typhi* negatif dan uji Widal negatif
4. Hasil perbenihan *Salmonella lain* positif dan uji Widal positif
5. Hasil perbenihan *Salmonella lain* positif dan uji Widal negatif
6. Hasil perbenihan *Salmonella lain* positif dan uji Widal positif
7. Hasil pemeriksaan bukan *Salmonella* positif (bukan *salmonella tifoid* dan non tifoid)

4.8.4 Perhitungan Statistik

- a. Komputerisasi analisis data menggunakan rumus Uji McNemar :

$$\text{Rumus : } X^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

k = konstanta
 E_i : Expected
 O_i : Observed number
 number $i=1$:

Dilakukan uji statistik dengan derajat kemaknaan ($p < 0.05$)

H_0 ditolak apabila $p > 0.05$

H_0 diterima apabila $p < 0.05$

- b. Analisis statistik untuk uji PCR

$$\text{Nilai ramal positif} = \frac{\text{Juml. Penderita Tifoid PCR+ve}}{\text{Juml. Penderita PCR+Ve}}$$

$$\text{Nilai ramal negatif} = \frac{\text{Juml. Penderita non Tifoid PCR-ve}}{\text{Juml. Penderita PCR-Ve}}$$

$$\text{Efisiensi Diagnosis} = \frac{\text{Juml. Penderita Tifoid PCR+ ve} + \text{Juml. Penderita non Tifoid PCR-ve}}{\text{Juml. Penderita dalam penelitian}}$$

$$\text{Sensitivitas} = \frac{\text{Juml. Penderita Tifoid PCR+ve}}{\text{Juml. Penderita dalam penelitian}} \%$$

$$\text{Spesifitas} = \frac{\text{Juml. Penderita non Tifoid PCR-ve} \times 100\%}{\text{Juml. Penderita dalam penelitian}}$$

c. Analisis untuk uji Widal:

$$\text{Nilai ramal positif} = \frac{\text{Juml. Penderita Tifoid Widal+ve}}{\text{Juml. Penderita Widal+Ve}}$$

$$\text{Nilai ramal negatif} = \frac{\text{Juml. Penderita non Tifoid Widal-ve}}{\text{Juml. Penderita Widal-Ve}}$$

$$\text{Efisiensi Diagnosis} = \frac{\text{Juml. Penderita Tifoid Widal+ve} + \text{Juml. Penderita non Tifoid Widal-ve}}{\text{Juml. Penderita dalam penelitian}} \%$$

$$\text{Sensitivitas} = \frac{\text{Juml. Penderita Tifoid widal+ve}}{\text{Juml. Penderita dalam penelitian}} \%$$

$$\text{Spesifitas} = \frac{\text{Juml. Penderita non Tifoid Widal-ve}}{\text{Juml. Penderita non Tifoid dalam penelitian}} \times 100\%$$

$$\text{Diagnosis sensitivitas} = \frac{\text{T(rue)P(ositive)}}{\text{TP} + \text{F(alse)N(egative)}}$$

$$\text{Diagnosis spesifitas} = \frac{\text{T(rue)N(egative)}}{\text{TN} + \text{F(alse)P(ositive)}}$$

$$\text{Predictive value of +ve test} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FP}}$$

$$\text{Predictive value of -ve test} = \frac{\text{TN}}{\text{TN} + \text{FN}}$$

$$\begin{aligned} \text{Efisiensi of test (no fraction of patients correctly classified)} \\ = \frac{\text{TP} + \text{TN}}{\text{TP} + \text{FN} + \text{TN} + \text{FN}} \end{aligned}$$

BAB 5

Bab. 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil penemuan pada pemeriksaan penentuan pemilihan primer

(rekayasa primer) meliputi penemuan

5.1.1. Hasil penemuan pada pengujian primer dengan genom DNA

5.1.2. Hasil penemuan pada optimisasi uji PCR

5.1.3. Hasil penemuan pada kepekaan primer Omp 3/4 ada uji PCR dengan *spiking* serum

5.1.4 Hasil penemuan pada konfirmasi pemilihan primer Omp 3/4 pada ujiPCR

5.1.5 Hasil penemuan pada uji PCR pada penderita demam tifoid

5.2 Hasil penemuan pada uji PCR pada penderita demam tifoid

5.3 Penggunaan PCR dalam pengujian spesimen penderita (perbandingan dengan tehnik pengujian lain)

5.4 Penjabaran analisis hasil uji PCR dan Widal

5.5 Penarikan kesimpulan analisis statistik

Penjelasan-penjelasan sub bahasan tersebut di atas dibahas berikut ini.

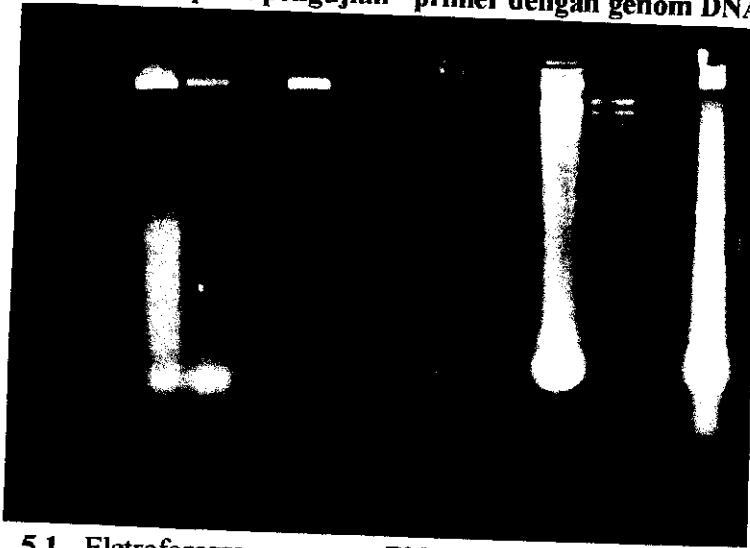
5.1 Hasil penemuan pada pemeriksaan penentuan pemilihan primer

Semua primer disintesis dengan sintesis *Custom Oligonucleotide (Genemed Biotechnologies, Inc., San Fransisco, USA)* kecuali *Japanese primer*

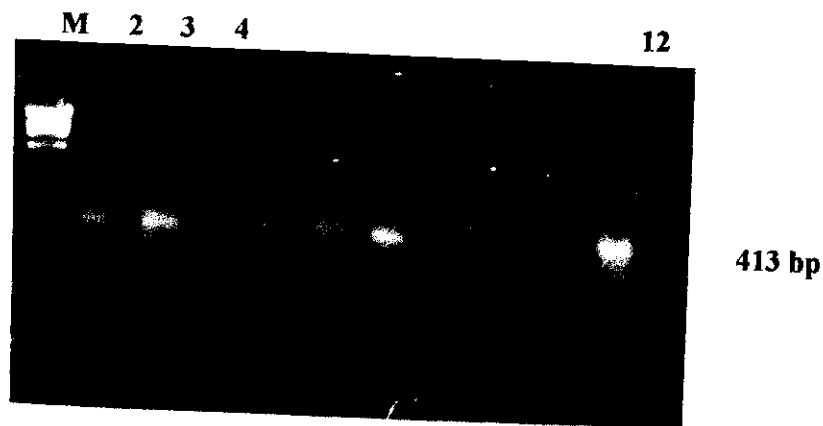
(Housea, 1996; Katsumata, 1994). Hasil penemuan pada pengujian primer dengan genom DNA, penjelasannya pada gb 5.1; gb 5.2; gb 5.3; gb 5.4; gb.

5.5; gb 5.6 dan gb 5.7 serta tercantum pada tabel 5.1 dan tabel 5.2.

5.1.1. Hasil penemuan pada pengujian primer dengan genom DNA



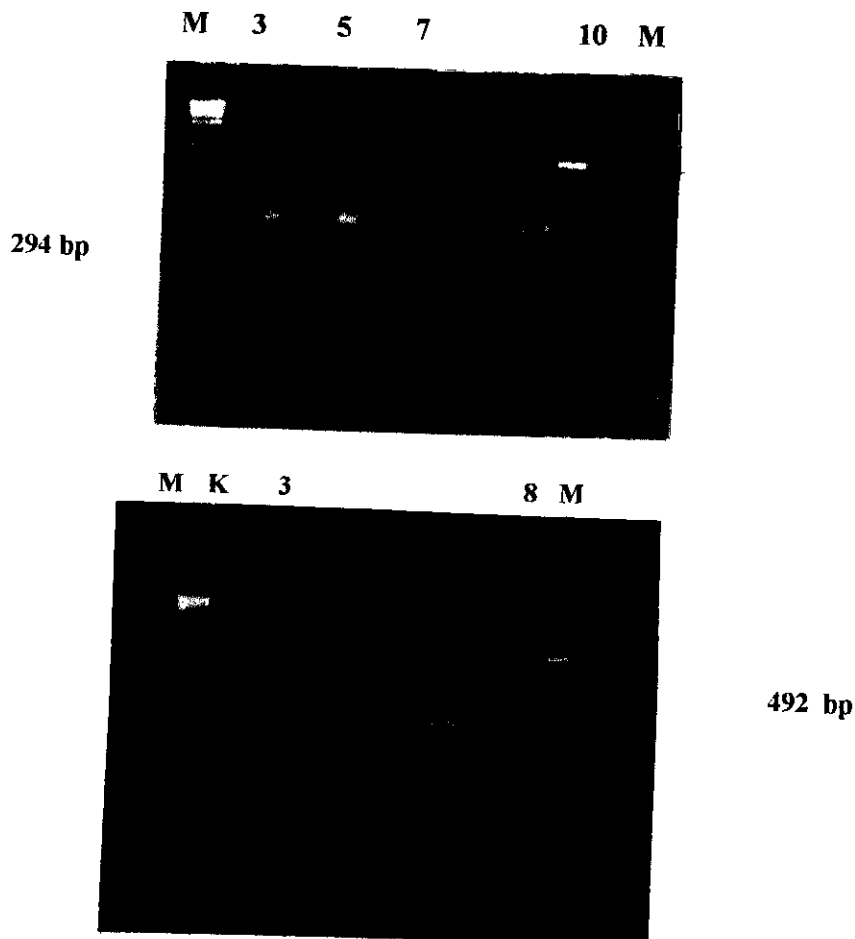
Gambar 5.1 Elektroforegram genom DNA (hasil ekstraksi) *Salmonella spp* patogen enterik lain *S.typhi*, *S.paratyphi A, B, C.*; *S.enteridis*, *S.typhimurium*, *S.blockley*, *S.weltevreden*, *V.cholerae* *K.pneumoniae*. Konsentrasi DNA masing-masing sbb: 5,06 ug/ μ l; 1,84 ug/ μ l; 1,6 ug/ μ l; 2,82 ug/ μ l; 2,8 ug/ μ l; 1,62 ug/ μ l; 4,54 ug/ μ l; 1,52 ug/ μ l; 1,84 ug/ μ l; 2,12 ug/ μ l; 1,4 ug/ μ l; 2,36 ug/ μ l;



Gambar 5.2 Hasil amplifikasi genom DNA *Salmonella spp* (413 bp) pada gel elektroforese dengan primer *sifA*

Lajur : 1. Marka *Lambda HindIII*, 2. *S.typhi* (T309) (+); 3 *S.typhimurium* (+); 4 *S.enteridis* (+); 5 *S.paratyphi A* (+); 6 *S.paratyphi B* (+); 7 *S.paratyphi C* (+); 8 *E.coli* (-) 9 *K.pneumoniae* (-); 10 *Shigella sonnei* (-); 11 Kontrol positive *S.typhi* 111 (+) ; 12 Kontrol negative (TE)

Kesimpulan : Semua genom *Salmonella spp* teramplifikasi



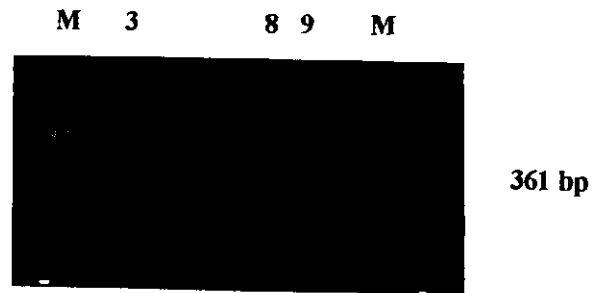
Gambar 5.3 a. Hasil amplifikasi genom DNA *Salmonella spp* (294 bp) pada gel elektroforese dengan primer **Omp 1/2**

Lajur : 1. Marka *Lambda HindIII*, 2. Kontrol negative (TE); 3. *S.typhi* (T309)(+); 4. *S.paratyphi A* (+); 5. *S.paratyphi B* (+); 6. *S.paratyphi C* (-); 7. *S.typhimurium* (+); 8 *S.enteridis* (+) ; 9. *S.blockley*; 10. *S.weltevreden* (+); 11. Marka \emptyset x 174 *Hae III*

Kesimpulan : primer **Omp 1/2** kurang spesifik terhadap *S.typhi* .

b. Hasil amplifikasi genom DNA *Salmonella spp* (492 bp) pada gel elektroforese dengan primer **Omp 3/4**

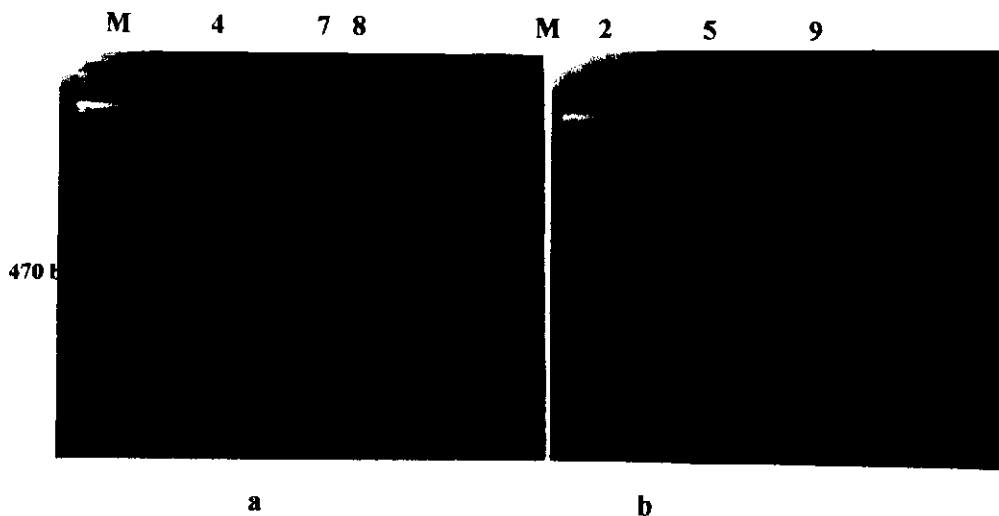
Lajur : 1. Marka *Lambda HindIII*, 2. Kontrol negative (TE); 3. *S.typhi* (T309)(+); 4. *S.paratyphi A* (-); 5. *S.paratyphi B* (-); 6. *S.paratyphi C* (+); 7 *S.typhimurium* (-); 8 *S.enteridis* (+) ; 9. *S.blockley* (-); 10. *S.weltevreden* (-); Marka \emptyset x 174 *Hae III* **Kesimpulan :** primer **Omp 3/4** agak spesifik terhadap *S.typhi*



Gambar 5.4 Hasil amplifikasi genom DNA *Salmonella spp* (492 bp) pada gel elektroforese dengan primer **Oph1/2**

Lajur :1. Marka *Lambda HindIII*, 2. Kontrol negative (*TE*);3.*S.typhi*(*T309*)(+);
4. *S.paratyphi A* (-);5. *S.paratyphi B* (-); 6.*S.paratyphi C* (+);7 *S.typhimurium* (-);
8 *S.enteridis* (+);9. *S.blockley* (+); 10.*S.weltevreden* (-);Marka \emptyset x 174 *Hae III*

Kesimpulan : primer **Oph1/2** tidak spesifik terhadap *S.typhi* dibandingkan primer **Omp 3/4**



Gambar 5.5 a Hasil amplifikasi genom DNA *Salmonella spp* (470 bp) pada gel elektroforese dengan primer **Oev1/2**

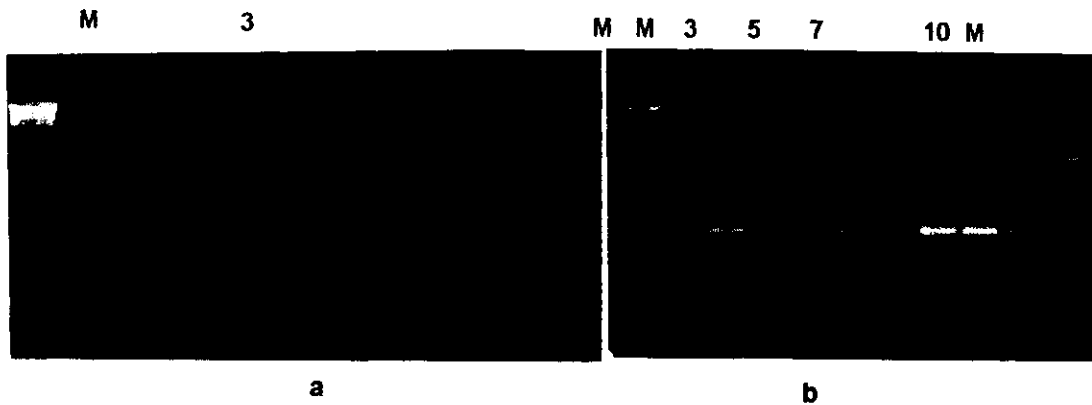
Lajur :1. Marka *Lambda HindIII*, 2. Kontrol negative (*TE*);3.*S.typhi*(*T309*)(+);

Kesimpulan : primer **Oev 1/2** tidak spesifik terhadap *S.typhi* idibandingkan primer **Omp 3/4**

b. Hasil amplifikasi genom DNA *Salmonella spp* (492 bp) pada gel elektroforese dengan primer **Oev 3/4**

Lajur :1. Marka *Lambda HindIII*, 2. Kontrol negative (*TE*);3.*S.typhi*(*T309*)(+);
4. *S.paratyphi A* (+);5. *S.paratyphi B* (-); 6.*S.paratyphi C* (+);7 *S.typhimurium* (-);
8 *S.enteridis* (+);9. *S.blockley* (+); 10.*S.weltevreden* (+);Marka \emptyset x 174 *Hae III*

Kesimpulan primer **Oev 3/4** tidak spesifik terhadap *S.typhi* dibandingkan primer **Omp 3/4**



Gambar 5.6 a Hasil amplifikasi genom DNA *Salmonella spp* (271 bp) pada gel elektrofores dengan primer **Os 1/2**

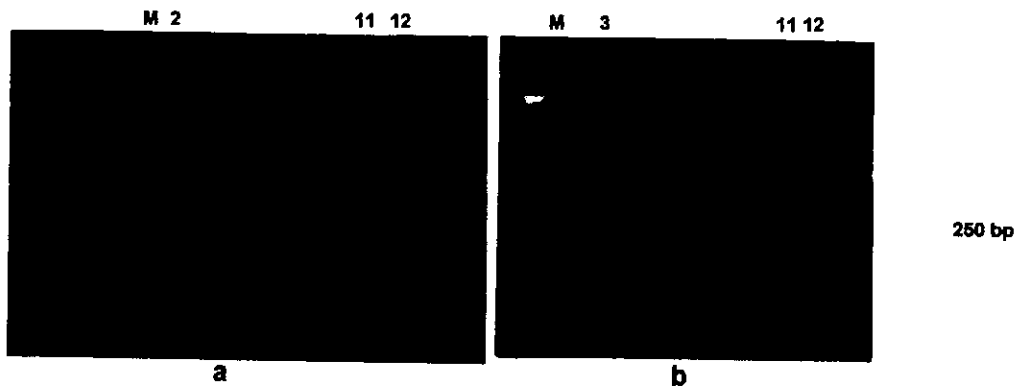
Lajur :1. Marka *Lambda HindIII*, 2. Kontrol negative (*TE*);3.*S.typhi*(*T309*)(+); 4. *S.paratyphi A* (+);5. *S.paratyphi B* (-); 6.*S.paratyphi C* (+);7 *S.typhimurium* (+); 8 *S.enteridis* (+);9. *S.blockley*; 10. *S.weltevreden* (+); 10. Marka \emptyset x 174 *Hae III*

Kesimpulan : primer **Os1/2** tidak spesifik terhadap *S.typhi* dibandingkan primer **Omp 3/4**

b. Hasil amplifikasi genom DNA *Salmonella spp* (456 bp) pada gel elektrofores dengan primer **Os 3/4**

Lajur :1. Marka *Lambda HindIII*, 2. Kontrol negative (*TE*);3.*S.typhi*(*T309*)(+); 4. *S.paratyphi A* (+);5. *S.paratyphi B* (+); 6.*S.paratyphi C* (-);7 *S.typhimurium* (+); 8 *S.enteridis* (+);9. *S.blockley* (+); 10.*S.weltevreden* (-);Marka \emptyset x 174 *Hae III*

Kesimpulan primer **Os 3/4** tidak spesifik terhadap *S.typhi* dibandingkan primer **Omp 3/4**



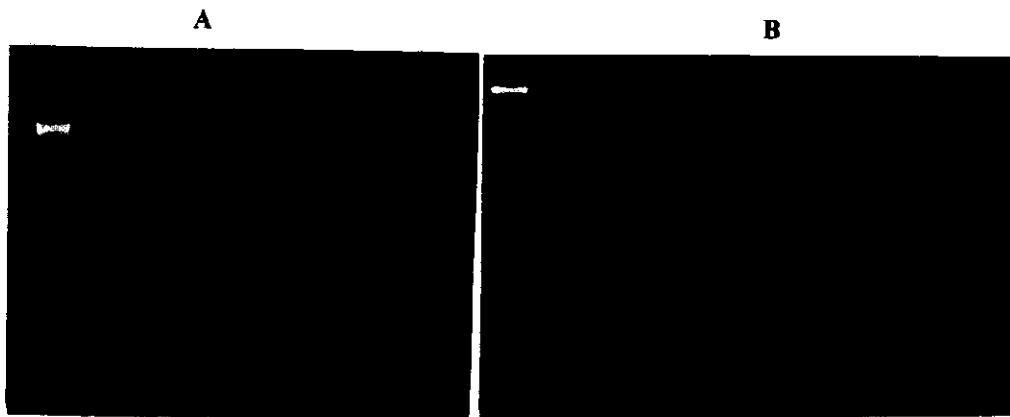
Gambar 5.7 a Hasil amplifikasi genom DNA *Salmonella spp* (250 bp) pada gel elektrofores dengan primer **Japanese rfbS 128/165**

Lajur :1. Marka *Lambda HindIII*, 2. Kontrol negative (*TE*);3.*S.typhi*(*T309*)(+); 4. *S.paratyphi A*(-);5. *S.paratyphi B* (-); 6.*S.paratyphi C* (-);7 *S.typhimurium* (+); 8 *S.enteridis* (-) ;9. *S.blockley* (-); 10. *S.matopeni* (-); 11. *S.typhi* Thailand(+);12. *S.typhi* Indonesia(+). **Kesimpulan** : primer **Japanese rfbS 128/165** lebih spesifik terhadap *S.typhi* dibandingkan primer **Omp 3/4**

b. Hasil amplifikasi genom DNA *Salmonella spp* (250 bp) pada gel elektrofores dengan primer **Japanese rfbS 129/130**. **Lajur** :1. Marka *Lambda HindIII*, 2. Kontrol negative (*TE*);3.*S.typhi*(*T309*)(+); 4. *S.paratyphi A*(-);5. *S.paratyphi B* (-); 6.*S.paratyphi C* (-);7 *S.typhimurium* (-);8 *S.enteridis* (-) ;9. *S.blockley* (-); 10. *S.matopeni* (-); 11. *S.typhi* Thailand(+);12. *S.typhi* Indonesia(+). **Kesimpulan** primer **Japanese rfbS 129/130** amat spesifik terhadap *S.typhi* dibandingkan primer **Omp 3/4**

5.1.2. Hasil penemuan pada optimisasi uji PCR

a Pengaruh suhu aniling



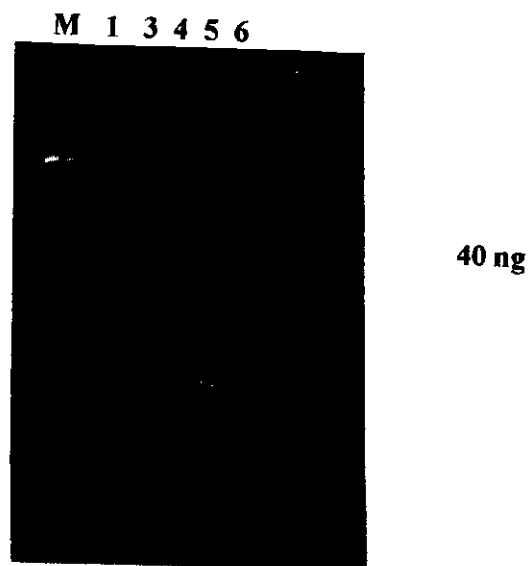
Gambar 5.8 A: Gel dengan primer rfbs aniling pada suhu :55^oC ;
 B: Gel dengan primer rfbs aniling pada suhu 60^oC
 ternyata hasil amplifikasi B lebih jelas dari A tampak pada pita (band) yang lebih tajam.

b Pengaruh konsentrasi DNA ,MgCl₂, primer dan Taq



Gambar 5.9 Pengaruh konsentrasi DNA terhadap konsentrasi MgCl₂
 Penipisan konsentrasi sebesar 0,25 ; 0,5, 1,0; 1,5; 2,5 (x 25mM),
 tampak yang paling tinggi adalah konsentrasi 2,5 x ditunjukkan pada
 pita (*band*) yang lebih jelas .

5.1.3. Hasil penemuan pada kepekaan primer Omp 3/4 ada uji PCR dengan *spiking* serum

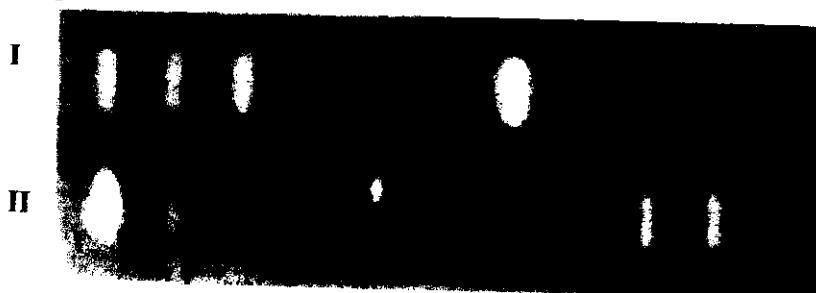


Gambar 5.10 Optimisasi PCR dengan berbagai konsentrasi DNA *S.typhi* dengan primer Omp 3 & 4.

Lajur:(1) Marka Lambda HinIII, (2) kontrol negatif, (3) 0,4 ngDNA, (4) 4 ngDNA (5) tampak pita pada 40 ng DNA, (6) 400 ng DNA

5.1.4 Hasil penemuan pada konfirmasi pemilihan primer Omp 3/4 pada ujiPCR

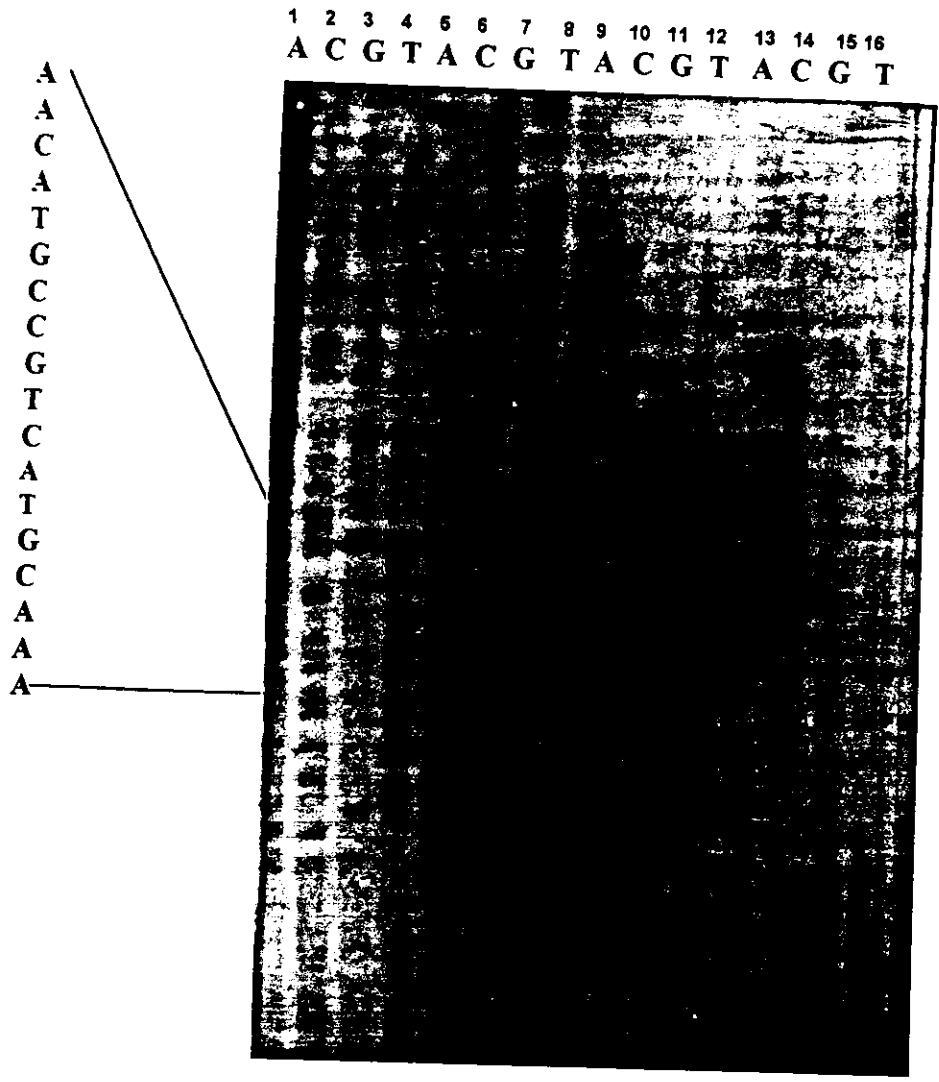
a.Uji Hibridisasi



Gambar 5.11 hasil hibridisasi pelabelan produk PCR (amplikon) dengan Amersham's Rediprime DNA, pada **deret I** : *S.typhi*, *S.enteridis*, *S. paratyphi A,B,C*.; *S. typhimurium*, *S. mantopeni*, *S. bovis*, *S.blokley*, *S.chingullae*

deret II: *S. typhi* (IMR), *S. typhi* (PNG), *S.enteridis*, *S.weltevredes*, *E.coli*, *S. typhi* (Perbenihan dan Uji Widal positif), *S. typhi* (Perbenihan dan Uji Widal negatif).; F.U.O. keterangan: IMR = Institute Medical Reasearch; PNG= Papua New Guinea; F.U.O= Febrile unknown origin

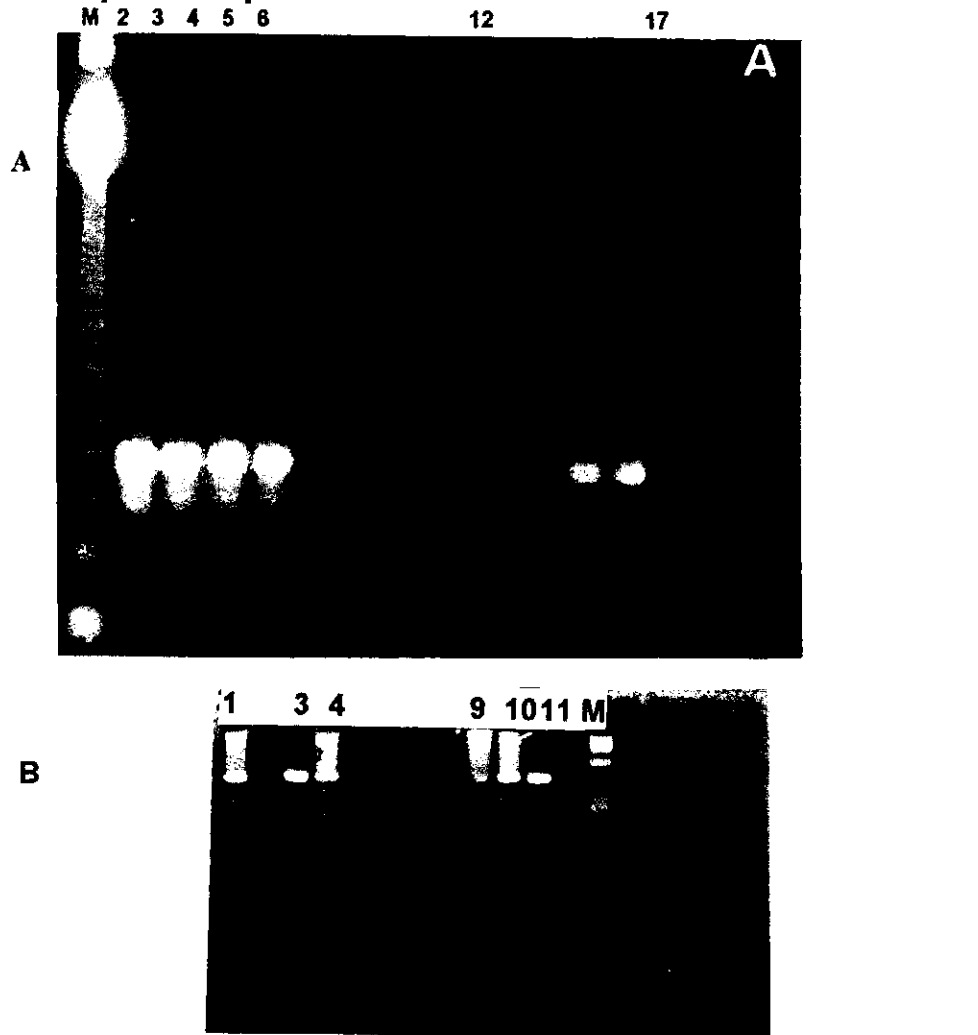
b. Hasil penemuan urutan (sequencing) DNA *S. typhi* 111 menggunakan Omp 3 & 4



Gambar 5. 12 Urutan DNA dari hasil amplifikasi Primer Omp 3/4 pada 6 % polyacrylamide gel
 Omp 3 : 5' CCG TAA CAC CGA CTT CTT CG- 3'
 Omp 4 : 5' CCG TTG CTG ATG TCC TTA TTA CC- 3'

5.5 Hasil penemuan pada uji PCR pada penderita demam tifoid

5.5.1 Hasil amplifikasi serum penderita dengan primer rfbs 129/130 dan primer Omp3/4



Gambar 5.13 gambar elektroforegram dari hasil uji PCR pada penderita diduga demam tifoid

A Hasil amplifikasi serum penderita dengan primer rfbs 129/130

Lajur 2 s/d 5 penderita dengan perbenihan *S.typhi* dan uji Widal positif

Lajur 6 s/d 9 penderita dengan perbenihan *S.typhi* negatif dan uji Widal positif

Lajur 10 s/d 12 penderita dengan perbenihan *Salmonella non typhoid*

Lajur 17 penderita dengan demam tak diketahui sebabnya (*Febrile unknown origin*)

B Hasil amplifikasi serum penderita dengan primer Omp 3/4

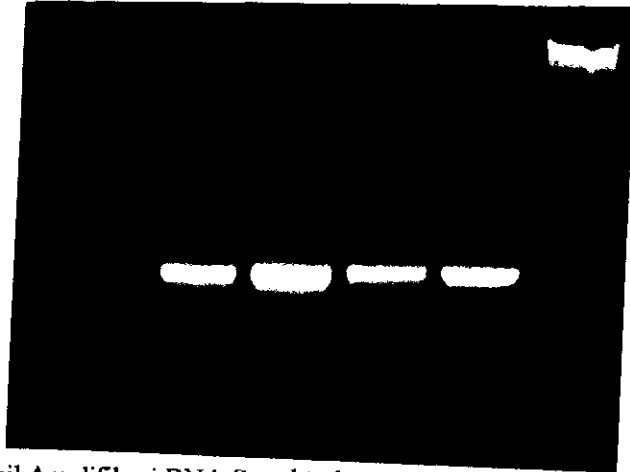
lajur 1 kontrol positif lajur 2 kontrol negatif

Lajur 3,4 : penderita dengan perbenihan *S.typhi* dan uji Widal positif

Lajur 5,6,7,8, penderita dengan perbenihan *S.typhi* negatif dan uji Widal positif

Laju 9,10,11 penderita dengan perbenihan perbenihan *S.typhi* positif,Lajur 12 marka Φ 174 Hae III

5.2.2 Hasil amplifikasi DNA *S.typhi* dari berbagai daerah (negara)



Gambar 5.14 Hasil Amplifikasi DNA *S.typhi* dengan primer *rfbs* 129/130 dari berbagai daerah (negara)

S.typhi dari Malaysia (+) ; Thailand (+) ; Indonesia (+)

Hasil pemeriksaan PCR pada gel elektroforese sebagai berikut, dari hasil pembacaan gambar 5.1 sampai 5.7 hasilnya dapat diringkas pada Tabel 5.1 sebagai berikut:

Tabel 5.1 Hasil penemuan pada pemilihan dari beberapa primer terhadap genom DNA *Salmonella spp.* dan enteropatogen lain

Genom DNA	<i>sifA</i>	<i>Omp</i> 1/2	<i>Omp</i> 3/4	<i>Oph</i> 1/2	<i>Oev</i> 1/2	<i>Oev</i> 3/4	<i>Os</i> 1/2	<i>Os</i> 3/4	<i>Rfbs</i> 28/165	<i>Rfbs</i> 129/130
<i>S.typhi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S.para A</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>S.para B</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>S.para C</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S.typhymu- rium</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>S.enteritidis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S.blockley</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>S.weltevreden</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-

Pada Tabel 5.1 tampak bahwa primer yang paling khas rupanya berasal dari *rfbs* gene *S. typhi* kode 129 130, oleh karena memberi hasil negatif hampir pada sebagian besar enteropatogen, kecuali pada *S typhi*.

Tabel 5.2 Hasil pemeriksaan PCR dari genom DNA *S typhi* dan *Salmonella spp* (Laboratorium Institut Pengajian Tinggi *University of Malaya*)

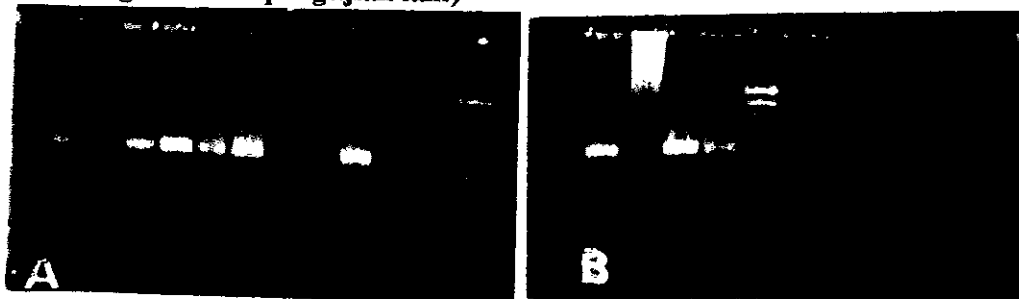
Genom DNA	PEMERIKSAAN DENGAN PCR								
	Uji Primer <i>Omp 3/4</i>					Uji Primer <i>rfbs</i>			
	N	positif	%	negatif	%	positif	%	negatif	%
<i>S. typhi</i>	20	20	100	0	0	20	100	0	0
<i>Salmonella spp.</i>	15	9	60	6	40	0	0	15	100
Non <i>Salmonella spp.</i>	5	0	0	5	100	0	0	5	100
Demam tidak diketahui penyebabnya (FUO)	5	5	33	10	66	1	6,6	14	93,45

* FUO = Fever unknown origin

Hasil PCR primer *Omp 3&4* dan *rfb* menunjukkan bahwa keduanya merupakan primer yang khas untuk *S.typhi* (antara kedua primer tidak terdapat perbedaan yang bermakna $p>0.05$), sedangkan terhadap *Salmonella* lain dan FUO,

Omp3 &4 kurang spesifik (60 %) dan pada *rfb* tidak spesifik (93%),

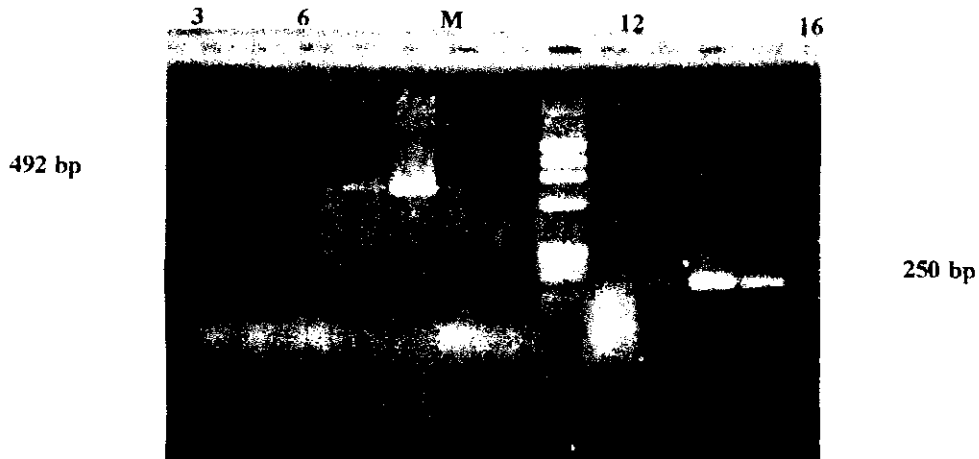
5.3 Penggunaan PCR dalam pengujian spesimen penderita (perbandingan dengan teknik pengujian lain)



Gambar 5.15 Hasil PCR dengan Primer *Omp 3&4* pada penderita diduga tifoid, Marka ϕ x174 DNA/HaeIII

A: Lajur :1 Kontrol (-); Lajur 2 Kontrol (+) (*S.typhi*); Lajur 4-7, 12: Penderita perbenihan (*S.typhi*) (+); 3, 8, 9, 11: Penderita perbenihan (*S.typhi*) (-); 12: Penderita perbenihan (*S.typhi*) (+); Widal (-);

B: Lajur 3, 5: Penderita perbenihan (*S.typhi*) (+); 6: Penderita perbenihan (*S.typhi*) (-)



Gambar 5.16 Hasil PCR dengan Primer 304 pada penderita perbenihan *S.typhi*(+) Marka ϕ x174 DNA HaeIII.Lajur :1Kontrol (-), 2. Kontrol (+) (*S.typhi*);Lajur 3-6: 492 bp Hasil PCR dengan Primer 129/130 pada penderita perbenihan *S.typhi*(+) Marka ϕ x174 DNA HaeIII.Lajur : 11 Kontrol (+) (*S.typhi*);Lajur 12-16 : 250 bp

Tabel 5.3 Hasil pemeriksaan PCR primer Omp 3&4 pada penderita demam tifoid dengan perbenihan *S.typhi* dan uji Widal (<1/200)

Jenis pemeriksaan sampel	N	PCR dengan primer Omp 3 & 4			
		Positif		Negatif	
		n	%	n	%
Perbenihan <i>S.typhi</i> + f Uji Widal + f (> 200)*	28	28	100	0	0
Perbenihan <i>S.typhi</i> + f Uji Widal + f (< 200)*	17	15	88.2	2	11.8
Perbenihan <i>S.typhi</i> - f Uji Widal + f (> 200)*	22	5	22.7	17	77.3
Perbenihan <i>S.typhi</i> - f Uji Widal + f (< 200)*	146	4	2,74	142	97.3
Perbenihan <i>S.paratyphi</i> A Uji Widal + f (> 200)**	3	0	0	3	100
Perbenihan <i>S.paratyphi</i> A Uji Widal + f (< 200)**	7	0	0	7	100
Demam Non <i>Salmonella</i> **	40	0	0	40	100

* S = signifikan, terdapat perbedaan yang bermakna $p < 0.05$

** TS = tidak signifikan, tidak terdapat perbedaan yang bermakna $p > 0.05$

Tabel 5.4 Hasil perbenihan *negatif* dan dengan hasil *PCR* dengan primer Omp 3&4

Hasil PCR	Perbenihan Negatif	Penderita diduga demam tifoid
Positif	9	$9/169 \times 100 \% =$ 5,32 %
Negatif	169	

Tabel 5.5 Hasil pemeriksaan uji *PCR* primer Omp 3&4 dan uji Widal pada 45 penderita demam tifoid dan 39 penderita nontifoid

PENDERITA	N	PCR				WIDAL			
		+	%	-	%	+	%	-	%
Tifoid	45	43	95,6	2	4	28	62,3	17	37,7
Non-Tifoid	39	0	0	39	100	3	7,7	36	92,3

Tabel 5.6 Hasil pemeriksaan *S. paratyphi A*, *Malariae*, DBD (demam berdarahdengue) dengan hasil *PCR* primer Omp 3&4

Hasil PCR	<i>S. paratyphi A</i>	<i>Malariae</i>	DBD	N
Positif	0	0	0	0
Negatif	10	29	1	47

Tabel 5.7 Hasil perbandingan Uji PCR dan Uji Widal:

MACAM PREDIKAT	UJI PCR (%)	UJI WIDAL (%)
Sensitivitas	95,6	62,2
Spesifitas	100	92,3
Nilai ramal Positif	95,6	90,3
Nilai ramal Negatif	100	67,9
Efisiensi diagnosis	97,6	76,2

5.3. Penjabaran analisis hasil uji PCR dan Widal

1. Hasil uji PCR dan uji Widal yang dilakukan pada penderita demam tifoid (biakan darah positif) dan penderita non-tifoid diringkas pada tabel 5.4; 5.5 dan 5.6 .yaitu: 45 penderita demam tifoid yang termasuk dalam penelitian ini ternyata 43 penderita (95,6 %) menunjukkan hasil uji PCR yang positif , sedangkan yang 28 penderita (62,3%) menunjukkan hasil uji Widal yang positif . Maka sensitivitas uji PCR untuk demam tifoid adalah 95,6 % dan sensitivitas untuk uji Widal hanya 62,3%.Perbedaan tersebut secara statistik ternyata bermakna ($p < 0,05$).

39 penderita non-tifoid yang termasuk dalam penelitian ini,semuanya menunjukkan hasil uji PCR negatif (100%)dan 36 penderita (92,3%) menunjukkan hasil uji Widal yang negatif. Sehingga spesifitas uji PCR untuk demam tifoid adalah 100 % dan spesifitas dari uji Widal dalam penelitian ini 92,3%. Perbedaan tersebut ternyata secara statistik bermakna ($p < 0,05$)
2. Hasil uji PCR dan uji Widal pada penderita demam non-tifoid secara lebih rinci diringkas dalam tabel 5.7. Tak seorang penderita non-tifoid , baik demam paratifoid, malariae maupun demam berdarah dengue memberikan hasil uji PCR yang positif semu. Sebaliknya ada 3 penderita (30%) diantara 10 penderita demam paratifoid (*S.paratyphi* positif) yang menunjukkan hasil uji Widal positif semu.

5.5 Penarikan kesimpulan analisis statistik

Dalam menarik kesimpulan analisis statistik, maka dibuat batasan penerimaan dan penolakan hipotesis telitian. Kesahihan pengujian PCR terhadap Widal untuk mengetahui demam tifoid dinyatakan sebagai berikut:

H_0 = Kedua cara pemeriksaan mempunyai ketelitian dan hasil yang sama atau tidak jauh berbeda

H_1 = Kedua cara pemeriksaan tidak dapat dipakai secara bersama karena memberi hasil yang bertolak belakang atau berbeda.

Batas penolakan : H_0 ditolak berdasarkan nilai $p > 0,05$ atau $< 0,05$.

Kesimpulan yang diambil: bila kedua cara pemeriksaan menurut pengamatan dan teori mempunyai nilai sama maka cara pemeriksaan tersebut tidak dapat dipakai untuk analisis karena tidak sensitif dan spesifik.

Memperhatikan perihal yang telah diutarakan di atas, maka:

1. hipotesis telitian yang diajukan ditolak, karena hasil pemeriksaan PCR dan uji Widal tidak berbeda bermakna;
2. hipotesis telitian yang diajukan diterima, karena hasil pemeriksaan PCR dan uji Widal berbeda bermakna.

BAB 6

Bab 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan hasil penelitian ditinjau dari segi teoritik dan empiris.

Pada Bab.2 telah dijelaskan, mengapa kita perlu mengembangkan teknik PCR untuk mengenali / menemukan penyebab penyakit. Panduan diagnosis yang ada saat ini selain tidak seragam, tidak khas (spesifik) dan tidak peka (sensitif) yang sudah diuraikan pada Bab. 1, 1.1.4.2 . Bab 2 .8. Masalah diagnostik laboratorium :

- a. perbenihan darah
- b. pemeriksaan penentuan antigen
- c. diagnosis melalui penentuan uji Widal

Mengingat dan memperhatikan bahwa :

1. Ketiga cara tersebut belum seluruhnya dapat digunakan diseluruh laboratorium rumah sakit negeri atau swasta , penulis berpendapat perlu dibenahi atau diganti bila perlu dengan cara yang lebih khas (spesifik) dan peka (sensitif).
2. Ketiga macam pemeriksaan tersebut di atas ada kelemahannya, karena adanya kerugian sistem imunodeteksi yaitu diperoleh hasil positif dan negatif palsu dengan persentasi yang tinggi, serta adanya reaksi silang yang tidak dapat dihindari (D'Aoust 1987). Namun hasil isolasi dan identifikasi dari *S.typhi* dengan cara perbenihan darah, masih merupakan standar emas untuk diagnosis demam tifoid.
3. Pelaksanaan pemeriksaan laboratorium klinis umumnya lama dan

terdapat langkah-langkah pemeriksaan yang bagi penderita cukup membosankan untuk sampai mendapatkan diagnosis pastinya (Edel, 1973; Thomason et al., 1977; Morinigo et al., 1986, 1989),

Mengingat dan memperhatikan pula bahwa :

1. Cara pemeriksaan yang lebih maju yaitu pemeriksaan pelacak DNA (Rubin, 1992) sulit berkembang sebagai pemeriksaan diagnostik, meskipun lebih khas dan peka daripada cara imunodeteksi. Karena cara pemeriksaan ini kurang sempurna yaitu pada cara labeling, hibridisasi dan penemuan petanda (signal). Sehingga waktu pemeriksaan 3 hari lebih lama dan penemuan pelacak DNA ($10^4 - 10^5$ bakteri) lebih rendah dibandingkan dengan metoda PCR (10 - 100 bakteri), jadi pemeriksaan pelacak DNA kepekaannya lebih rendah dari cara PCR (Tsang & Chau, 1992, Swaminathan et al., 1994).
2. Terdapat beberapa informasi yang diperoleh mengenai penggunaan teknik PCR yang canggih, tetapi perhatian khusus di Indonesia terhadap cara pemeriksaan tersebut belum banyak dilakukan, walaupun dengan melalui pemeriksaan PCR (yang sebenarnya merupakan cara pemeriksaan yang tidak invasif, pemakaian jumlah sampelnya sedikit) dan hasil pemeriksaannya segera dapat diketahui.

Dapat diramalkan bahwa cara pemeriksaan PCR ini kemungkinan dapat mengganti cara perbenihan yang konvensional. Karena dengan teknik PCR ini, terakan yang diperlukan untuk pemeriksaan sangat kecil jumlahnya, bila hal ini dilakukan bagi penderita balita tidak akan menyulitkan pelaksanaannya. Daya lacaknya sangat

tinggi yaitu pada sasaran DNA mampu menemukan/mengenali sampai sebesar 0,1 pg.

6.1.1 Perbandingan dengan metode lain

Dalam mengikuti perkembangan teknologi yang semakin maju dan modern diperlukan tatacara diagnosis yang memadai pula. Teknik PCR pengerjaanya mudah, namun diperlukan tenaga cermat, teliti dengan penanganan yang aseptis, untuk menghindari cemaran pada waktu pemeriksaan PCR sehingga kecil kemungkinan terjadi positif palsu.

Metode PCR dibandingkan dengan metode lain lebih khas, sebab hasil amplifikasi yang didapat menentukan secara pasti cetakan DNA *S.typhi*. Penelitian penulis mendapatkan dukungan dari penelitian yang sudah ada yang mengemukakan keunggulan metode PCR, seperti yang telah diuraikan dalam Bab 1 sub bab 1. 1.4.2 dan Bab 2. sub bab 2. 8.1, pada pokoknya sbb :

1. PCR lebih unggul dibandingkan dengan uji Widal ,
2. Pemeriksaan uji PCR tidak dipengaruhi: reaksi silang dengan *Salmonellosis* lain atau enteropatogen lain , dan pengaruh endemis dan non endemis.
3. Dibandingkan dengan pemeriksaan Elisa (enzyme linked immunosorbent assay) PCR lebih unggul,
4. PCR lebih unggul dibandingkan dengan pemeriksaan hemaglutinasi pasif (PHA)
5. PCR lebih unggul dibandingkan dengan pemeriksaan antigen
6. PCR lebih unggul dibandingkan dengan pemeriksaan *SDS-PAGE immunoblotting*
7. PCR lebih unggul dibandingkan dengan pemeriksaan pelacak DNA

6.2 Merumuskan teori yang dihasilkan dari penelitian

Dari hasil penelitian dirumuskan bahwa PCR dapat digunakan sebagai pelacak DNA *S.typhi* dalam waktu yang relatif pendek dibandingkan cara perbenihan. Karena dari hasil penelitian antara uji PCR dan perbenihan tidak berbeda makna ($p < 0.000$) dan sensitivitas (95,8%) dan spesifitas 100%, maka dapat digunakan sebagai pengganti cara pemeriksaan Widal atau standar emas pada kasus bermasalah.

PCR dapat digunakan sebagai pengganti pada pemeriksaan bermasalah lihat tabel 5.3. dan tabel 5.6. Pada tabel 5.6 didapatkan bahwa uji PCR setaraf dengan uji perbenihan darah.

6.2.1 Sanggahan terhadap cara pemeriksaan konvensional

Di Asia Tenggara pemeriksaan PCR telah dilakukan terutama pada penyakit demam tifoid dan *salmonellosis* yang angka kesakitannya masih relatif tinggi, sedangkan bila dikerjakan melalui pemeriksaan perbenihan hasil pemeriksaannya cukup rendah. Informasi dari beberapa kepustakaan ternyata menunjukkan bahwa PCR memberi harapan keberhasilan dalam penentuan diagnosis secara tepat, cepat, sedangkan cara mengerjakannya relatif sederhana. PCR dapat digunakan sebagai alat diagnostik, dengan mengacu kepada sifat hasil pemeriksaannya yang pernah diteliti.

1. Kepekaan PCR, telah dibuktikan oleh Zhu et al.(1996) dengan amplifikasi genom *S.typhi*, pada 30 siklus PCR. Kepekaan penemuan dengan cara ini adalah 0,1 pg *S.typhi* murni atau kira-kira sama dengan 40 sel *S.typhi* pada *spike* sampel makanan. Kepekaan yang tinggi tersebut karena :

- a) PCR dapat menemukan DNA *S.typhi* paling sedikit 1-10 sel bakteri per 1-100 ml darah.
 - b) Terdapat salinan (*copy*) sebanyak 10^4 cetakan gen rRNA dari tiap sel yang berasal dari sebagian besar spesies bakteri (Barry et al.1990).
2. Kekhasan (spesifitas) PCR tergantung pada pasangan primer yang digunakan (Zhu et. Al., 1996).

Sifat spesifitas dan sensitivitas PCR yang tinggi itu jelasnya karena :

- a) Sasaran urutan DNA dari primer (oligonukleotida) hanya dimiliki oleh mikro-organisme penyebab,
- b) Gen rRNA *S.typhi* sebagai sasaran DNA untuk amplifikasi , kepekaan dapat mengenali 1 pg *S .typhi* dari pembenihan murni, tetapi kekhasan dan kegunaan klinisnya perlu diteliti lebih lanjut.

Hasil yang diperoleh penulis sebagai berikut :

- (1) Pada penentuan konsentrasi genom DNA *S.typhi*, PCR mampu mendeteksi sampai 40 ng (lihat gambar 5.16), padahal tiap sel *S.typhi* mengandung kira-kira $3,48 \times 10^{-3}$ *S.typhi* pg genom DNA, sedangkan deteksi genom murni DNA sesuai dengan 29 genom (0,1 pg) (Zhu,1996).
- 2) Dengan primer 23 S r RNA diperoleh hasil pemeriksaan PCR yang hanya terdapat pada genom DNA *S. typhi*, sedangkan yang *non Salmonella spp* tidak menampakkan pita (*band*) pada elektroforegram.
- 3) Dengan primer *Omp 3 & 4* diperoleh hasil amplifikasi pada *S.typhi*, *S.paratyphi C* ,*S.enteridis*;
- 4) *Primer sifA* mengamplifikasi *Salmonella spp*.

- 5) *rfbs* terutama pada *S.typhi*. Dari primer yang lain memberi amplifikasi pada beberapa genom DNA *Salmonella spp.* dan patogen enterik lain (lihat gambar 5.2, 5.4, 5.12 dan tabel.5.2).
- 6) Pada primer lain disamping yang telah disebutkan diatas memberi amplifikasi pada beberapa genom DNA *Salmonella spp* ,dan patogen enterik lain (lihat gambar 5.2, 5.4, 5.12 dan tabel 5.2).

Jadi berbagai primer-primer yang penulis coba dalam penelitian ini ternyata yang memberikan amplifikasi yang paling khas pertama *rfbs* 129 &130 disusul *rfbs* 128 & 165. Sayangnya urutan DNA (*DNA sequence*) walaupun sudah diusahakan , tidak dapat diperoleh sehingga tak dapat dipakai pada populasi I dan II yang dipakai dalam penelitian ini.

6.2.2 Rumusan teori PCR untuk diagnosis demam tifoid

Dengan memperhatikan laporan penelitian lain yang sejenis pada pelbagai acuan pustaka yang menggunakan populasi penderita yang diduga tifoid dapat disusun permasalahan pemeriksaan laboratoris penunjang diagnosis demam tifoid.

Dari telitian yang dilakukan perihal pemeriksaan laboratoris penunjang diagnosis demam tifoid didapatkan **gambaran fakta** peranan PCR dalam diagnosis demam tifoid dan keterlibatannya dalam menunjang diagnosis demam tifoid sebagai berikut:

1. Uji PCR pelacakan tekniknya cepat karena kepekaannya tinggi untuk melacak DNA *S.typhi*,
2. Uji PCR pelaksanaan tekniknya sederhana , cukup diperlukan sepasang primer yang sesuai dengan sasaran yang berada pada *S.typhi*, sehingga hasil

amplikasi yang ditemukan hanya khas dimiliki oleh *S. typhi*.

Bahan uji PCR adalah DNA yang disalin kembali (*reverse transcribed*) dari RNA, sehingga didalam proses PCR akan melacak organisme yang memiliki bahan genetik RNA. Cara tersebut sangat bermanfaat, apabila mikroorganisme penyebab penyakit sukar diisolasi , keberadaanya tidak pasti dan memerlukan waktu untuk dapat menemukannya. Untuk menyelesaikan kesulitan deteksi *S. typhi* tersebut dapat dilakukan uji PCR dengan proses bertingkat. Dengan melacak DNA yang berasal dari *S. typhi* melalui tahapan denaturasi, aniling dan eksistensi untuk membentuk DNA baru dengan pasangan primer. Seri ini berlangsung beberapa kali selama beberapa jam , kemudian akan membentuk berjuta-juta DNA baru. Hasil produksi amplifikasi ini disebut **amplikon** yang dapat diperiksa dengan mata telanjang melalui elektroforese.

Hal yang semula merupakan dugaan saja, setelah selesainya telitian dan pengkajian hipotesis diperoleh pedoman yang memungkinkan dugaan tersebut menjadi sesuatu yang benar dan dapat dianggap sebagai teori penunjang diagnosis demam tifoid dan yang dapat dibuktikan sebagai berikut :

1. Diagnosis demam tifoid dapat ditentukan melalui pemeriksaan PCR dari hasil primer yang direkayasa melalui beberapa primer untuk menentukan primer mana yang sesuai dengan sasaran DNA *S. typhi*.
2. Uji PCR dapat mengenali atau menemukan DNA *S. typhi* dengan primer oligonukletida sintetis yang mempunyai sasaran gen DNA dari *S. typhi*.

6.3 Temuan penelitian dengan hasil penelitian sebelumnya serta bagaimana kaitannya dengan penelitian ini

Untuk pertanggung jawaban uji laboratorium harus dinilai dari beberapa segi (Handojo,I.,1988):

6.3.1 Validitas:

1. Kesahihan dalam (validitas internal) pemeriksaan laboratoris, meliputi:
 - a. daya lacaknya (sensitivitas laboratoris)
 - b. ketepatannya (akurasinya)
 - c. ketelitiannya (presisinya)
2. Kesahihan luar (validitas eksternal) pemeriksaan klinis, meliputi:
 - a. nilai diagnostiknya , terdiri dari;
 - 1) kepekaan (sensitivitas) diagnostik,
 - 2) kekhasan (spesitifitas) diagnostik,
 - 3) ketepat-gunaan (efisiensi) diagnostik,
 - 4) nilai ramal positif diagnostik, dan
 - 5) nilai ramal negatifnya,
 - b. nilai pemantauannya.

6.3.1.1 Penjabaran validitas interna (laboratoris)

Validitas internal pada penelitian ini terpenuhi pada :

1. Daya lacak (sensitivitas laboratoris) PCR yang tinggi karena dapat melacak sasaran DNA sampai 0,1-1 pg (David,et al,1992 ,Zhu, et al, 1996), hasil yang diperoleh penulis 40 ng (gambar 5.15)
2. Ketepatan (akurasi)

- a Akurasi yang tinggi ditunjukkan oleh uji PCR yang menggunakan primer *rfbs* dan *Omp 3 & 4* (dapat dilihat gambar 5.11 dan tabel 5.2) mengamplifikasi DNA *S.typhi* , kecuali pada primer *rfbs* yang hanya mengamplifikasi *S. typhi* saja. Akurasi tertinggi ditunjukkan oleh primer *rfbs*129/130, disusul primer 128/165 (lihat gambar 5.10,5.11, dan tabel 5.2) dengan primer *Omp 3 & 4* disamping *S.typhi* dapat untuk melacak *S paratyphi C* dan *S. enteridis*. (lihat tabel 5.2 dan 5.4, gambar 5.2) didapatkan bahwa secara statistik antara *Omp 3 & 4* dan *rfbs* pada tabel 5.3 kedua primer tidak bermakna $p > 0,05$, artinya keduanya dapat digunakan untuk diagnostik demam tifoid, tapi hal tersebut perlu diteliti lebih lanjut. Primer *Omp 3&4* dan *rfbs* spesifitas setaraf terhadap DNA *S.typhi* (lihat tabel 5.2, 5.3) ,tetapi pada DNA *Salmonella spp* dan demam yang diketahui sebabnya kelihatannya *Omp 3&4*, kurang khas dibandingkan primer *rfbs*.
- b Dilakukan hybridisasi untuk menguji spesifitas genom DNA dan kondisi PCR pada membrane nilon (hybon) , untuk meyakinkan bahwa hasil amplifikasi berasal dari *S.typhi* (lihat gambar 5.17).
- c DNA *sequencing* untuk meyakinkan hasil amplifikasi PCR, didapatkan urutan nukleotida yang serasi dengan primer yang mengamplifikasi (lihat gambar 5.18).
- d Primer *Omp 3&4* dan *rfbs* spesifitas setaraf terhadap DNA *S.typhi* (lihat tabel 5.2, 5.3) ,tetapi pada DNA *Salmonella spp* dan

demam yang tidak diketahui sebabnya kelihatannya *Omp 3&4*, kurang khas dibandingkan primer *rfbs*.

3. Ketelitian (presisi)

Uji presisi dilakukan dengan melakukan amplifikasi ulang pada beberapa sampel yang sama, bila tidak berbeda berarti hasil amplifikasi ketelitiannya (presisi) baik. Pada penelitian diulang pada beberapa sample baik yang hasil positif dan negatif nya tetap tak berubah.

6.3.1.2. Penjabaran validitas eksterna (klinis)

Pada penelitian ini kami tidak menilai efisiensi sebab penelitian ini adalah penelitian laboratorium, dimana kami menerima sampel dengan kriteria dan persyaratan penderita yang diduga demam tifoid dan demam non tifoid.

Kepekaan untuk diagnosis amat tinggi (82 %) bila dibandingkan dengan uji Widal ,maka kepekaan diagnosis demam tifoid berbeda bermakna ($p < 0.001$). **Spesifisitas** diagnosis uji PCR untuk demam tifoid juga tinggi 98 %. Dibandingkan dengan uji serologis Widal , **spesifisitas** diagnostik dari uji PCR untuk demam tifoid berbeda bermakna ($p < 0.001$). Efisiensi diagnostik dari uji PCR untuk demam tifoid juga tinggi : 100 % dan dari data-data tersebut di atas terbukti hipotesis pertama maupun hipotesis kedua dari penelitian ini.

Seperti telah dikemukakan pada Bab 2 tentang penelitian uji PCR yang telah ada, pada penelitian ini penulis menemukan kekhasan rekayasa primer PCR Yaitu perbandingan antara PCR dengan *Omp3 & 4*, *sifA*, *rfbs* dan primer lain terhadap *Salmonella spp*. Suatu primer spesifik, apabila ia memberikan amplifikasi sesuai dengan fragmen yang diamplifikasinya

6.3.2. Perbandingan antara PCR dengan *Omp3 & 4*, *sifA*, *rfbs* :

1. *Omp3 & 4*, mempunyai 20 nukleotida, dengan hasil amplifikasi 492 bp
2. *sifA*, mempunyai 30 nukleotida, dan hasil amplifikasi 500 bp (Stein, 1995)
3. *rfbs* oligonukleotida dengan ukuran produk amplifikasi sebesar 250 bp

Dari rangkuman hasil rekayasa atau penentuan primer terhadap genom *Salmonella spp.* dan Gram negatif lain, ternyata primer *Omp3 & 4*, *sifA*, *rfbs* yang khas bereaksi dengan DNA *Salmonella spp.*

Sedangkan primer *rfbs* pada hasil PCR tampak positif hanya pada *S.typhi* saja, dengan demikian primer *rfbs* dapat digunakan sebagai alat penentu diagnostik demam tifoid.

Gene *rfbs* rupanya hanya dimiliki oleh *S.typhi* sehingga pada amplifikasi khususnya terhadap *S.typhi* hasilnya sangat khas. Sedangkan oligonukleotida yang lain (primer sintetik lainnya pada penelitian ini), rupanya kurang spesifik, karena masih memberikan amplifikasi terhadap strain *Salmonella* dan beberapa enteropatogen lain.

6.3.3 Temuan pada penelitian teknik PCR untuk diagnosis demam tifoid

Uji kekhasan (spesifitas) dari primer-primer PCR untuk *Salmonella spp.* dan Gram negatif lain dapat dilihat pada gambar 5.2. sampai 5.14 dan dibaca pada tabel 5.2 dan tabel 5.3.

Kekhasan rekayasa primer PCR yang telah ditemukan dari hasil penelitian ini :

- (a) *Omp 3 & 4*, *sifA* dan *rfbs* sebagai primer dapat digunakan untuk melacak DNA *Salmonella spp.* Sedangkan *sifA* khusus untuk melacak DNA *Salmonella spp.* yang ditemukan dalam bahan makanan atau minuman yang tercemar

(Gambar 5.2., 5.4, 5.11, 5.12, tabel 5.2.),

- (b) Pada tabel 5.4. primer *Omp 3 & 4* kemampuan dalam diagnosis demam tifoid (perbenihan *S.typhi* +f) ,95,5% (43/ 45) dibandingkan dengan uji Widal 62 % (28/45)
- (c) *rfbs* spesifik untuk melacak khusus DNA *S.typhi* (Gambar 5.12, tabel 5.2 dan tabel 5.3. Antara primer *Omp 3 & 4* dan *rfbs* dalam menentukan diagnosis demam tifoid untuk melacak DNA *S.typhi*, tidak terdapat perbedaan $p>0.05$)
- (e) PCR sebagai sarana pengganti perbenihan apabila cara tersebut mempunyai kepekaan rendah , tidak terdapat perbedaan cara perbenihan dan PCR (tabel 5.4.)
- (f) PCR dapat melacak *S.typhi* dalam waktu singkat (7-10 jam) dibandingkan dengan perbenihan 3 -5 hari; uji Widal 24 jam.
- (g) Derajat pelacakan PCR yang tinggi diperoleh dari penentuan Genom *S.typhi* paling rendah 40 ng (Gambar 5.14)

6.3.4 Penggunaan PCR dalam uji serum penderita dan dalam uji saring (screening)

Pada tabel 5.4 dapat ditunjukkan bahwa:

1. Antara pemeriksaan perbenihan uji Widal dalam menentukan diagnosis demam tifoid pada penderita dengan hasil perbenihan positif ternyata terdapat perbedaan bermakna dengan PCR ($p< 0.0001$);
2. Antara pemeriksaan perbenihan dan uji Widal dalam menentukan diagnosis demam tifoid hasil negatif ternyata terdapat perbedaan dengan PCR ($p< 0.0072$).

3. Antara uji Widal dengan PCR pada perbenihan hasil *S.paratyphi A* positif dalam hal ini tidak terdapat perbedaan ($p=1.000 > 0.05$).
4. Antara uji Widal dan PCR dalam menentukan diagnosis demam tifoid (perbenihan *S.typhi* positif dan negatif), terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.001$)

Dari kedua hasil tersebut ad 1 dan ad 2 diperoleh kesimpulan bahwa nilai diagnosis uji Widal adalah rendah.

Penulis memperoleh hasil amplifikasi PCR yang mampu menemukan genom *Salmonella*, sebagai yang tercantum pada tabel 5.2.dan 5.3:

1. Semua primer peka terhadap *S.typhi*: *Omp 1&2*, *Omp 3&4*, *Oph 1 &2*, *Oev1&2*, *Oev 3&4*, *Osl &2*, *Os 3&4*, *rfbs128 &165*, *rfbs 129 & 130*, *Chin 304 1 & 2* dan *sifA*
2. Kemampuan menemukan daya lacak PCR dapat sampai *0,4 ng genom DNA S.typhi* (lihat gambar 5.14).
3. Primer *sifA* menghasilkan amplifikasi pada semua *Salmonella spp* kecuali pada entero patogen *E.coli*, *K.pneumoniae*, *Shigella sonnei* (Gambar 5.2.dan tabel 5.2.).
4. Primer *rfb 128 & 165* memberikan amplifikasi pada genom DNA , *S.typhi*, *S.paratyphi A* (lihat gambar 5.10 dan tabel. 5.2.).
5. Primer *rfb 129 & 130* memberikan amplifikasi pada genom DNA *S.typhi* saja, (lihat gambar 5.12 dan tabel.5.2).

Penulis memperoleh dari primer *Omp 3 & 4* hasil amplifikasi pada *S.typhi*, *S.paratyphi C*, *S.enteridis*. Sedangkan dari primer yang lain memberikan

amplifikasi pada beberapa genom DNA *Salmonella spp.* dan patogen enterik lainnya (lihat gambar 5.2 -5.13 dan tabel 5.2.)

Untuk melakukan uji PCR sebagai penentuan kekhasan terhadap genom DNA *Salmonella sp* dan *S.typhi* yang berasal dari Laboratorium Patologi klinik, RSUD Dr. Soetomo, Surabaya dan Laboratorium IPT Unimal, Kuala Lumpur, Malaysia, penulis dalam penelitian ini menemukan bahwa:

1. Primer *rfbs* tampak pada hasil PCR positif, hanya bila ada *S.typhi* saja, sehingga primer *rfbs* dapat digunakan sebagai alat penentu diagnostik demam tifoid yang khas (tabel 5.2.).
2. Primer *Omp3 &4* tampak pada hasil PCR positif hanya pada *S.typhi* dan *S.paratyphi C* dan *S.enteridis* (tabel 5.2).

Sedangkan pada tabel 5.1. tampak hasil sebagai berikut:

1. Antara *Omp3 &4* dan *rfbs* tidak terdapat perbedaan dalam deteksi *S.typhi* ($p > 0.05$),
2. Terhadap *Salmonella* non tifoid, terdapat perbedaan ($p < 0.05$),
3. Terhadap non *salmonella* tidak terdapat perbedaan dalam deteksi DNA, tetapi pada penyebab demam yang tidak diketahui sebabnya antara *Omp 3 & 4* dan *rfbs* ,keduanya mempunyai perbedaan $p < 0,05$.

Memperhatikan perihal yang terakhir (ad 3) tersebut berarti harus hati-hati dalam penanganan pada kasus-kasus dengan demam semacam itu. Oleh karena itu dapat disarankan sebaiknya pemeriksaan dengan cara PCR digunakan primer *rfbs* karena lebih khas terhadap *S.typhi* saja.

Pada tabel 5.5 dapat dibaca bahwa

1. Pemeriksaan perbenihan dengan hasil positif ternyata terdapat perbedaan antara PCR dan uji Widal dalam menentukan diagnosis demam tifoid ($p < 0.0001$),
2. Pemeriksaan perbenihan dengan hasil negatif ternyata terdapat perbedaan antara PCR dan uji Widal dalam menentukan diagnosis demam tifoid ($p < 0.0072$)
3. Pemeriksaan perbenihan hasil *S.paratyphi A* positif (bukan *S.typhi*) ternyata tidak terdapat perbedaan antara PCR dan uji Widal dalam menentukan diagnosis demam tifoid ($p = 1.000 > 0.05$)
4. Pada keadaan perbenihan *S.typhi* yang negatif, berarti antara uji Widal dan PCR tidak dapat terdapat perbedaan .

Pada hal ad. 4 mungkin disebabkan penderita yang demam itu bukan karena tifoid , sehingga hasilnya sukar dibedakan.

Pada tabel 5.6 dapat dibaca bahwa hasil perbenihan *S.typhi* dan uji Widal yang negatif pada kasus non tifoid, yaitu hasil PCR yang positif 5,32 % (9/169), sedangkan dari 8 kasus *S.paratyphi A* semua hasil PCR negatif, demikian pula pada 38 penderita malaria hasil PCR semua negatif.

6.4 Kepraktisan uji PCR untuk demam tifoid

1. Waktu pemeriksaan sampai memperoleh hasil 10 jam , (lebih pendek dari uji Widal dan perbenihan darah).
2. Jumlah sampel yang diambil sangat kecil (100 μ l)
3. Tidak perlu menentukan nilai batas: harga normal, *cut off value*
4. Tidak membedakan letak geografis, endemis dan nonendemis
5. Tidak berpengaruh penderita sudah minum antibiotika atau belum

6. Bahan atau reagen pemeriksaan dapat dimanfaatkan untuk pemeriksaan lain, kecuali berbeda primer yang digunakan
7. Pengaruh vaksinasi dapat diabaikan.
8. Bahan DNA murni maupun tidak dapat digunakan dalam reaksi amplifikasi

Penjelasan:

1. Dari cara pemeriksaan dan proses pemeriksaan laboratorium memerlukan waktu lebih pendek dari uji Widal dan perbenihan yaitu:
 - a. Sampling dan pemusingan darah 15 menit
 - b. Pengelolaan ekstraksi DNA 4 jam
 - c. Pemeriksaan PCR, mesin thermalcycler 3 jam
 - d. Electroforese dan pemeriksaan visual, UV 1,5 jam
 - e. Jumlah waktu yang digunakan per reaksi 8,5 jam
2. Jumlah sampel yang diambil sangat kecil (100 μ l), untuk reaksi PCR jumlah sampel cukup kecil hanya diperlukan bahan 50 - 100 μ l .
3. Tidak perlu menentukan nilai batas: harga normal, (*cut off value*).
Hasil reaksi PCR dibaca pada agarose gel dengan mata telanjang, ada atau tidak ada hasil amplifikasi tampak pita (band) putih pada agarose gel.
4. Tidak membedakan letak geografis, endemis dan nonendemis.
Berbeda pada penentuan titer antibodi harus mengetahui dahulu nilai ambang batas daerah yang bersangkutan, endemis atau non-endemis.
5. Tidak berpengaruh penderita sudah minum antibiotika atau belum.
Penderita minum antibiotika atau tidak mikro-organisme penyebab tetap ada baik yang masih hidup atau sudah mati, jadi penentuan DNA masih

dapat dilacak.

6. Bahan atau reagen pemeriksaan dapat dimanfaatkan untuk pemeriksain lain, kecuali berbeda primer yang digunakan.

Bahan untuk pemeriksaan reagen PCR sama tidak hanya untuk penentuan satu macam mikroorganisme tapi dapat digunakan untuk bermacam-macam pemeriksaan PCR yang lain , jadi bermanfaat untuk kepentingan diagnostik atau pelacakan DNA lain penyebab.

7. Pengaruh vaksinasi dapat diabaikan

Pemberian vaksinasi akan membentuk antibodi humoral baik IgG maupun IgM , pada pemeriksaan uji Widal hal tersebut dapat mempengaruhi positif palsu .

8. Bahan DNA murni maupun tidak dapat digunakan dalam reaksi amplifikasi

9. Pada pemeriksaan PCR dapat digunakan pemeriksaan untuk menentukan sasaran DNA, sampel dapat diproses langsung maupun harus diekstraksi (dimurnikan)

6.5.Keterbatasan penelitian yang dilakukan dan saran bagi penelitian selanjutnya

Memperhatikan kendala pada pelaksanaan dan kekurangan yang dijumpai pada penelitian uji PCR untuk diagnosis demam tifoid, penulis berpendapat bahwa masih harus dilakukan penelitian di bidang teknis laboratoris. Hal itu tercermin kepada perihal yang penulis rangkum di bawah ini.

6.5.1 Keterbatasan penelitian yang dijumpai

Kekurangan yang dijumpai dalam penelitian uji PCR berupa keterbatasan

pelaksanaan maupun kendala masalah teknis dapat dirangkum di bawah ini.

6.5.1.1 Masalah -masalah yang dihadapi

Keterbatasan pelaksanaan :

1. Keterbatasan sampel yang dikelola hanya berasal dari penderita yang berobat atau memeriksakan ke laboratorium rumah sakit.
2. Keterbatasan dijumpai adalah sehubungan *Japanese primer* yang dipakai tidak diketahui urutan DNA- nya, padahal punya nilai diagnostik tinggi.
3. Keterbatasan memantau penderita yang rawat inap dengan pemeriksaan PCR, sebab sukar teknis pelaksanaannya.
4. Keterbatasan sampel karena kebanyakan penderita sudah berobat sehingga hasilnya kurang memadai.

Masalah teknis :

1. Tenaga yang mengerjakan harus trampil, teliti karena pemeriksaan menggunakan bahan yang sangat sedikit (volume kecil).
2. Diharapkan aliran listrik tidak putus karena dapat mempengaruhi hasil siklus amplifikasi, walaupun teknik pengelolaan cukup sederhana hanya dengan pemanasan dan pendinginan.
3. Biaya dari bahan pemeriksaan yang cukup tinggi perlu dikelola dengan baik, sehingga tidak terjadi pemborosan. Bila dikehendaki pemeriksaan PCR, maka diharapkan sampel yang akan diperiksa harus terpilih betul (selektif) dengan indikasi yang tepat.
4. Pencegahan cemaran dalam pengerjaannya, yaitu penanganan dilakukan secara aseptis untuk mencegah masuknya cemaran baik di ruangan tempat bekerja

dilakukan secara aseptis untuk mencegah masuknya cemaran baik di ruangan tempat bekerja maupun pada peralatan yang digunakan .

5. Pemantapan mutu hasil pemeriksaan (*quality control*) dilakukan untuk mendapatkan ketepatan dan kecermatan yang sempurna. Hal itu dimaksud untuk mencegah hasil-hasil yang tidak diharapkan yang mungkin dapat timbul.
6. PCR sukar membedakan sel kuman yang sudah mati dengan yang masih hidup, oleh karena itu dalam mendiagnosis demam tifoid sebaiknya digunakan pengambilan sampel pada minggu pertama atau pada masa penyembuhan untuk menentukan pembawa sakit.

6.5.1.2 Keraguan hasil pemeriksaan PCR

Keraguan akan hasil pemeriksaan PCR dapat terjadi apabila:

1. Pada hasil pemeriksaan PCR dengan diagnosis kemungkinan sembuh, masih ditemukan DNA; hal tersebut terjadi apabila pembersihan dalam tubuh belum sempurna. DNA juga dijumpai pada awal sakit maupun saat kesembuhan;
2. Terdapat pita tambahan (*extra band*) pada pembacaan elektroforese gel kemungkinan karena hasil amplifikasinya kurang sempurna;
3. Primer (oligonukleotida) kurang spesifik, maka hasil amplifikasi tidak sempurna atau tidak ada

6.5.1.3 Kesenjangan / hal yang masih kurang jelas pada hasil pemeriksaan PCR

Walaupun terdapat keunggulan hasil cara PCR dibandingkan dengan hasil cara pemeriksaan laboratorik klinik lainnya, perlu diperhatikan hal-hal yang dapat merupakan kendala:

membutuhkan ruang kerja terpilah-pilah antara ekstraksi dan penanganan persiapan amplifikasi

2. Pelaksanaan harus cermat, teliti dengan cara sederhana, denaturasi, aniling dan ekstensi.
3. Bahan-bahan yang menghambat dalam sampel perlu difikirkan karena dapat menghambat PCR dan produk amplifikasinya.
4. Pada penelitian yang penulis kerjakan ini digunakan standar emas perbenihan darah, sehingga diperoleh kepekaan yang rendah (40%). Hal tersebut dilaksanakan karena tidak mungkin dapat dilakukan dengan perbenihan dengan uji kepekaan tinggi seperti perbenihan aspirasi sumsum tulang sebab faktor manusiawi.

6.5.2 Saran bagi penelitian dan penerapan teknik PCR selanjutnya

Memperhatikan semua hal tersebut di atas maka pemeriksaan cara PCR perlu dipertimbangkan dengan matang apabila akan diterapkan di negara berkembang yang keadaan lingkungan kerjanya dapat menjadi kendala keberhasilan cara tersebut.

6.5.2.1 Masa depan PCR dalam diagnosis penyakit dan format-format PCR baru yang lebih praktis pada penelitian

1. PCR merupakan salah satu cara untuk penunjang diagnosis yang untuk diagnosis pada kasus dengan pemeriksaan konvensional sukar ditemukan.
2. PCR dapat dipakai untuk meramal kekebalan kuman patogen terhadap beberapa antibiotika
3. PCR dapat dipakai untuk merekayasa antigen untuk pembuatan vaksin

6.5.2.2 Aspek praktis atau penggunaan PCR

1. Pada penelitian lebih lanjut perlu dipertimbangkan beberapa cara amplifikasi yang lebih praktis dan murah
2. *Primer Omp 3 & 4* dapat digunakan untuk uji PCR pada kasus yang diketahui demam tifoid atau *salmonellosis*.
3. *Primer sifA* dapat digunakan untuk uji PCR pada kasus dicurigai *salmonellosis* atau deteksi *Salmonella spp* pada bahan makanan.
4. *Primer rfb* dapat digunakan untuk uji PCR pada kasus yang tak diketahui demam tifoid atau bila pada perbenihan secara konvensional sukar ditemukan *S.typhi*.

6.5.2.3 Hasil yang diperoleh peneliti-peneliti sebelumnya kaitannya dengan hasil penelitian ini

Tujuan para peneliti (Chaudry et.al.,1992, David,L.P.1992, Zhu et al,1996.) untuk menggunakan penelitian uji coba primer atau memilih primer mana yang paling sesuai sasaran gen DNA *S.typhi* . Selain untuk diagnosis juga digunakan untuk melacak makanan yang mengandung *S. typhi* atau *Salmonella spp*.

Apa yang telah dilakukan penulis bersama peneliti tersebut di atas adalah sama, tetapi berbeda tujuannya. Penulis mengutamakan penelitian pelacakan DNA *S.typhi* sebagai diagnosis pasti demam tifoid. Hal itu dilakukan karena semakin sukarnya melakukan isolasi pada penderita-penderita yang diduga tifoid.

6.5.2.4 Penelitian tentang teknik PCR selanjutnya

1. Gen *Omp,sifA* dan *rfbs* terdapat disemua *Salmonella* , gen *sifA* terlibat dalam patogenesis demam tifoid . Sedangkan *rfbs* dan *Omp* penting dalam

1. Gen *Omp,sifA* dan *rfbs* terdapat disemua *Salmonella* , gen *sifA* terlibat dalam patogenesis demam tifoid . Sedangkan *rfbs* dan *Omp* penting dalam peranan semasa sakit demam tifoid. Ketiga gen ini belum pernah diuji tuntas terhadap penderita demam tifoid .Oleh sebab itu digunakan sebagai primer untuk pemeriksaan PCR dalam menentukan diagnosis demam tifoid.
2. Perlu diteliti lebih jauh apakah *S.typhi* masih menjadi permasalahan di Indonesia, sehubungan adanya perbedaan sifat biomolekuler dengan spesies yang ada di daerah atau negara lain ?.

6.5.2.5 Biaya pemeriksaan diagnostik untuk demam tifoid

Harga bahan per th. 1995-1996 adalah sebagai berikut:

Reagen habis TaqPolymerase Rp 400.000,-/ per 500 unit

Enzym dNTP Rp.400 000/ per 100 pemeriksaan

MgCl₂ Rp.200.000.-

Buffer 10xPCR Rp.200 000,-

Polyacrylamide gel Rp.50 000,-/gram

Gel loading dye + Marka Rp.250 000,-

Biaya pemeriksaan pertest Rp.25 000 - 50 000,-/tes hasil uji cukup 1x minggu pertama

Kultur + Widal Rp 20 000,-/ kali pemeriksaan bila negatif diulang 1-2 x/ minggu ,biaya keseluruhan : 2 -3 x Rp 20 000

BAB 7

Bab 7**KESIMPULAN DAN SARAN****7.1. Kesimpulan**

Dari pembahasan dalam bab 6 dapat dibuat sintesis teori pemeriksaan PCR untuk diagnosis demam tifoid dalam dua pandangan (aspek) keilmuan. Berdasarkan telitian tentang PCR dalam diagnostik demam tifoid dan pembahasan hasilnya dalam bab 6 dapat dibuat simpulan yang merupakan jawaban terhadap masalah yang telah diajukan, serta bahan saran perbaikan dalam melakukan diagnosis demam tifoid untuk populasi yang diduga demam tifoid.

Sintesis teori pemeriksaan PCR untuk diagnosis demam tifoid tertuang dalam dua pandangan (aspek) keilmuan di bawah ini.

7.1.1 Jawaban terhadap rumusan masalah penelitian dan penjelasan lingkup tujuan penelitian ini

Memperhatikan perihal permasalahan pemeriksaan laboratoris konvensional yang waktu pemrosesan dapat lebih dari 3 hari dan hasil kepekaannya yang rendah (hanya mencapai 40 %) yang berdampak kepada kelambatan kepastian diagnosis dan pengobatan yang tidak sesuai, maka dari hasil penelitian ini dapat diberikan jawaban atas pertanyaan-pertanyaan yang terkandung dalam rumusan permasalahan dan penjelasan dalam lingkup tujuan penelitian, seperti di bawah ini:

1. Teknik PCR mempunyai nilai diagnostik yang lebih andal (sensitif dan spesifik) untuk menunjang diagnosis demam tifoid.
2. Uji PCR lebih peka dan khas bila dibandingkan dengan uji serologis Widal.

7.1.2 Penjelasan dalam lingkup tujuan penelitian

Selanjutnya dapat diberikan penjelasan hasil penelitian yang berkaitan dengan tujuan penelitian sebagai berikut :

1. Memperhatikan hasil pemeriksaan amplifikasi DNA (PCR) dan perbenihan darah sebagai standar emas ternyata kepekaan PCR cukup tinggi (95,6%) sedang kekhasan mendekati 100 % untuk populasi penderita rumah sakit atau sejenisnya; amplifikasi DNA (PCR) tidak berbeda kepekaannya dengan cara isolasi *S.typhi* melalui perbenihan ($p > 0.05$).
2. Kepekaan antara diagnosis laboratorik cara penentuan antibodi (uji serologis Widal) dengan penentuan amplikasi DNA terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.001$).
3. Pemeriksaan amplifikasi DNA (PCR) dapat digunakan untuk diagnosis demam tifoid secara pasti , karena hasil temuannya adalah fragmen DNA *S.typhi* yang diamplifikasi oleh primer yang sesuai; sehingga pemeriksaan amplifikasi DNA (PCR) dapat digunakan sebagai pengganti hasil perbenihan yang negatif .
4. Pemeriksaan amplifikasi DNA tidak memberi reaksi silang dengan *Salmonella spp.* lain, karena sasaran DNA yang diamplifikasi adalah hanya yang dimiliki oleh mikro-organisme penyebab, sesuai dengan primer masing-masing
5. Hasil penelitian dapat digunakan untuk diagnosis demam tifoid atau *salmonellosis*, pada penelitian sebelumnya terdapat sasaran *gen S.typhi* berbeda dengan yang digunakan pada penelitian ini .Hampir semua sasaran

gen dapat melacak *salmonellosis* tetapi tidak selalu dapat digunakan hanya untuk *S.typhi* saja.

6. Kekhasan dan kepekaan (kespesifikan dan kesensitifan) tergantung kepada masing-masing primer ? Hasil PCR dengan primer *rfs* (Japan) khas spesifik hanya mengamplifikasi *S.typhi* saja , tetapi dengan primer *Omp 3&4* pada amplifikasi tidak terdapat perbedaan bila digunakan untuk diagnosis demam tifoid ($p > 0,05$).

Pada telitian yang sudah ada belum pernah ada penelitian korelasi antara PCR dan uji Widal , yang sebenarnya kurang dapat dipercaya hasilnya , masih rutin dilakukan oleh laboratorium klinik pemerintah dan swasta. Kendala yang dijumpai dalam pemeriksaan laboratorium konvensional berdasarkan penelitian ini ternyata dapat diatasi dengan pendekatan aspek biomolekuler.

7.2. Saran

Implikasi hasil penelitian terhadap pengembangan ilmu pengetahuan dan penggunaan praktisnya dengan memperhatikan hasil penelitian dalam pemanfaatan teknik PCR untuk sarana pengenalan / penemuan penyebab dan diagnosis penyakit, maka pemeriksaan PCR disarankan untuk dapat dikembangkan :

1. Pemakaian cara uji PCR difikirkan juga untuk dikembangkan guna memecahkan kasus bermasalah ,kasus fatal atau kejadian luar biasa (out break) ,dapat dipakai sebagai pengganti perbenihan yang sukar dipecahkan dengan pemeriksaan biasa.
2. Perlu diteliti lebih lanjut pemeriksaan PCR dalam upaya untuk pengembangan dalam membuat vaksin,

3. Pemeriksaan PCR juga perlu dikembangkan dalam upaya menemukan mikroorganisme yang rentan terhadap antibiotika ,
4. Untuk keperluan penelitian diagnosis penyakit, pemeriksaan PCR merupakan sarana penunjang diagnostik yang andal sehingga dapat digunakan sebagai standar emas diagnosis demam tifoid, atau bila perlu dipakai sebagai pengganti cara perbenihan sumsum tulang yang bersifat invasif,
5. Pada kasus-kasus yang sukar dipecahkan dengan pemeriksaan biasa, dan
6. Guna mendukung pendataan yang cermat (akurat) tentang suatu penyakit infeksi, sehingga dapat diketahui keberhasilan taraf kesehatan penduduk di suatu negara.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Altweg M, 1995. Molecular typing of *Salmonella* species: Methods and applications. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** ,26 (Suppl.2) : 17 - 24
- Aniwati.L, 1991. Uji kepekaan Antimikroba dan konsentrasi Hambat Minimum Chloramphenicol dan Cyprofloxacin terhadap *Salmonella typhosa*, karya ilmiah akhir PPDS I Pathologi Klinik FK Unair, Surabaya
- Appasskij H, BunChuin N, Sarasombath S, Rungpitarangsi B, Manatsathit S, Komolpit P and Sukosol T., 1987. *Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Salmonella typhi protein antigen. J Clin Microbiol* 25 : 273 - 277
- Asraf M F, 1986. **Diagnostic Evaluation of Bacteriological Serological test in cases of typhoid fever, JAPI** 34 (5): 348-349
- Bangtrakulnonth A, Boonmar S, Rodma P, Samosornsuk S, Danbara H, 1995. *In Second Asia - Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors) ,hlm.233 – 234.
- Barclay GR dan Scott BB, 1987. Serological Relationships between Escherichacoli and Salmonella Smooth and Rough Mutant Lipopolysaccharides as Revealed by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay For Human Immunoglobulin G. Anti endotoxin Antibodies. **Infection and Immunity**, 55 (11): 2706 – 2714.
- Baron , EJ, Peterson LR, Finegold SM, 1994 . Enterobacteraceae, **Bailey and Scott's, Diagnostic Microbiology**, 9th Ed. Mosby, hlm. 362 –383.
- Bhutta ZA, 1995. *In Second Asia Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors),hlm. 85 – 87.
- Boekitwetan P, Susilo TS, Suryawidjaja JE, Sugiarto I, Lesmana M, 1992. *In Typhoid Fever , Profile, Diagnosis and Treatment in the 1990's* (Nelwan , editor) , hlm. 169 –180.
- Brade L, Nano FE, Schlecht S, Schramek S, Brade H., 1987. Antigenic and Immunogenic Properties of Recombinants from *Salmonella typhumurium* and *Salmonella minnesota* Rough Mutants Expressing in Their Lipopolysaccharidea Genus- Specific Chladial Epitope . **Infect and Immunity** 55 (2) : 482 –486.

- Calva E. and Puente JL, 1995. *In Second Asia - Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors), hlm.138 – 144.
- Calva E. and Puente JL, 1995. *In Second Asia - Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors) , hlm.246 –250.
- Cano R.J., 1993. Fluorescent DNA-Based Methods for Detection of Salmonella, *Lab.Medica Int* ,10: 25-33.
- Chaudhry R, Ray K, Kumar R, 1995. *In Second Asia-Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors), hlm.244 – 245.
- Choo KE, Lim WY, Razif AR, Ariffin WA, Oppenheimer SJ, Abraham J.,1992. *In Typhoid fever Strategies for the 90's World Scientific*. (Pang T, Koh CL, Puthuchearu edit.) Singapore, New Jersey, London, Hongkong, hlm, 200.
- Choo KE, Ong KH, Ismail A, ,1992. *In Typhoid fever Strategies for the 90's. World Scientific*. (Pang T, Koh CL, Puthuchearu edit.) Singapore, New Jersey, London, Hongkong, hlm. 215 .
- D'Aoust JY, 1995. *In Second Asia - Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors) , hlm.195 - 208.
- David , L.P., 1992. Evaluation of the Polymerase Chain Reaction (PCR) in the Detection of Salmonella typhi DNA. Dissertation Submitted to the Institute of Advanced Studies , University of Malaya , Kualalumpur, for the degree of Master of Biotechnology.
- David LP, Koh CL, Puthuchearu SD, Devi S, Pang T, 1991. *In Typhoid fever Strategies for the 90's. World Scientific*. (Pang T, Koh CL, Puthuchearu edit.) Singapore, New Jersey, London, Hongkong , hlm. 78-91
- Doran JL, Collinson SK, Burian J, Sarlos, G Todd ECD, Munro CK, Kay CM, Banser PA, Peterkin PI, dan Kay WW. 1993. DNA-Based Diagnostic Tests for *Salmonella* Species Targeting *agfA*, the Structural Gene for Thin, Aggregative Fimbriae, *J Clin. Microbiol.* 312 (9) : 2263 - 2273
- Ewing , W.H., 1982. **Isolation and Identification of Salmonella Shigella**, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, 8th ed. Atlanta, Georgia, hlm. 3 – 44

- Ezaki T, Itou K, Khan AQ, Hirose K, Miyake M, Hashimoto Y., 1995. *In Second Asia - Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors) , hlm.225 - 226 .
- Faundez G.,Aron L dan Cabello FC. ,1990. Chromosomal DNA,Iron Transport Systems,Outer Membrane Proteins, and Enterotoxin (Heat Labile) Production in *Salmonella typhi* Strains, *J Clin Microbiol* 28 (5), hlm. 894-897
- Flores IM, Bustamante V H, Puente J L dan Calva E.,1995. Cloning and Characterization of the *Salmonella typhi ompP* and *enz* Genes, *AsPac. J Mol Biol.Biotechnol*, 3 (2), hlm. 135-144.
- Gam LH, Devi S, Putucheary SD, Koh CL, Lachumanan R, Tay ST, Tan EL, Pang T.,1991. *In Typhoid fever Strategies for the 90's. World Scientific.* (Pang T, Koh CL, Puthucheary edit.) Singapore, New Jersey, London, Hongkong , hlm.182 – 187.
- Grovannoni S, 1991 .Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. John Wiley & Sons. (Stackebrant E, dan Goodfellow M edit.) Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, hal 177 – 201.
- Guiney DG, Fang FC, Krause M, Libby S, Buchmeier NA, dan Fierer J.,1995. Biology and Clinical Significance of Virulence Plasmids in *Salmonella* Serovars,*Clin. Infect. Diseases* 21 (Suppl 2): S146-151.
- Hadisapoetro S, 1992. *In Typhoid Fever , Profile , Diagnosis and Treatment in the 1990's* (Nelwan , editor) , hlm.95 – 104.
- Hardi S, Soeharyo H, Karnadi E, Kartinah dan Dolmans WMV, 1992. *In Typhoid Fever , Profile , Diagnosis and Treatment in the 1990's* (Nelwan , editor), hlm. 187 -195.
- Hashimoto Y, Itho Y, Fujinaga Y, Khan AQ, Sultana F, Miyake M et.al.,1995. Development of nested PCR based on the *ViaB* sequence to detect *Salmonella typhi*, *J Clin Microbiol* 33:J 775- 777.
- Hsu HS,1991. *In Typhoid fever Strategies for the 90's. World Scientific.* (Pang T, Koh CL, Puthucheary edit.) Singapore, New Jersey, London, Hongkong , hlm.148 –153.
- Isibasi A, Ortiz V, Vargas M, Paniagua J, Gonzales C, Moreno J, and Kumate J., 1988. Protection against *Salmonella typhi* Infection in Vargas, Mice after Immunization, with Outer Membrane Problems Isolated from *Salmonella typhi* : 9, 12 d Vi. *J of Infect Immun* 56: 2953-2459.

- Ismail A, Kader ZSA, Ong KH, 1992. *In Typhoid fever Strategies for the 90's World Scientific*. (Pang T, Koh Cl, Putucheary edit) Singapore, New Jersey, London , Hongkong, hlm 201 – 206.
- Ivanoff, 1994. **Evaluation of PCR in Salmonellae typhi**, University of Malaya (thesis)
- Johnson J.G, Kunz L.J, Barron W and Ewing WH.,1966.Biochemical Differentiation of the Enterobacteriaceae with the Aid of Lysine-Iron-Agar, **Applied Microbiol**, 14 (2): 212-217.
- Kaniga K, Trollinger D, dan Galan JE., 1995. Identification of Two Targets of the Type III Protein Secretion System Encoded by the *inv* and *spa* Loci of *Salmonella typhimurium* That Have Homology to the *Shigella* IpaD and IpaA Proteins. **J Bacteriol**. 177 (24): 7078 – 7085.
- Keuter M, Dharmana. E, Kullberg BJ, Schalkwijk C, Gasem MH, Seuren L, Djokomoeljanto R, Dolmas NWV, Bosch H v den, and Meer JMV van der., 1995. Phospholipase A2 is a Circulating Mediator in Typhoid Fever . **J of Infect Dis** 172: 305-8.
- Khosla SN, 1992. *In Typhoid Fever , Profile , Diagnosis and Treatment in the 1990's* (Nelwan , editor) , hlm.51 – 82.
- King C-C, You S. Chuang Y, Huang H and Tsai W-C., 1989. Community-Wide Epidemiological Investigation of a Typhoid Outbreak in a Rural Township in Taiwan, Republic of Cina, **International Journal of Epidemiology** 18 (1): 252 - 260.
- Laosombath ,1983. *In South Asean J Trop Med Pub Health* 14:2210-215.
- Lesmana M, Tjaniadi P, Lane EM, Subekti D, Burr DH, dan Hendarwanto, 1992. *In Typhoid Fever , Profile , Diagnosis and Treatment in the 1990's* (Nelwan , editor) , hlm.163- 168.
- Lolekha S., 1995. *In Second Asia - Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors), hlm. 77 - 79.
- Lumbiganon P, Kosalaraksa P, Tattawasart U, Wonglakorn L, Wilailuckana C, 1995. *In Second Asia - Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors) , hlm.94 – 95.
- Mabel TJ, dan Paniker CKJ, 1979. The role of Cell-Mediated Immunity in Typhoid **Asian Journal of Infectious Diseases** 3 : 69 –75.

- Mills S.D, dan Finlay BB, 1995. *In Second Asia - Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors), hlm.102 -109.
- Moehario LH, Bela B, Sudarmono P, 1995. *In Second Asia - Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors) , hlm.230 - 232 .
- Nelwan RHH, Hendarwanto dan Zulkarnain I, 1992. *In Typhoid Fever , Profile , Diagnosis and Treatment in the 1990's* (Nelwan , editor) , hlm. 149 – 156.
- O'Brian AD., 1982. Innate Resistance of Mice to *Salmonella typhi* infection. *Infection and Immunity* 38 (3): 948 - 952 .
- Olsen JE, Aabo S, Rossen L, 1995. *In Second Asia - Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors), hlm.222 - 224 .
- Ong KH, Ismail A, Choo KE, Kader ZK,1992. *In Typhoid fever Strategies for the 90's*. World Scientific. (Pang T, Koh CL, Puthucheary edit.) Singapore, New Jersey, London, Hongkong, hlm. 207 -214.
- Osborn dan Wu .1980. Proteins of the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 369 - 422
- Pang T, 1995. *In Second Asia - Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors) , hlm.213 – 216.
- Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, 1993. *Diagnostic Molecular Microbiology*. American Society for Microbiology. Washington DC., hlm. 389 – 393.
- Prihatini , Tandiya S, Joewono R.,1989.Hubungan perbenihan empedu dan uji Widal di RSUD dr.SUTOMO Surabaya., *Medika*,14: 1018-1020.
- Punjabi NH, 1995. *In Second Asia - Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors) , hlm.128 -132 .
- Pusponegoro AD, dan Syamsuhidayat ,1992. *In Typhoid Fever , Profile, Diagnosis and Treatment in the 1990's* (Nelwan , editor) , hlm.113 – 117.
- Rao RS, Sundararaj T, Murty SAN dan Kapoor SC.,1981. A study of drug resistance among *Salmonella typhi* and *Salmonella para typhi* in an endemic area, 1977 - 79. *Transaction of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 75 (1): 21 – 24.

- Rockhill RC, Lesmana M, Moechtar MA, dan Soetomo A, 1981. Detection of Salmonella C., D and V₁ Antigens by Coagulation, in Blood Cultures from Patients with Salmonella Infections. **Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.** 11 (4) : 441 – 445.
- Rolfs A, Schuller I, Finckh U dan Weber-Rolfs I.,1992. **PCR: Clinical Diagnostics and research** Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hongkong, Barcelona, Budapest, hlm.1-58.
- Rubin FA, Kopecko DJ, Sack RB, Sudarmono P, Yi A, Maurta D, 1988. Evaluation of a DNA probe for identifying *Salmonella typhi* in Peruvian and Indonesian bacteria isolates. **J Infect Dis** 157:1051-1053.
- Rubin FA, Mc Whirter PD, Punjabi NH, Lane E, Sudarmono P dan Pulungsih SP, 1989. Use of a DNA probe to detect *Salmonella typhi* in blood of patients with typhoid fever. **J Clin Microbiol** 27:1112-1114.
- Rubin FA, 1992. *In Typhoid Fever , Profile , Diagnosis and Treatment in the 1990's* (Nelwan , editor) , hlm. 17 – 26.
- Sarasombath S.,1992. *In Typhoid fever Strategies for the 90's. World Scientific.* (Pang T, Koh CL, Puthuchearu edit.) Singapore, New Jersey, London, Hongkong. hlm.168-175.
- Sariff A, Yahaya H, Noorizan AA, Radzi MJ ,1992. *In Typhoid fever Strategies for the 90's. World Scientific.* (Pang T, Koh CL, Puthuchearu edit.) Singapore, New Jersey, London, Hongkong, hlm. 195 –199.
- Sakaguchi S, Sakaguchi T, Arai T.,1995. Genetic similarity of R plasmids from *Salmonella typhi* strains isolated in various countries, **South-East Asian J Trop Med Pub Health**, 26 (suppl.):33 – 36.
- Singarimbun M, dan Effendi S, 1983. **Metode Penelitian Survei** . Lembaga Penelitian , Pendidikan dan Penerangan Ekonomi Sosial. Jakarta., hlm. 16-18.
- Song JH, Cho H, Park MY, Na DS, Moon HB dan Pai CH ,1993. Detection of *Salmonella typhi* in the blood of patients with typhoid fever by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 31 (6) : 1439 – 1443.
- Stein MA, Portillo G-D, Leung KY, dan Finlay B B, 1995. Identification of a *Salmonella* gene required for the formation of tubular lysosomes within epithelial cells. **Abstract B-300, 95th. General meeting of the American Society for Microbiology**, Washington DC.

- Sukosol T, Sarasombath S, Rungpitarangsi B, Pang T, 1995. *In Second Asia - Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors) ,hlm.242- 243 .
- Supardi ,I , 1992. *In Typhoid Fever , Profile , Diagnosis and Treatment in the 1990's* (Nelwan , editor) , hlm. 197- 202.
- Suwanto A, 1994. Pulsed-Field Gel Electrophoresis: a Revolution in Microbial Genetics. *Asia Pacific Journal of Medicine Biology and Biotechnology* 2(2):78-85.
- Soewondo ES, 1991. **Patogenesis Demam Tifoid dan Virulensi Salmonella Typhi**. Seminar Penyakit Tropik Infeksi, Lab-UPF Penyakit Dalam RSUD Dr Soetomo - FK Unair.
- Szu SC, Bystricky S, Robbins JB, 1995. *In Second Asia - Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors) , hlm. 133 - 137.
- Tanhvanich, S. , Chongsangguan , M . Sangpetchsong, V. and Tharavanij, S., 1984, A Simple and Rapid Diagnostic Test For Typhoid Fever. *South-East Asian J Trop Med Pub Health*, 15 (3): 317- 321.
- Thong KL, Cheong YM, Puthuchearu S, Koh CL dan Pang T., 1994. Epidemiological analysis of sporadic *Salmonella typhi* isolates and those from outbreaks by Pulsed-Field Gel Electrophoresis,*J Clin Microbiol* 32:1135-1141.
- Thong KL, Yong FY, Puthuchearu SD, Koh CL, Sudharmono P, Padmidewi M, Listyana M, Sarasombath S, Pang T.,1995. Molecular analysis of *Salmonella typhi* from Southeast Asia using pulsed-field gel electrophoresis. *South-East Asian J Trop Med Pub Health*, 26 (suppl. 2): 29 - 32.
- Thong K-L, Puthuchearu SD, Pang T, 1995. In Vivo Genetic Stability of *Salmonella typhi* Detected by Ribotyping and Pulsed-Field gel Electrophoresis. *Asia Pacific J. of Molecular Biology and Biotechnology* 3 (4) : 356 - 361.
- Thong K-L, Passey M, Clegg A, Combs BG, Yassin RM, dan Pang T, 1996. Molecular Analysis of Isolates of *Salmonella typhi* Obtained from Patients with Fatal and Nonfatal Typhoid Fever. *J. of Clin. Microbiol.* 34 (4) : 1029 – 1033.
- Threfall EJ.,1994. **The detection, typing and finger printing of Salmonella, laboratory aspect and clinical applications**,*In Second Asia-Pasific*

- Symposium on typhoid fever and Other Salmonellosis (Sarasombath, Senawong editors) , hlm. 217.
- Threfall E J dan Frost JA., 1990. The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella* laboratory aspect and epidemiological applicant. **J of Appl Bacteriol.** 68, 5-16.
- Threfall EJ, Ward LA dan Rowe B.,1980. Plasmid-encoded trimethoprim resistance in multiresistant epidemic *Salmonella typhimurium* phage type 204 and 139 *Britain. Bri Med J* 1:1210-1211.
- Tjaniadi P, Burr D, Lesmana M, Subekti D, Pulungsih SP, Punjabi N, Sukri N dan Rubin F.,1992. *In Typhoid Fever , Profile , Diagnosis and Treatment in the 1990's* (Nelwan , editor) . hlm. 175- 180.
- Towner KJ dan Cockayne A, 1990. **Molecular Methods for Microbial Identification and typing.** 1st Ed Chapman & Hall .London , Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, hlm.64-112.
- Tsang RSW, dan Chau PY,1992. *In Typhoid fever Strategies for the 90's. World Scientific.* (Pang T, Koh CL, Puthuchearu edit.) Singapore, New Jersey, London, Hongkong, hlm. 188 – 193.
- Verdugo-Rodrigues A, Santana FJ, Puente JL, Calva E, Vidal YL, Palacios GMR, ,1992. *In Typhoid fever Strategies for the 90's. World Scientific.* (Pang T, Koh CL, Puthuchearu edit.) Singapore, New Jersey, London, Hongkong. hlm. 216 –219.
- Verdugo-Rodriguez A, Vidal YL, Puente JL, Ruiz Palacios GM. and Calva E., 1993. Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoasay using *Samonella typhi* outer membrane protein preparation, **Eur. J Clin Microbiol Infect Dis**, 12:248-254.
- Way J S, Josephson K L, Pillai S.D, Abbaszadegan M., Gerba C.P dan Pepper I.L., 1993. Spesific, Detection of Salmonella spp. by Multiplex Polymerase Chain Reaction, **Environ. Microbiol** , 59, Appl (5),hlm. 1473 –1479.
- Widjoatmodjo MN, Fluit AD C, Torensma R, Verdonk GPHT, dan Verhoef J, ,1992. The Magnetic Immuno Polymerase Chain Reaction Assay for Direct Detection of *Salmonella*. **J. of Clin. Microbiol**, 30 (12): 3195 -3199.
- Widjoatmodjo MN., 1995. Detection of Salmonella Species in Fecal Samples by Immunomagnetic Separation and PCR . **J. Clin. Microbiol.** 33:1046.
- Widjoatmodjo MN, Fluit AC, Torensma R, Keller BHI, Verhoef J, 1991. Evaluation of the Magnetic Immuno PCR Assay for Rapid Detection of *Salmonella*.**Eur. J. Clin.Microbiol.Infect. Dis.** 10 (11): 935 - 938.

- Wong YH, Jegathesan M, Lim PL.,1992. *In Typhoid fever Strategies for the 90's. World Scientific.* (Pang T, Koh CL, Puthucheary edit.) Singapore, New Jersey, London, Hongkong, hlm. 221 – 226.
- Wyatt GM, Langley MN, Lee HA, dan Morgan MRA, 1993. Further studies on the Feasibility of One day Salmonella Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. of Clin. Microbiol*, 59 (5) : 1383 - 1390.
- Zhu Q, Lim CK, Chan YN, 1995. *In Second Asia - Pasific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis* (Sarasombath, Senawong editors) . hlm.180 – 229.
- Zhu Q, Lim CK dan Chan Y.N., 1996. Detection of salmonella typhy by polymerase chain reaction. *J of Appl Bacteriol* 80 : 1 – 8.

LAMPIRAN

Lampiran 1

Daftar urutan Nukleotida dari gen OmpC *S. typhi*
(Nucleotide sequence of *S. typhi* ompC gene)

```

AACCAGTAAG CAGTGGCATA AAAAAGCAAT AAAGGCATAT AACAGAGGGT 50
TAATAACATG AAAGTTAAAG TACTGTCCCT CCTGGTACCA GCTCTGCTGG 100
TGGCGGGCGC AGCGAATGCG GCTGAAATTT ATAATAAAGA CGGCAACAAA 150
TTAGACCTGT TTGTTAAAGT TGATGGCCTG CACTACTTCT CTGACGACAA 200
AGGCAGCGAC GGCGACCAGA CCTACATGCG TATCGGCTTC AAAGGCGAAA 250
CGCAGGTTAA CGATCAGCTG ACCGGTTATG GCCAGTGGAG ATATCAGATT 300
CAGGGCAACC AGACTGAAGG CAGCAACGAC TCCTGAACGC GTGTGGCGTT 350
TGCGGGTCTG AAATTCGCTG ACGCAGGTTT CTTTCGATTAT GGTTCGTAAC 400
ACGGCGTAAC CTATGACTGT ACCTCCTGGA CCGACGTTCT GCCGGAGTTC 450
GGCGGCGACA CCTACGGCGC TGACAACCTT ATGCAGCAGC GTGGTAACGG 500
CTATGCTACC TACCGTAACA CCGACTTCTT CGGTCTGGTG GATGGTCTGG 550
ACTTCGCGTT GCAGTATCAG GGCAAAAACG GCAGCGTGAG CGGTGAAAAC 600
ACCAACGGTC GCAGCCTGCT GAACCAGAAC GGCACGGTT ACGGCGGATC 650
GCTGACTTAT GCAATCGGCG AAGGCTTCTC TGTCGGTGGC GCTATCACCA 700
CGTCTAAACG TACTGCCGAT CAGAACAACA CCGCTAACGC TCGCCTGTAT 750
GGTAACGGCG ATCGCGCCAC GGTTTACACC GGCGGCCTGA AATACGATGC 800
GAACAACATC TATCTGGCAG CGCAGTATTC TCAGACCTAT AACGCTACCC 850
GTTTTGGTAC CTCTAACGGC AGCAACCCGT CCACCTCTTA CGGTTTTGCC 900
AACAAAGCGC AGAACTTAGA AGTGGTTGCT CAGTACCAGT TCGACTTTGG 950
TCTGCGTCCG TCTGTGGCTT ACCTGCAGTC TAAAGGTAAG GACATCAGCA 1000
ACGGCTACGG CGCCAGCTAT GCGGAACAGG ACATCGTAAA ATACGTTGAT 1050
GTCGGCGCGA CTTACTACTT CAACAAAAAC ATGTCCACCT ATGTTGATTA 1100
CAAAATCAAC CTGCTGGATA AAAACGACTT TACCCGCGAT GGCATCAACA 1150
CCGACGCCAT CGTAGCGCTG GGTCTGGTTT ACCAGTTCTA ATCAGCAAAA 1200
GATGTTGCTA AAGGGCCTGC GGGCCTTTTT TCATGCCTTA TTCCGGCGTA 1250
CAAATACGAC GTTTTGATAT ACGCTTGTC GCATTTCGAAT GAGGATAAAC 1300
AGCGATGAAA ATGACTTTTT GCCGGGCCGT GTGTCTGGCA GCGGCTTTTT 1350
TACTTATGGG CTGCGATGAG GCTCCCGAAC GACAACAGCG TCACCTGCCG 1400
CTCAGGTGCT GGAGGTAAA 1419

```

Lampiran 2

Daftar urutan Nukleotida gen OmpS1 *S. typhi*
(Nucleotide sequence of *S. typhi* OmpS1 gene)

```

CCTGGTACTC  AAAC TTTACT  CCGCTTTTGT  GATGTAAGGC  ATATGACATT  50
AATTACATTA  TAATGTGATA  TTAGTCACAT  TTCGACCATG  GAATACCTTA  100
TCCACCTGTT  CTGGTTATTC  ATCCACAAA  TAGTTTATTC  TCAGTTAATG  150
TTGCGTCTGG  CGCTGAACCT  GCTGTTAAAT  AAGGGAATGG  TAATTGAATC  200
GCACTCTGAT  GCAGAATAAC  CCATAACCAG  AACAACCTAT  TTTTACGCAC  250
CGCGATAGCG  TTTTATTTTA  TTAGCATTAA  ATTGTCAGAA  TGATTGCGGT  300
ATTAGCCTTT  TATCATTTAT  TTTATCATT  CCCACATTAC  CGGCATTTAT  350
GCCGGTTTTT  TTTTATGCTT  TTTCATAATC  AAAGCATCAA  ATACATATAA  400
AAAACAAATT  ATATTCACGC  CAGCAGCCAT  CAAATCAAAA  CACATAACTC  450
ATTGATAAAA  AATGATAATT  ATAGACTATA  TATTCTTAGT  CACTTATATA  500
TCCTGTATTA  TAAAAACCA  AATAGAAATA  AATTGAAATA  TTTTAAATAT  550
CTTTGTTACA  TGT TATTTT  TAAATTCCAT  GAACTTCATA  GAATAGTATC  600
AATTTGTAGT  TTTGTTGAAG  TGGCTACATA  TTCATATAAA  TTATTATCAT  650
AAGGGAATAC  ATAATGAACA  GAAAAGTTCT  GGCCTGCTT  GTCCC GCGCT  700
TATTAGTGGC  AGGCGCAGCA  AATGCGGCTG  AAATTTATAA  TAAAAATGGC  750
AACAACTCG  ACCTGTACGG  CAAAGTTGAT  GGTCTGCGTT  ACTTCTCTGA  800
CAATGCAGGC  GACGATGGGG  ATCAGTCCTA  CGCCCGTATT  GGCTTTAAAG  850
GCGAAACGCA  GATCAACGAT  ATGCTGACCG  GCTATGGTCA  GTGGGAATAC  900
AACATTAAGG  TGAACACCAC  CGAAGGCGAA  GGTGCAAAC  CTTGGACTCG  950
TCTGGGCTTT  GCCGGTCTGA  AATTCGGCGA  GTACGGCTCT  TTCGATTATG  1000
GCCGTAECTA  TGGTGT TACT  TCAGACATTG  AAGCCTGGAC  CGATGCGTCG  1050
CCGGAATTTC  GCGGTGATAC  TTATACCCAG  ACCGATGTCT  ATATGCTGGG  1100
CAGAACCAAC  GCGGTTGCCA  CCTAACCGTA  TACCGACTTC  TTCGGTCTGG  1150
TGGAAGGCCT  GAACTTCGCG  TTGCAGTACC  AGGTAATAA  TGA AAAACGCG  1200
GGTGCTGGTG  CTGGTGAAGG  TACAGGTAAC  GCGGCAACC  GCAA ACTGGC  1250
CCGTGAAAAC  GCGGACGGTT  TCGGTATGTC  TACCTCCTAC  GACTTTGACT  1300
TCGGGTTAAG  CCTGGGTGCG  GCCTACTCTT  CCTCTGACCG  TTCGGACAAT  1350
CAGGTTGCTC  GTGGTTATGG  CGACGGCATG  AATGAGCGCA  ACAACTATGC  1400
CGGCGGTGAA  ACCGTTGAAG  CTTGGACCAT  AGGTGCCAAA  TATGACGCCT  1450
ACAATGTTTA  CCTGGCGGCC  ATGTACGCTG  AAACCCGCAA  CATGACCTAT  1500
TATGGCGGCG  GCAATGGCGA  AGGTAATGGC  AGTATTGCTA  ACAA AACCCA  1550
GAACTTTGAA  GTGGTTGCGC  AGTACCAGTT  CGATTTGCTT  CTGCGTCCGT  1600
CCATCGCCTA  CTTGCACGCT  AAGGGCAAAG  ATTTAGGCGG  TACGGAAGCT  1650
CATCGTGGCA  ACTGGCGTTA  CACCGACAAA  GATCTGGTTA  AATATGTTGA  1700
CGTCGGTATG  ACTTACTACT  TCAACAAAAA  TATGTCCACC  TACGTTGATT  1750
ATAAAATCAA  CCTGCTGGAC  GAAGATGATG  ACTTCTACGC  AAACAACGGT  1800
ATTGCAACCG  ATGATATCGT  AGGTGTTGGT  CTGGTCTACC  AGTTCTAAGA  1850
CGCTTAYGT  TATTCAATCC  CGTGCTTAGC  GCCGGTTTGT  TATTATAGGG  1900
CAAGAATTAA  ATAACGGATA  ACGGCGGAAA  GACAGGTG  1938

```

Lampiran 3

Daftar urutan Nukleotida dari genphoE *S. typhi*
(Nucleotide sequence of *S. typhi* phoE gene)

GATCAGCAAG	CGTAGCGGCG	GAATTTGACC	ATTTTATTAC	CGCAACAATT	50
AAATATATTT	TTTTAAAAAA	ACTCTCACTT	TGTCATAAAT	CTTTCATTAC	100
CGAACGTAA	AAACCTTCCT	GTTTTTTACC	GGGTCTCCCG	ACAAATCATA	150
GCGCGTAATT	AAAACAGGAA	TGGAAATGAA	TAAGAGCACT	CTGGCAATAG	200
TGGTGAGTAT	CATCGCATCA	GCATCTGTTT	ACGCCGCCGA	GGTTTACATT	250
AAAAACGGTA	ATAAGCTTGA	TGTGTATGGA	AAAGTTAAAG	CCATGCACTA	300
TATGAGCGAT	TATGACAGCA	AAGATGGCGA	TCAAAGCTAC	GTTCGTTTTG	350
GTTTTAAAGG	CAAAACGCAA	ATTAACGATC	AATTGACCGG	CTACGGGGCGC	400
TGGGAAGCGG	AGGGTGCCGG	TAATAAAGCC	GAAAGTGATT	CGTCCCAGCA	450
AAAAACCCGC	CTGGCCTTTG	CTGGTCTGAA	ATTAAGAGAT	ATCGGTTCTT	500
TTGACTATGG	ACGTAACCGG	GGCGCGCTGT	ACGATGTTGA	GGCCTGGACG	550
GATATGTTTC	CCGAATTCGG	CGGCGACTCT	TCCGCCCAGA	CCGATAATTT	600
TATGACTAAA	CGCGCCAGCG	GGCTGGCGAC	TTACCGCAAT	ACCGATTTCT	650
TCGGCATCGT	TGATGGACTG	GATCTTACCT	TACAGTATCA	GGGGAAAAAC	700
GAAGATCGCG	ATGTGAAAAA	GCAAACGGC	GACGGCTTCG	GCACTTCCGT	750
GAGCTATGAT	TTCGGCGGCA	GTGATTTTGC	CGTCAGCGGC	GCTTATACTC	800
TCTCCGATCG	CACCAGGGAG	CAAATCTGC	AGCGCCGCGG	TACGGGCGAT	850
AAAGCCGAAG	CTTGGGCTAC	GGGTGTTAAG	TATGACGCGA	ATGATATTTA	900
TATTGCGACT	TTCTATTCAG	AAACCCGCAA	CATGACGCCA	GTTTCCGGCG	950
GATTTGCCAA	TAAAACCTCAA	AACTTCGAAG	CGGTTATCCA	GTATCAGTTT	1000
GATTTTGTC	TGCGTCCGTC	ATTAGGCTAT	GTGCTGTCAA	AAGGCAAAGA	1050
TATTGAGGGC	GTCGGCAGTG	AGGATTTGGT	GAATTACATT	GACGTTGGCG	1100
CAATCTATTA	TTTCAACAAA	AATATGTCCG	CGTTTGATGA	TTACAAAATC	1150
AATCAGCTTG	ATAGCGATAA	CACGTTAGGC	ATTAATGACG	ATGATATTGT	1200
GGCAATAGGG	TTGACCTACC	AGTTCTGA			1228

Lampiran 4

Daftar urutan Nukleotida gen ompR *S. typhi*
(Nucleotide sequence of *S. typhi* ompR gene)

```

GAGCTCTTGT TTGAGTGTTT CGTACCCTAT CGCGGGTGAT CAGGGGCTTT 50
TTCATCTCGT TGATTTACCT TTGCTGTCGA TATTGCGCAC ACGGGGTATA 100
ACGTGATCGT CCCGACAGAA TAAATAATGG GGTTGCCGAT TAATTGTATA 150
TTTAAGCTGC TGTTAAATAT GCTTTGTAAC AATTTAGCCT GAAATTCATA 200
CCAGAATTTG CTGGTGACTC ACGTGAGCTT TTTAAGAAT ACACACTTAC 250
AATTTGTTGC GAACCTTTGG GAGTACAGAC AATGCAAGAG AATTATAAGA 300
TTCTGGTGGT TGATGACGAT ATGCGTCTGC GGGCGCTACT GGAACGTAT 350
CTGACCGAGC AGGGCTTTCCA GTTCTGAAGC GTCGCTAACG CTGAGCAGAT 400
GGATCGTCTG TGACCCTGTC AATCTTTCCA TCTCATGGTA CTGGATTTAA 450
TGCTGCCAGG TGAAGATGGT CTGTGATTTT GTCGTCGCCT CCGTAGTCAA 500
AGTAATCCAA TGCCGATCAT TATGGTCACG GCGAAGGGGG AAGAGGTTGA 550
CCGTATCGTC GGGCTGGAAA TCGGCGCCGA TGACTIONATT CCTAAACCGT 600
TTAACC CGC GCGAGCTGTTG GCGCGTATTC GGCCCGTGTT ACGTCGTCAG 650
GCAAACGAAC TGCCCGGCGC GCCGCTGCAG GAAGAGGCCG TTATCGCGTT 700
CGGTAAGTTT AAACCTGAACC TCGGTACGCG CGAGATGTTT CGTGAAGATG 750
AACCGATGCC GCTGACCAGC GGCGAGTTTG CCGTACTGAA AGCGTTAGTC 800
AGCCATCCGC GCGAGCCGCT CTCTCGCGAC AAGCTGATGA ATCTGGCCCG 850
TGGCCGCGAG TATTCGCGCA TGGAACGCTC CATCGACGTC CAGATCTCCC 900
GCCTGCGCCG TATGGTGGA GAAGATCCGG CACATCCGCG TTATATTCAG 950
ACCGCTCGGG GCCTGGGCTA CGTCTTTGTA CCGGACGGTT CTAAGCATG 1000
AGGCGAATGC GCTTCTCACC GCGAAGTTCA TTTGCCCGCA CGCTGTTGCT 1050
CATCGTCACC TTCGTGTTTCG TCAGCCTGGT GACGACCTAC CTGGTGGTGC 1100
TGAACTTCGC GATTTTGCGG AGCCTCCAGC AGTTTAATAA GGTTCTGGCT 1150
TACGAAGTCC GTATCGTGAT GACCGATAAG CTGCAACTGG AGGACGGCAC 1200
GCAGTTAGTC GTGCCGCCTG CGTTTTCGCCG GGAAATCTAT CGCGAGCTGG 1250
GGATCTCTCT CTACACCAAC GAAGCCGCTG AAGAGGCCGG GTTGCGTTGG 1300
GCGCAACACT ACGAATTCTT AAGCCACCAG ATGGCGCAGC AATTAGGCGG 1350
CCCGACGGAA GTGCGCGTTG AGGTCAACAA AAGCTCGCCC GTCGTGTGGC 1400
TCAAAACCTG GCTGTCGCCC AATATCTGGG TGCGCGTGCC GCTGACCGAG 1450
ATTCATCAGG GCGATTTTTT TCCGCTTTTC CGTTACACGC TGGCGATCAT 1500
GCTGGTGGCG ATAGGCGGCG CGTGGCTGTT TATTGCTATA CAGAATCGAC 1550
CGTTAGTGGA TCTTGAACAT GCCGCCTTGC AGGTAGGGAA GGAATTATT 1600
CCGCCGCCGC TCGCTGAATA TGGCGCCTCT GAGGTGCGCT CTGTGACCCG 1650
GGCGTTTAA CATATGGCAG CCGGCGTGAA ACAATTGGCC GATGACCGTA 1700
CGCTATTGAT GGCGGGCGTC AGCCACGACT TACGCACGCC GCTGACCCGT 1750
ATTCGTCTGG CGACGGAGAT GATGGGCGAG GAAGACGGTT ATCTCGCGGA 1800
GTCGATCAAT AAAGACATCG AAGAGTGTA CGCCATTATC GAACAGTTTA 1850
TTGACTATCT GCGTACCGGT CAGGAAATGC CAATGGAGAT GGCGGATCTC 1900
AATTCCGTGC TGGGCGAGGT GATTGCGGCG GAAAGCGGCT ATGAGCGTGA 1950
GATTAACATC GCGCTTCAGG CAGGCAGCAT CCAGGTGAAA ATGCACCCGC 2000
TCTCGATTAA GCGCGCGGTG GCGAATATGG TGGTCAATCG TGCCCGCTAT 2050
GGCAACTGCT GGATTAAGGT CAGCAGCGGC ACCGAGTCGC ATCGCGCCTG 2100
GTTCCAGGTA GAAGATGACG GGCCGGGCAT TAAGCCGGAG CAGCGTAAAC 2150
ATCTGTTCCA GCCTTTTGTG CGCGGCGACA GCGCCCGTAG CACCAGCGGC 2200

```

Lampiran 4

Lanjutan daftar urutan Nukleotida gen ompR *S. typhi*
(Nucleotide sequence of *S. typhi* ompR gene)

ACAGGGCTGG	GGCTGGCGAT	TGTGCAGCGC	ATTATTGATA	ACCATAACGG	2250
GATGCTGGAG	ATTGGCACCA	GCGACGGTGG	CGGATTGTCG	ATTCGCGCCT	2300
GGCTACCGGT	TCCTGTGGTC	CGCGTCCAGG	GGACGACAAA	AGAGGCATAA	2350
GAAAGGGAGG	TATTACCCTC	CCTTTCTTCT	CAACACTGGA	TGACGCTGTT	2400
CAAAGCCGCC	ATCCGGCCTG	TTCCTTACAG	CTTCGGTTCG	GCGCTAACCA	2450
GCGTTCGCCT	GCCGGGGTAT	CCGTATACTT	CTCGAAGTTC	TCAATGAACA	2500
GTTTCGCCAG	CGCGGTGGCT	TTTTCTTGCC	ATTGTTCCGG	CGACGCGTAG	2550
GTGTTACGGC	GGTCGAGAAT	GTGGGTATCC	ACGCCTGGCA	G TTCAGTCGG	2600
GATCGCCAGA	TCGAACAGCG	GCAGACGGAA	GGTTTCCGCG	TTATCAAGAG	2650
AACCGTTCAG	AATGGCGTCG	GATAATTGCG	CGCGTATCTT	TGATGGAGGT	2700
ACGTTTGCCG	GTGCCATTCC	AGCCGGTGTT	AACCAGATAA	GCCTGTGCGC	2750
CTGCTGCCTG	CATACGTTTC	ACCAGCACCT	CAGCATACTG	CGTCGGGTGC	2800
AGCGTCAGGA	ACGCGGCGCC	GAACGAGGCG	GAGAAGGTGG	GGGTCGGTTC	2850
GGTGACGTCA	CCGCGTTCGG	TGCCGGCCAG	TTTAGCGGTC	AAACCCGACA	2900
GGAAGTGGTA	CTGCGTCTGG	TTAGCGGTTA	AACGGGAAAC	CGGCGGCAAC	2950
ACGCCGAAAG	CTCCGCCGTC	TGGAAGATAA	CCTTGGTGGC	GTGACCTGCT	3000
TTGGATACGG	GCTTAACGAT	GTTATCTATA	TGATAGATCG	GGTAAGAGAC	3050
GCGGGTGTTT	TCGGTTTTGG	AACCATCGTC	GAAATCAACG	GTGCCGTCTT	3100
CGCGCACGGT	GACGTTTTCC	AGCAGCGCAT	CACGGCGAAT	CGCATGATAA	3150
ATTTCTGGCT	CCGCTTCTTT	CGACAGTTTG	ATGGTTTTGG	CGTAGCAGCC	3200
GCCTTCAAAG	TTGAACACGC	CGTCGTCATC	CCAACCG		3237

Lampiran 5

Daftar urutan gen SifA *S. typhi*
(Sequence of *S. typhi* SifA gene)

```

*           *           *           *           50
*
*
GTATCACTCAAATACCGATACCTTTAGCTGTGAAGTCATGGGGAATCTT
TATTTTTTAA

CATAGTGAGTTTTATGGCTATGGAAATCGACACTTCAGTACCCCTTAGAA
ATAAAAAATT
      1140      1131 TO 1855 OF SIF2MOD12-
20 1180 1190>

*           *           *           *           100
*
*
TGAAAGATCGCCCGGATATTTTAAAATCGCATCCACAAATGACGGCCATG
ATTAAGAGAA

ACTTTCTAGCGGGCCTATAAAATTTAGCGTAGGTGTTTACTGCCGGTAC
TAATTCTCTT
      1200      1131 TO 1855 OF SIF2MOD12-
20 1240 1250>

*           *           *           *           150
*
*
GATATAGCGAAATCGTAGACTACCCCTCCCTTCGACATTATGTCTCAAT
CCTGCTGGCG

CTATATCGCTTTAGCATCTGATGGGGGAGGGAAGCTGTAATACAGAGTTA
GGACGACCGC
      1260      1131 TO 1855 OF SIF2MOD12-
20 1300 1310>

*           *           *           *           200
*
*
CGCCGATATTATCGGTTCCATTAGACAACATAGAGGGGTATTTATATACT
GAATTGAGAA

GCGGCTATAATAGCCAAGGTAATCTGTTGTATCTCCCCATAAATATATGA
CTTAACTCTT
      1320      1131 TO 1855 OF SIF2MOD12-
20 1360 1370>

```

Lampiran 5

Lanjutan daftar urutan gen SifA *S. typhi* (Sequence of *S. typhi* SifA gene)250
300* * * * *
*AAGGACATTTAGATGGGTGGAAAGCGCAAGAAAAGGCAACCTACCTGGCA
GCGAAAATTCTTCCTGTAAATCTACCCACCTTTCGCGTTCCTTTCCGTTGGATGGACCGT
CGCTTTTAAG1380 1131 TO 1855 OF SIF2MOD12-
20 1420 1430>* * * * * 350
*AGTCTGGGATTGAAAAGACAACGCGCATTTTACACCATGCGAATATATCC
GAAAGTACTCTCAGACCCTAACTTTTCTGTTGCGCGTAAATGTGGTACGCTTATATAGG
CTTTCATGAG1440 1131 TO 1855 OF SIF2MOD12-
20 1480 1490>* * * * * 400
*AGCAAAACGCATTTTTAGAAACAATGGCGATGTGTGGATTAAAACAGCTT
GAAATACCACTCGTTTTGCGTAAAAATCTTTGTTACCGCTACACACCTAATTTTGTTCGAA
CTTTATGGTG1500 1131 TO 1855 OF SIF2MOD12-
20 1540 1550>* * * * * 450
*CACCGCATACCCACATACCTATTGAAAAAATGGTAAAAGAGGTTTTACTA
GCGGATAAGAGTGGCGTATGGGTGTATGGATAACTTTTTTACCATTTTCTCCAAAATGAT
CGCCTATTCT

Lampiran 5

Lampiran 5

Lanjutan daftar urutan gen *SifA S. typhi* (Sequence of *S. typhi* *SifA* gene)

1560 1131 TO 1855 OF SIF2MOD12-
20 1600 1610>

500

* * * * *
*

CGTTTCAGGCGTTCCTCGTAACGGATCCCAGCACCAGCCAAAGTATGTTA
GCTGAGATAG

GCAAAGTCCGCAAGGAGCATTGCCTAGGGTCGTGGTCGGTTTCATACAAT
CGACTCTATC

1620 1131 TO 1855 OF SIF2MOD12-
20 1660 1670>

Lampiran 7

550

600

* * * * *
*

TCGAAGCCATCTCTGATCAGGTTTTTCACGCCATTTTTAGAATAGACCCC
CAGGCTATAC

AGCTTCGGTAGAGACTAGTCCAAAAAGTGCGGTAAAAATCTTATCTGGGG
GTCCGATATG

1680 1131 TO 1855 OF SIF2MOD12-
20 1720 1730>

650

* * * * *
*

AAAAAATGGCGGAAGAACAGTTAACCACGCTACACGTTTCGCTCAGAACAA
CAAAGCGGCT

TTTTTTACCGCCTTCTTGTCAATTGGTGCGATGTGCAAGCGAGTCTTGT
GTTTCGCCGA

1740 1131 TO 1855 OF SIF2MOD12-
20 1780 1790>

700

* * * * *
*

GTTTATGTTGTTTTTATAAAATCAGACGACGCTTCTCAGACGTCACGT
TCAGGGTTTA

Lampiran 5

**Lanjutan daftar urutan gen SifA *S. typhi* (Sequence of *S. typhi*
SifA gene)**

CAAATACAACAAAAAATATTTTAGTCTGCTGCGAAAGAGTCTGCAGTGCA
AGTCCCAAAT

_____1800_____1131 TO 1855 OF SIF2MOD12-
20 _____1840_____1850>

CTCAC
GAGTG
_____>

Lampiran 6

**Data Pemeriksaan perbenihan uji widal PCR pada
penderita diduga demam tifoid**

No	Kultur	Widal				OD	PCR	
		O	H	A	B			
ST1	+	1/200	1/200	0	0	20286	1.0143	+ve
ST2	-	1/100	-	-	-	21716	1.0858	-ve
ST3	-	1/100	-	-	-	20272	1.0136	+ve
ST4	-	-	-	-	-	21202	1.0601	-ve
ST5	-	-	-	-	-	20734	1.0367	-vc
ST6	-	-	-	-	-	20686	1.0343	-ve
ST7	-	-	-	-	-	20139	1.0060	-ve
ST8	+	1/200	1/400	-	-	20592	1.0296	+ve
ST9	-	1/200	1/200	-	-			
ST10	-	-	-	-	-			
ST11	-	-	-	-	-	20420	1.0210	-ve
ST12	-	-	-	-	-	20652	1.0326	
ST13	-	1/800	1/800	-	-	19828	0.9914	-ve
ST14	-	-	-	-	-	20732	1.0366	
ST15	-	-	-	-	-	20000	1.0000	-ve
ST16	+	1/400	1/400	-	-	20628	1.0314	+ve
ST17	+	1/800	1/800	-	-	19828	0.9914	+ve
ST18	-	1/200	1/100	-	-	19180	0.9590	
ST19	-	1/200	1/200	-	-	19338	0.9669	-ve
ST20	+	-	-	-	-	21832	1.0916	+ve
ST21	+	1/400	1/200	-	-			+ve
ST22	-	-	-	-	-	20472	1.0236	-ve
ST23	+	1/100	1/100	-	-	21640	1.0282	
ST24	+	1/800	1/800	-	-	20700	1.0350	+ve
ST25	+	1/400	1/400	-	-	23428	1.1714	+ve
ST26	-	-	-	-	-	20822	1.0411	-ve
ST27	-	-	-	-	-	19894	0.9947	-ve
ST28	-	1/800	1/800	-	-	20664	1.0332	-ve
ST29	-	1/200	1/400	-	-	20094	1.0047	-vc
ST30	-	1/200	1/400	-	-			-ve
ST31	-	1/200	1/200	-	-	20026	1.0013	-ve
ST32	-	-	-	-	-			-ve
ST33	-	-	-	-	-	20826	1.0413	-ve
ST34	-	-	-	-	-	20588	1.0294	-ve
ST35	-	1/800	1/800	-	-			-ve
ST36	-	1/100	-	-	-			-ve
ST37	-	1/100	-	-	-			-ve
ST38	-	1/100	-	-	-			-ve
ST39	-	-	-	-	-			-ve
ST40	-	-	-	-	-			-ve
ST1 1A	-	-	-	-	-	27380	1.0369	-ve
352	-	1/400	-	-	-	20932	1.0466	-ve
258	-	-	-	-	-	20914	1.0457	-ve
-ST18A	1/200	1/100	-	-	-	21888	1.0944	-ve
DesyST21						20822	1.0411	-ve
T52						20690	1.0345	-ve
278		1/100	-	-	-	20716	1.0358	-ve
164		1/200	1/200	-	-	20726	1.0363	-ve

NO	Kultur	Widal				OD	PCR	
		O	H	A	B			
162	-	1/100	1/100	-	-	21100	1.0590	.-ve
356	-	-	-	-	-	20932	1.0466	.-ve
361	-	-	-	-	-	20682	1.0341	.-ve
ST21A	-	1/200	1/400	-	-	20804	1.0402	.-ve
279	-	-	-	-	-	20934	1.0467	.-ve
Abd.R	-	-	-	-	-	20800	1.0400	.-ve
ST15A	-	COMA	-	-	-	22500	1.1250	.-ve
29	-	-	-	-	-	-	1.0150	.-ve
117	-	-	-	-	-	-	-	.-ve
140	-	-	-	-	-	19716	0.9858	.-ve
320	-	-	-	-	-	20534	1.0267	.-ve
223	-	-	-	-	-	20528	1.0264	.-ve
308	-	-	-	-	-	25840	1.0292	.-ve
316	-	-	-	-	-	20584	1.0331	.-ve
343	-	-	-	-	-	20188	1.0094	.-ve
328	-	1/100	-	-	-	20628	1.0314	.-ve
303	-	-	-	-	-	20416	1.0208	.+ve
258	-	-	-	-	-	20492	1.0246	.+ve
301	-	-	-	-	-	20282	1.0141	.+ve
326	-	1/200	1/100	-	-	20558	1.0279	.-ve
.8/8	-	-	-	-	-	20692	1.0346	
188	+	1/100	1/100	-	-	21150	1.0575	.+ve
Alfan	-	-	-	-	-	20586	1.0293	
M244	+	-	-	-	-	20704	1.0352	.+ve
255	-	-	-	-	-	20358	1.0179	.-ve
296	-	1/200	1/200	-	-	20392	1.0196	.-ve
309	-	-	-	-	-	20488	1.0244	.-ve
322	+	1/200	1/400	-	-	20918	1.0459	.+ve
240	+	1/200	1/400	-	-	20918	1.0459	.+ve
331	-	1/100	-	-	-	20738	1.0369	.-ve
256	-	-	-	-	-	20810	1.0405	.-ve
M247	+	-	-	-	-	20622	1.0311	
278	-	1/100	-	-	-	20722	1.0361	.-ve
332	-	1/100	-	-	-	20776	1.0388	.-ve
328	-	1/00	1/100	-	-	20778	1.0384	.-ve
317	-	-	-	-	-	20316	1.0158	.-ve
318	-	-	-	-	-	2000	1.0000	
305	-	1/800	1/400	-	-	20764	1.0382	
241	-	-	-	-	-	20198	1.0099	
321	-	-	-	-	-	21248	1.0624	
254	-	1/400	1/200	-	-	21636	1.0624	
276	.+PA	-	-	-	-	20830	1.0415	
Sabikin	-	-	-	-	-	20592	1.0296	
246	+	-	-	-	-	20466	1.0233	.+ve
306	-	1/100	-	-	-	20616	1.0308	
272	+	1/100	-	-	-	20766	1.0383	
273	+	-	-	-	-	20650	1.0325	
333	-	-	-	-	-	20324	1.0162	
ST16A	+	1/800	1/800	-	-	20418	1.0209	
ST24A	-	-	-	-	-	19278	0.0639	
357	-	1/200	1/100	-	-	20252	1.0126	

NO	Kultur	Widal				OD	PCR	
		O	H	A	B			
242	-	-	-	-	-	20138	1.0069	
365	-	-	-	-	-	19952	0.9976	
5/9						19688	0.9844	
354		1/100				19256	0.9628	
351	-	-	-	-	-	19716	0.9858	
Hartatik						19562	0.9781	
ST2A						19708	0.9854	
ST12A						20278	1.0139	
295	-	-	-	-	-	20234	1.0117	
30						20112	1.0056	
ST10A						21420	1.0710	
3						20316	1.0158	
96	-	-	-	-	-	20690	1.0345	
327	-	-	-	-	-	22378	1.1189	
TY						22472	1.1236	
TY						23812	1.1906	
TY						22204	1.1102	
395						39640	1.0982	
494587						22236	1.1118	
2						20048	1.0024	
6						18572	0.9286	
129						19762	0.9881	
2S						13874	0.9937	
3S						19582	0.9791	
4S						19746	0.9873	
5S						20412	1.0206	
6S						18182	0.9091	
7S						20256	1.0128	
3						19900	0.9950	
5						18842	0.9412	
278	-	-	-	-	-	20312	1.0156	
1						21652	1.0826	
4						19868	0.9934	
7						20870	1.0432	
187	-	100	-	-	-	20308	1.0154	
T31						19502	0.9751	
20	-	-	-	-	-	21472	1.0736	
357	-	-	-	-	-			
385	-	-	-	-	-	20358	1.0179	
383	-	-	-	-	-	21052	1.0096	
377	-	-	-	-	-	20296	1.0148	
297	-	-	-	-	-	19468	0.9734	-ve
391	-	-	-	-	-	20234	1.0117	-ve
396						19502	0.9751	-ve
328	-	1/100	-	-	-	20554	1.0277	-ve
359	-	-	-	-	-	19610	0.9805	-ve
370	-	-	-	-	-	19622	0.9811	-ve
378	-	1/400	1/100	-	-	19948	0.9974	-ve
379	-	-	-	-	-	20000	1.0000	-ve
380	Para A	-	-	-	-	19216	0.9608	-ve
392	-	-	-	-	-	20260	1.0130	-ve
389	-	1/100	-	-	-	20260	1.0375	-ve

NO	Kultur	Widal				OD	PCR	
		O	H	A	B			
395						20538	1.0269	
393	-	-	-	-	-	22362	1.1181	
376	-	-	-	-	-	24876	1.2438	
387	-	1/200	1/100	-	1/100	22678	1.1339	
388	-	-	-	-	-	20404	1.0202	
390	-	-	-	-	-	23166	1.1583	
374	-	1/200	1/100	1/100	-	21568	1.0784	
358	+	-	-	-	-	20988	1.0494	+ve
367	-	-	-	-	-	21234	1.0617	-ve
360	-	-	-	-	-	19414	0.9707	-ve
386	-	-	-	-	-	21382	1.0691	-ve
39		-	-	-	-			
373						19522	0.9761	
245						20744	1.0372	
374						19550	0.9775	
264						20198	1.0099	
382						20538	1.0265	
368						19848	0.9924	
377						19468	0.9734	
360						19642	0.9821	
378						20474	1.0237	
370						19832	0.9916	
383						20152	1.0076	
396						19502	0.9751	
394						21568	1.0784	
369						21662	1.0831	
373						20000	1.000	
398						20988	1.0494	
384						19428	0.9719	
375						20042	1.0021	
247						20666	1.0333	
297						19468	0.9734	
368						19848	0.9924	
47323	+					19540	0.9707	
Djoko	+	-	-	-	-	20818	1.0409	+ve
ST2A						20278	1.0139	
187	Para A	-	-	-	-			-ve
251		-	-	-	-			-ve
225	+	1/200	1/200	-	-			
175	+	1/100	-	-	-			+
225	+	1/200	1/200	-	-			+
204	+	-	-	-	-			+
164	+	1/200	1/200	-	-			+
261	+	1/200	1/200	-	-			+
319	-	-	-	-	-			+
P1	+							+
M	+							+
P2	+							+
P3	+							+
P5	+							
P6	+							
P8	+							+

Lampiran 6

171

NO	Kultur	Widal				OD	PCR
		O	H	A	B		
P9	+						+
60	-	-	-	-	-		.+ve
319	-	-	-	-	-		.+ve
128	-	1/200	1/200	-	-		
143	-	-	-	-	-		.-ve
187	Para A	-	-	-	-		.+ve
225	+	-	-	-	-		.+ve

Lampiran 7

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama :

Umur :

Jenis kelamin :

Alamat :

dengan penuh kesadaran dan tanpa paksaan menyatakan bersedia untuk mematuhi pemeriksaan yang dilakukan oleh **Laboratorium Patologi Klinik R S U D** Dr. Soetomo di Surabaya, sesuai dengan jadwal yang telah ditentukan dan wajib untuk melapor bila berhalangan hadir pada jadwal pemeriksaan yang telah ditentukan.

Surabaya,19..

Penderita:

(.....)