

INDONESIAN JOURNAL OF
**CLINICAL PATHOLOGY AND
 MEDICAL LABORATORY**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

DAFTAR ISI

PENELITIAN

- Hubungan Antara Kadar Hemoglobin dengan Kadar Kreatinin Serum Penderita Penyakit Ginjal Menahun (Kronis)
(The Relationship between Haemoglobine and Creatinine Serum Concentration in Chronical Kidney Disease Patiens)
Rosnety, M. Arif, Hardjoeno **97-99**
- Nilai Ureum, Kreatinin, dan Penyingkiran Kreatinin di Penderita Penyakit Ginjal Menahun (Kronik)
(Values of Ureum, Creatinine and Creatine Clearance in Chronically Kidney Disease Patients)
I. Ismail, Mutmainnah, Hardjoeno **100-103**
- Kajian Keluarga *Thalassemia* β -Hemoglobin E
(Family Study of β -Hemoglobin E Thalassemia)
Nurul A, Adi K Aman, Ratna A.G **104-108**
- Antigen OMP (*Outer Membrane Protein*) *Salmonella typhi* FAGA Lokal yang Imunodominan dan Spesifik terhadap Antibodi Penderita Demam Tifoid
(Immunodominant Parts of OMP from Local Phage Strain S. Typhi Which React Specifically with Antibody of Typhoid Fever Patients)
J Nugraha, Rahayu Anggraini, Prihatini, I Handojo, SP Edijanto **109-113**

TELAAH PUSTAKA

- Trombositopenia pada Pengobatan dengan Heparin
(Trombocytopenia in Heparin Therapy)
B. Mulyadi, J. Soemarsono **114-123**

LAPORAN KASUS

- Infestasi Plasmodium dalam Sumsum Tulang Penderita Malaria
(Plasmodium Infestation in Malarian Patient's Bone Marrow)
M. I. Diah P., Tonang D.A., Lusi O.W., J.B. Suparyatmo, Yuwono H.S. **124-128**

MENGENAL PRODUK BARU

- Identifikasi Cepat Mikroorganisme Menggunakan Alat Vitek-2
(Rapid Identification of Microorganism by Vitek-2)
Prihatini, Aryati, Hetty **129-132**

MANAJEMEN LABORATORIUM

- Survei Turn Around Time* pada Pelayanan Laboratorium
(Turn Around Time Survey on The Laboratory Services)
Linda Rosita, O. Sianipar **133-136**

- INFORMASI LABORATORIUM MEDIK TERBARU** **137-140**

ANTIGEN OMP (OUTER MEMBRANE PROTEIN) *Salmonella typhi* FAGA LOKAL YANG IMUNODOMINAN DAN SPESIFIK TERHADAP ANTIBODI PENDERITA DEMAM TIFOID

(Immunodominant Parts of OMP from Local Phage Strain *S. Typhi* which React Specifically with Antibody of Typhoid Fever Patients)

J. Nugraha*, Rahayu Anggraini*, Prihatini*, I Handoyo*, SP Edijanto*

ABSTRACT

Background of this research is that diagnostics of typhoid fever is still a health problem. Widal test, which is the mostly used test in Indonesia, frequently gives false positive results and is not reliable in endemic areas. On the other hand, the other confirmation test, blood culture, is not sensitive and often give false negative results. OMP (Outer Membrane Protein) is known as a specific part of *Salmonella typhi* and fragments of OMP still exist in the patient's body since early infection until 2–3 weeks thereafter. In this study parts of OMP which react specifically with sera of typhoid fever in Indonesia were searched. These specific parts will then be developed as a diagnostic kit for typhoid fever. Using Western Blot method, part of OMP will be searched, which is specifically react with sera of typhoid fever patients in Indonesia. OMP derived from local phage type isolated in Indonesia was used. This OMP was separated with SDS-PAGE 12% and incubated with pooled sera of typhoid fever patients, and sera of control group, that is from Dengue haemorrhagic fever patients and urinary tract infection with *E. coli*. Extraction of OMP was done by the method of Matsuyama. Contrary, this research failed to find a particular part of OMP which react specifically with sera of typhoid fever patients. There are certain parts of OMP which react also with sera of DHF & urinary tract infection patients. Our finding was different with the results from Malaysia, where it is reported that antigen OMP 52 kD react specifically there. In order to develop a diagnostic tool for typhoid fever, we should consider another possible specific antigen other rather than using OMP

Key words: typhoid fever, serology, OMP, local phage

PENDAHULUAN

Diagnosis penyakit demam tifoid masih merupakan masalah kesehatan sebab belum ditemukan uji diagnostik laboratorik yang ideal, sedangkan gejala klinis yang timbul sangat bervariasi baik pada anak maupun orang dewasa.^{1,2} Ada beberapa metode yang telah digunakan untuk mendeteksi demam tifoid namun masing-masing mempunyai keunggulan dan kelemahan sendiri.

Uji Widal, yang paling sering digunakan di klinik, bersifat kurang sensitif dan spesifik dan dapat memberikan hasil positif semua pada penderita demam non-tifoid yang terinfeksi oleh kuman batang Gram negatif yang lain, karena terdapat reaksi silang antara antigen O dan H dari *S. typhi* dengan basil gram negatif yang lain.^{3,4} Kelemahan lain dari uji ini yaitu baru memberikan hasil positif pada minggu kedua dari perjalanan penyakit dan dipengaruhi oleh pengobatan.

Uji konformatif untuk diagnosis demam tifoid adalah biakan darah. Uji ini sangat spesifik, namun banyak memberikan hasil yang negatif semu (kurang sensitif), kurang praktis karena hasil pemeriksaan baru diperoleh setelah satu minggu, padahal penderita harus secepatnya ditangani dengan

pemberian antibiotik yang adekuat dan memerlukan biaya yang tidak murah.

Uji PCR untuk penentuan DNA *Salmonella typhi*, membutuhkan biaya yang mahal, peralatan khusus, sedikitnya diperlukan dua ruang laboratorium khusus sehingga kurang praktis, mudah terjadi otokontaminasi dan tidak semua golongan masyarakat dapat menjangkaunya. Padahal demam tifoid kebanyakan terjadi pada masyarakat dengan tingkat sosial ekonomi rendah.

Dot-DOT-EIA-OMP merupakan uji laboratoris yang dipakai untuk melacak antigen OMP *S. typhi*. Tes ini praktis dengan biaya lebih murah, menggunakan antibodi poliklonal. Tes ini menunjukkan sensitivitas diagnostik sebesar 93% (dengan standar emas uji PCR). Spesifisitas diagnostik hanya sebesar 77% dan waktu pemeriksaan 5 jam. Bila antibodi poliklonal ini diganti dengan antibodi monoklonal diharapkan spesifisitas diagnostiknya akan meningkat secara bermakna.⁵

Antigen OMP (Outer Membrane Protein) yang terdapat pada hampir separuh komponen protein penyusun membran sel bakteri *S. typhi*. Protein ini terdiri dari dua bagian besar yang disebut protein porin (mayor) dan protein non-porin (minor). Porin

* Laboratorium Patologi Klinik FK. Unair / RSU Dr. Soetomo Surabaya, e-mail : pdsptaklin_sby@telkom.net

akan dipaparkan ke permukaan sel bakteri dan merupakan antigen yang berperan penting pada patogenesis penyakit. Pada elektroforesis, porin membentuk banyak *band* (OMP-C, OMP-D, OMP-F) dan beberapa *band* (OMP-C dan OMP-F) bersifat antigenik. Menurut Asma Ismail et al,⁶ dari *Universitas Sains Malaysia*, mengemukakan bahwa protein yang mempunyai BM 50 kDa bukan merupakan antigen Vi, antigen flagella, maupun antigen somatik, tetapi merupakan OMP-C, karena berlokasi di *Outer Membrane*, juga tidak mengikat *Periodic acid Schiff*.⁷

Protein non-porin terdiri dari OMP-A, protein A dan lipoprotein. Fungsi dari ketiga protein tersebut belum diketahui dengan jelas.⁸ Hasil penelitian yang telah dilakukan melaporkan bahwa OMP-A diduga bekerja sebagai reseptor untuk bakteriolisin, berperan dalam menjaga integritas *Outer Membrane* dan bentuk sel bakteri.^{9,10} Protein A diduga merupakan suatu protease lipoprotein dan diperkirakan berperan mengatur struktur primer dalam menstabilkan kerangka kompleks *Outer Membrane peptidoglikan*.¹¹ Di lain pihak uji konformatif yaitu biakan darah sering kali memberikan hasil yang negatif palsu, yaitu sulit tumbuh karena penderita sering diberi terapi antibiotika sebelum diperiksa uji laboratoriumnya. Bila dapat ditemukan bagian antigen yang spesifik dari *S. typhi* yang dapat dideteksi pada fase dini perjalanan penyakit, maka dapat dikembangkan menjadi uji diagnostik yang cepat, tepat dan terandal.

Penelitian tentang jenis faga yang dilakukan oleh Maria 1996, (*unpublished*) didapatkan faga UVS, UNS, A, D2, dan B1. Kelima jenis faga tersebut belum ditentukan imunogenisitasnya. Untuk keperluan diagnostik dibutuhkan adanya antigen *S. typhi* yang murni dalam arti mempunyai spesifisitas yang tinggi, sehingga dapat menyingkirkan hasil tes *S. typhi* untuk penderita demam tifoid yang positif palsu atau negatif palsu.¹²

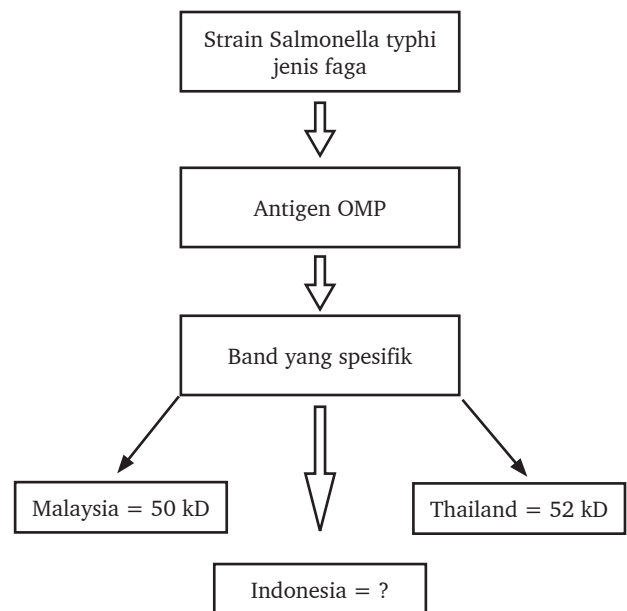
Berdasarkan latar belakang di atas timbul masalah bagian dari antigen OMP *S. typhi* faga lokal yang manakah spesifik terhadap antibodi penderita demam tifoid di Indonesia dapat memberikan hasil yang diharapkan, sehingga dengan ditemukannya antigen OMP *S. typhi* faga lokal yang spesifik, sebagai sarana penunjang diagnostik yang andal (sensitif dan spesifik), dapat mendeteksi penyakit dalam stadium dini, praktis (dapat dikerjakan di lapangan) dan tidak mahal.

Rumusan Masalah: Bagian antigen OMP *S. typhi* faga lokal manakah yang spesifik terhadap antibodi penderita demam tifoid di Indonesia. Hipotesis: Terdapat bagian OMP *S. typhi* faga lokal tunggal yang bereaksi paling spesifik terhadap antibodi penderita demam tifoid di Indonesia. Tujuan penelitian untuk menentukan bagian antigen OMP *S. typhi* faga lokal yang spesifik terhadap antibodi penderita demam

tifoid di Indonesia. Manfaat penelitian dengan ditemukannya bagian antigen OMP *S. typhi strain* faga lokal yang spesifik terhadap antibodi penderita demam tifoid di Indonesia dapat membuat antibodi monoklonal yang spesifik untuk orang Indonesia dalam rangka untuk pembuatan kit diagnostik demam tifoid pada fase dini, yang tidak terpengaruh oleh pengobatan maupun reaksi anamnestik penyakit infeksi yang lain.

Pada elektroforesis protein, OMP membentuk beberapa *band*. Asma Ismail (Malaysia) mendapatkan bahwa protein 50 kDa merupakan *band* yang paling spesifik. Sedangkan Sarasombath (Thailand) mendapatkan bahwa protein 52 kDa adalah yang paling spesifik. Di Indonesia terdapat 5 *strain* faga lokal dan diharapkan dapat ditemukan bagian yang paling spesifik.

Kerangka konsep Penelitian:



BAHAN DAN METODE

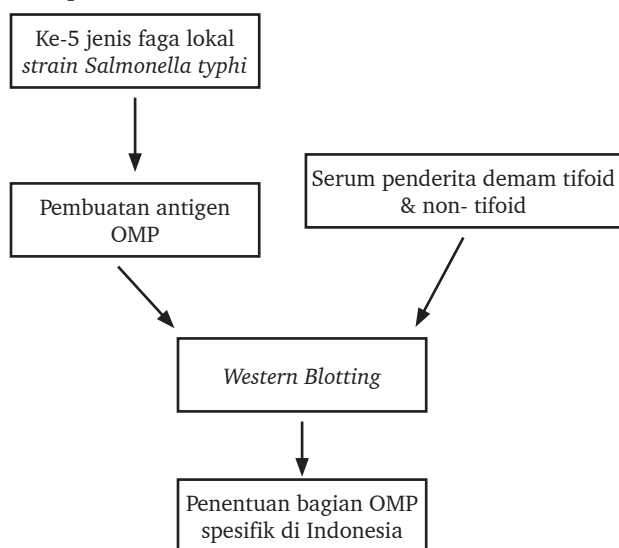
Penelitian ini dilakukan secara eksperimental laboratoris eksploratif. Penelitian ini dilaksanakan secara *cross sectional* pada penderita demam tifoid dan penderita demam lain non-tifoid sebagai grup kontrol. Sampel penelitian diambil dari penderita demam tifoid dengan kriteria biakan darah untuk *Salmonella typhi* positif. Kelompok kontrol non-tifoid diambil dari penderita demam *dengue*, infeksi pada saluran kemih bagian atas, dan penyakit lain yang merupakan diagnosis banding dari demam tifoid. Dalam penelitian direncanakan besar sampel untuk kelompok tifoid dan non-tifoid masing-masing berjumlah 10 orang.

Kriteria penerimaan sampel penderita demam tifoid adalah sebagai berikut: a) menderita demam ≥ 7 hari, b) uji perbenihan darah (uji Gal) memberikan hasil positif, c) penderita selama 2 tahun terakhir tidak pernah mendapatkan vaksin anti-tifoid, d) penderita bersedia dengan sukarela ikut serta dalam penelitian ini.

Kriteria penerimaan sampel penderita demam non-tifoid adalah sebagai berikut: a) menderita demam ≥ 7 hari, b) diagnosis penderita telah ditegakkan menderita penyakit demam tertentu seperti malaria, DBD, bronkhitis, ISK, yang bukan demam tifoid, c) uji perbenihan darah (uji Gal) negatif, d) uji Widal negatif \leq *cut-off value*, e) penderita dalam kurun waktu 2 tahun terakhir tidak pernah mendapatkan vaksinasi anti-tifoid, f) penderita bersedia sukarela ikut dalam penelitian ini.

Kriteria penolakan sampel: a) penderita telah mendapatkan pengobatan kortikosteroid atau immunosupresif yang lain, b) penderita mengalami malnutrisi berat, disertai penyakit lain yang mengganggu sistem imunologis humoral.

Alur penelitian:

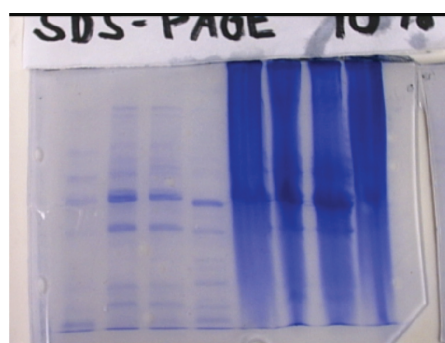


Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik FK Unair/RSUD Dr. Soetomo dan TDC Unair, antara November 2004 sampai Agustus 2005. Pembuatan antigen OMP dipakai cara,¹³ sedangkan metode pemurnian OMP dilakukan dengan cara *Gel-filtration chromatography* Western Blot dilakukan dengan *electro-blotting* setelah pemisahan dengan SDS-PAGE 7,5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pembiakan dari *Salmonella typhi* strain lokal telah berhasil dibuat menjadi OMP (*Outer Membrane Protein*) menurut metode,¹³ dan pada pemisahan dengan SDS-PAGE dan pengecatan Coomassie Blue tidak menunjukkan perbedaan pola di antara keempat tipe faga (76-7-80 -N). Hasil kerja di PAU Yogyakarta adalah sebagai berikut: Pada hari pertama dilakukan optimasi dengan SDS-PAGE 10% dan 12%, dengan hasil seperti tampak pada Gambar 1 dan 2.

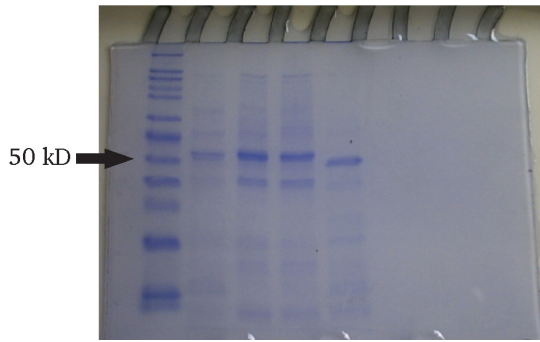
Kedua gambar tersebut menunjukkan bahwa pemisahan dengan SDS-PAGE 12% dengan sentrifugasi memberikan penampilan separasi yang terbaik. Pada hari kedua dilakukan lagi pemisahan SDS-PAGE bersama dengan marker (Sigma: Wide Range) dan dibiarkan semalam dengan *Blocking*



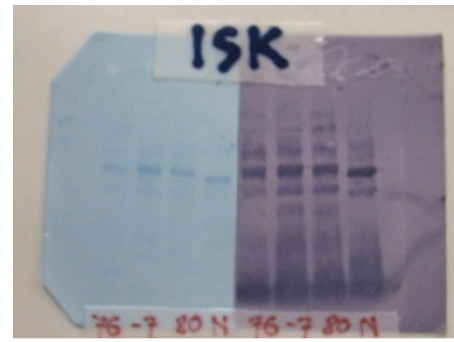
Gambar 1. Pemisahan OMP dengan SDS-PAGE 10% Lajur (Lane) 1-4: Crude OMP dengan pemusingan (sentrifugasi), 5-8: tanpa pemusingan (sentrifugasi)



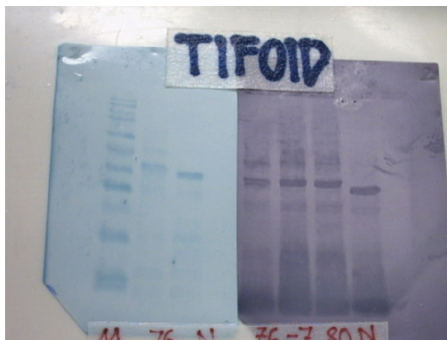
Gambar 2. Pemisahan OMP dengan SDS-PAGE 12% Lajur (Lane) 1-4: dengan pemusingan (sentrifugasi), lajur (lane) 5-8 tanpa pemusingan (sentrifugasi)



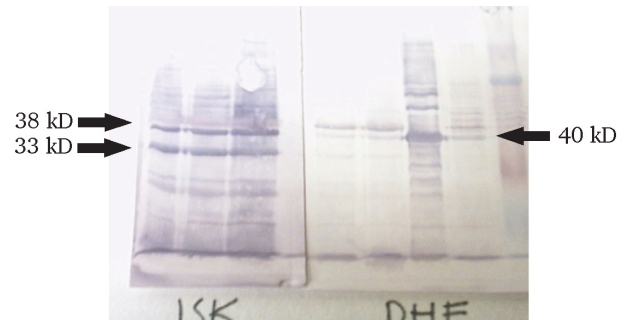
Gambar 3. Pengecatan *Coomassie Blue*. Lajur (Lane) 1: penanda berat molekul (*Molecular Weight Marker*) dengan 13 gegelang (*band*). Tampak pada keempat jenis faga, terdapat \pm 50 KDa yang merupakan OMP



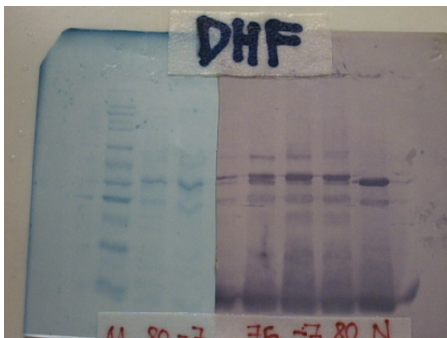
Gambar 6. Hasil reaksi yang menggunakan kumpulan (*pooled*) sera penderita Infeksi Saluran Kemih



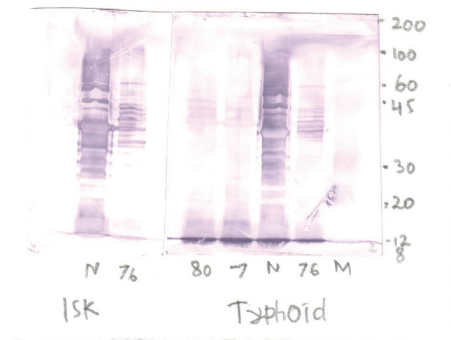
Gambar 4. Hasil reaksi dengan sera demam tifoid



Gambar 7. Hasil reaksi antigen OMP yang menggunakan kumpulan (*pooled*) sera penderita ISK dan DHF



Gambar 5. Hasil reaksi yang menggunakan kumpulan (*pooled*) sera penderita DHF



Gambar 8. Hasil reaksi antigen OMP yang menggunakan kumpulan (*pooled*) sera penderita ISK dan Demam tifoid. Tidak tampak adanya gegelang (*band*) yang khas (*spesifik*) penderita demam tifoid

Buffer, kemudian dilakukan pengecatan *Coomassie Blue*.

Pada hari berikutnya dilakukan lagi pemisahan OMP dengan SDS-PAGE dan diikuti dengan Western Blot, lalu direaksikan dengan pooled sera dari penderita demam tifoid, penderita DBD dan infeksi saluran kemih. Marka dicat dengan Amido Black, sedangkan sebagai substrat dipakai BCIP/NBT.

Dari pengamatan ketiga hasil reaksi di atas, tidak menunjukkan adanya perbedaan pola reaksi terhadap antigen OMP, karena tidak dapat dilihat adanya band yang spesifik pada salah satu kelompok pooled sera. Guna mendapatkan hasil yang lebih baik dicoba

lagi prosedur di atas di TDC Surabaya, dengan hasil sebagai berikut.

Pada penderita DBD nampak reaksi spesifik terhadap pita dengan BM \pm 40 kD. Pada penderita ISK nampak reaksi spesifik terhadap pita dengan BM \pm 33 & 38 kD.

Tak nampak adanya band yang spesifik pada penderita demam tifoid.

Dari hasil penelitian ini belum berhasil ditemukan adanya reaksi spesifik dari bagian antigen *OMP* dengan serum penderita tifoid. Hasil ini berbeda dengan penelitian di Malaysia yang menyatakan bahwa *OMP-C* dengan BM 50 kD merupakan bagian yang spesifik dan antigenik. Perbedaan hasil ini tampaknya sesuai dengan hasil dari uji Typhi Dot yang kurang memuaskan di Pakistan dibandingkan di Malaysia.¹⁴ Sarasombath di Thailand menyatakan bahwa antigen *OMP* yang spesifik adalah 52 kD.¹¹

SIMPULAN DAN SARAN

Bagian antigen *OMP* yang spesifik terhadap sera demam tifoid walaupun belum ditemukan, namun usaha ini harus tetap dilanjutkan dalam rangka menemukan bagian antigen yang paling spesifik untuk dikembangkan menjadi sebuah kit diagnostik. Sebagai alternatif penggunaan *OMP*, dapat dipertimbangkan kembali antigen LPS sebagai uji diagnostik demam tifoid. Kemungkinan lain adalah adanya kekurangsempurnaan dalam penelitian ini, mungkin preparasi *OMP* yang dihasilkan kurang murni. Makin sedikitnya penderita demam tifoid fase akut yang biakan darahnya positif, menyebabkan penelitian ini makin sulit, ditambah pula pada fase akut ini antibodi yang timbul ini belum tinggi kadarnya, sehingga kurang nampak reaksinya pada *Western Blot* ini. Patut dipertimbangkan pemilihan penderita biakan positif *Salmonella typhi* dengan titer Widal yang tinggi (1/320 atau 1/640) mungkin dapat dipakai untuk mendapat hasil yang lebih tajam. Berbeda dengan hasil di Malaysia, di mana antigen *OMP* 52 kD dinyatakan spesifik untuk demam tifoid, maka di Indonesia tidak berhasil ditemukan bagian antigen yang bereaksi spesifik ini. Untuk pengembangan tes diagnostik hendaknya dipilih kandidat antigen selain *OMP*, yang diperkirakan merupakan bagian yang spesifik. Nampaknya, perlu dipertimbangkan

pemakaian kombinasi dari beberapa tes serologi yang ada, untuk mendeteksi kasus demam tifoid lebih optimal.¹⁵

DAFTAR PUSTAKA

1. Kusumawati Rd. Uji ELISA-Ty Sebagai Penunjang Diagnosis Demam Tifoid Pada Anak. Karya Akhir. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, 1996.
2. Sippel JE, Hanafi HM, Diab AS, Prato C, Arroyo R. Serodiagnosis of Typhoid Fever In Paediatric Patient by anti-LPS ELISA. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 1987; 81: 1022–6.
3. Sherwal BL, Dhamija RK, Randhawa VS, Jais M, Kaintura A, kumar M. "A Comparative Study of Typhidot and Widal test in Patients of Typhoid Fever" *JACM* 2004; 5(3): 244–6.
4. Baron EJ, Finegold SM. *Enterobacteriaceae*. In: *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 8th edition. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc: 1990; 363–85.
5. Purwaningsih S, Handojo I, Prihatini, Probahoosodo, Y. Diagnostic value of Dot-Enzyme-Immunoassay test to detect outer membrane protein antigen in sera of patients with typhoid fever. *Southeast Asian J. Trop Med Public Health.* 2001; 32: 507–12.
6. Ismail A, Hal OK, Kader Z. Demonstration of an antigenic protein specific for *S. typhi*. *Biochemical and Biophysical Communication*, 1991; 81(1): 301–5.
7. Calva E, Puente JL. *S typhi* Outer Membrane Protein: Their roles in Typhoid Fever. In: *Second Asia-Pacific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis*, Sarasombath S, Senawong S, Bangkok, 1995; 138–44.
8. Gam LH. Antibody responses to bacterial outer membrane and flagellar proteins in Typhoid Fever. *Kuala Lumpur: University of Malaka Agents. J. Immunol Method* 1992; 158: 67–76.
9. Rodrigues AV, Vital YP, Puente JL. Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1993; 12: 248–54.
10. Rodrigues AV, Gan LH, Devi S. Detection of antibodies against *S. typhi* outer Membrane protein preparation in typhoid fever patient. *Asian-Pacific J. Allergy and Immun.* 1993; 11: 45–52.
11. Sarasombath S. Immune response in typhoid fever. In (*Typhoid Fever strategies for the '90's*. World Scientific Publishing co Singapore and London, 1992; 11–5.
12. Anggraini R. Uji Dot EIA dengan antigen *OMP Salmonella typhi* jenis faga local sebagai penunjang diagnosis demam tifoid. Tesis Pasca Sarjana Unair. 2002; 76–84.
13. Matsuyama SI, Inokuchi K, Mitzushima S. Promoter exchange between *OmpF* and *OmpC* for osmoregulated major outer membrane proteins of *Escherichia Coli* K-12. *J Bacteriol* 1984; 158: 1041–7.
14. Bhutta ZA, Mansurali N. Rapid Serologic Diagnosis of Pediatric Typhoid Fever in an Endemic Area: A Prospective Comparative Evaluation of Two dot – Enzyme Immunoassays and The Widal Test. *Am. J. Trop Med*, 1999; (61): 654–7.
15. Dong B, Galindo CM, Shin E. Optimizing Typhoid Fever Case Definitions by Combining Serological Tests in a Large Populations Study in Fleechi City, China. *Epidemol Infect* (2007); 135: 1014–20.