

**Evaluasi Sensitifitas dan Spesifitas ELISA dan PBA untuk Deteksi IgM
Terhadap Antigen LPS *Salmonella* Typhi**

Helmy Widyastuti

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Hasanuddin, Makassar 90245
email: helmywidyastuti@gmail.com

Abstrak

Tingginya prevalensi demam tifoid di negara-negara yang sedang berkembang, termasuk Indonesia, mendorong perlunya pengembangan berbagai uji serologi dan metode deteksi antigen guna memperoleh diagnosis dini dan akurat terhadap penderita demam tifoid. Meskipun demam tifoid ditentukan melalui kultur *Salmonella enterica* serotype Typhi, namun masih sangat diperlukan uji serologi yang cepat dan sederhana, serta evaluasi diagnostic demam tifoid yang efektif dan tepat. Dalam studi ini, kami mengevaluasi dan membandingkan sensitivitas dan spesifisitas ELISA dan PBA sebagai uji serologi berbasis agglutinasi terhadap antigen LPS *Salmonella* Typhi dan efektivitas antigen lokal dalam mendeteksi produksi antibodi spesifik (IgM) pada penderita demam tifoid. Kami mengumpulkan sampel serum dari 50 suspek demam tifoid yang diperoleh dari Rumah Sakit Umum DR. Wahidin Sudirohusodo, Rumah Sakit Umum Daya, Rumah Sakit Umum Gowa, dan PUSKESMAS Kassi-Kassi di Makassar, Sulawesi Selatan. Penderita dikelompokkan berdasarkan jenis kelamin, lamanya demam, dan umur. Titer antibodi serum diukur dengan menggunakan ELISA dan PBA. Data dianalisis secara statistik dengan menggunakan cross tabulation and chi-square (CI = 95%). Hasil studi ini menunjukkan bahwa teknik PBA memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas, masing-masing, 100% dan 92 %, sedangkan sensitifitas dan spesifisitas ELISA masing-masing adalah 84% dan 28%. Hal ini menunjukkan bahwa PBA memiliki tingkat spesifisitas dan sensitivitas yang lebih tinggi daripada ELISA. Kami juga menunjukkan bahwa antigen LPS yang diperoleh dari isolat lokal *Salmonella* Typhi dapat digunakan sebagai antigen standar dalam mendiagnosis demam tifoid.

Kata kunci: Antigen LPS, ELISA, PBA, *Salmonella* Typhi

**Evaluation of Sensitivity and Specificity of ELISA and PBA for IgM Detection to LPS
Antigen of *Salmonella* Typhi**

Abstract

The high prevalence of typhoid fever in developing countries, including Indonesia has prompted the exploration of various serologic tests and antigen detection method to obtain an early and accurate diagnosis of patients with typhoid fever. Although typhoid fever is confirmed by culture of *Salmonella enterica* serotype Typhi, there is still an urgent need for the rapid, simple serological tests and evaluation of effective and appropriate diagnostics for typhoid fever. In this study, we evaluated and

compared the sensitivity and specificity of ELISA and Passive Bacterial Agglutination (PBA) as an agglutination-based serological test to LPS antigen of Salmonella Typhi and the effectiveness of local antigen in detecting the production of specific antibody (IgM) to patient with typhoid fever. We collected serum sample of 50 suspected typhoid fever from DR. Wahidin Sudirohusodo General Hospital, Daya General Hospital, Gowa General Hospital and Kassi-Kassi Public Health Center in Makassar, South of Sulawesi. They were grouped based on sex, duration of fever, and age. Serum antibody titer were measured by ELISA and PBA. Data were analyzed statistically by using cross tabulation and chi-square (CI = 95%). The Result of this study showed that PBA technique has the level of sensitivity and specificity respectively 100% and 92 %, while ELISA was 84% and 28%. It suggested that PBA has a greater level of sensitivity and specificity than ELISA. We also showed that LPS antigen that we obtained from local isolate of Salmonella Typhi, can be used as a standard antigen in diagnosing typhoid fever.

Keywords: LPS antigen, ELISA, PBA, Salmonella Typhi

PENDAHULUAN

Demam tifoid merupakan infeksi sistemik akut pada sistem retikuloendotelial yang disebabkan oleh *Salmonella enterica* serotype Typhi yang menyebabkan morbiditas signifikan dengan estimasi *global annual burden* lebih dari 27 juta kasus, yang menyebabkan lebih dari 200.000 kematian (Buckle, 2012). Penyakit ini terjadi di beberapa negara yang sedang berkembang diantaranya negara dengan sistem kesehatan yang rendah (Lozano *et al.*, 2012) dan area endemik yang meningkat resiko penyebaran strain *multiantibiotic-resistant*-nya karena adanya urbanisasi, migrasi, travelling dan perdagangan (Jensenius *et al.*, 2013; Leder *et al.*, 2013; Rahman, *et al.*, 2013).

Indonesia merupakan negara endemik demam tifoid. Berdasarkan data *World Health Organization* (WHO), lebih dari 100/100.000 orang terjangkiti setiap tahunnya. Pada tahun 2007, prevalensi nasional untuk demam tifoid adalah sebesar 1.6 %. Data tersebut berdasarkan data dari *National Institute of Health Research and Development*. Dua belas propinsi di Indonesia menunjukkan tingkat prevalensi yang lebih besar dibandingkan tingkat prevalensi nasional. Prevalensi tertinggi ditemukan pada anak-anak usia sekolah (5 hingga 14 tahun) (Rahman, *et al.*, 2013).

Diagnosis yang akurat terhadap demam tifoid pada tahap awal sangat penting, tidak hanya untuk mendiagnosis agen etiologinya, namun juga untuk mengidentifikasi individu yang dapat berpotensi sebagai karier, yang bertanggung jawab terhadap penjangkitan demam tifoid akut (Gopalakrishnan, *et al.*, 2002). Beragam teknik sedang digunakan untuk diagnosis demam tifoid diantaranya teknik kultur, uji serologi, uji biokimia dan teknik molekuler. Diagnosis praktis yang paling sering digunakan adalah uji Widal dan kultur darah karena metode ini dianggap murah sedangkan metode lain dianggap invasif, mahal dan memerlukan waktu yang lama (Haque, *et al.*, 1999).

Diagnosis tifoid memerlukan konfirmasi laboratorium karena gejala yang ditimbulkan oleh penyakit ini serupa dengan penyakit demam lainnya. Kultur darah masih digunakan sebagai uji standar baku (*gold standard*) yang digunakan untuk mengkonfirmasi penyakit ini, meskipun uji kultur memiliki beberapa keterbatasan. Sensitivitas kultur dapat berkurang dengan adanya pengaruh durasi demam dan fasilitas kultur kadang jarang dijumpai di area endemik (Smith, *et al.*, 2011). Tingkat bakteri yang terisolasi dari darah mencapai 90% pada penderita yang tidak diobati pada minggu pertama; namun demikian jumlahnya akan menurun kurang dari 50% pada minggu ketiga (Keusch, *et*

al. 1994). Sensitivitas kultur darah lebih tinggi pada minggu pertama penyakit dimana berkurang oleh adanya pemberian antibiotik, dan meningkat seiring dengan volume darah yang dikultur dan rasio darah dengan broth (Waint, *et al.*, 1999).

Kebutuhan akan uji alternatif maupun uji konfirmasi lainnya untuk menegakkan diagnosis demam tifoid secara akurat mendorong pengembangan uji serologi diantaranya counterimmuno-electrophoresis, ELISA, RIA dan uji haemagglutinas (Ismail, 2000). *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) dianggap sebagai pendekatan alternatif untuk diagnosis demam tifoid (Sattar, *et al.*, 2014).

Selain ELISA, uji koagglutinas juga digunakan untuk deteksi antigen dalam urine dan serum. Dalam penginterpretasian uji ini, IgM yang terdeteksi akan menunjukkan tifoid akut (fase awal infeksi), sementara adanya IgM maupun IgG yang terdeteksi akan menunjukkan tifoid akut (fase pertengahan infeksi) Uji ini dianggap sederhana dan cepat untuk diagnosis demam tifoid. Uji Koagglutinas didasarkan aglutinasi pada *antibody-coated staphylococci* oleh antigen somatik *Salmonella Typhi* dalam serum pasien. Istilah "koagglutinas" telah digunakan untuk prosedur uji diagnosis jika antigen berada dalam bentuk partikulat, dan istilah "*Passive Bacterial Agglutination*" (PBA) digunakan jika antigen yang digunakan berupa antigen solubel (John, *et al.*, 1984). Uji *Passive haemagglutination* telah digunakan dan terbukti memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi, terutama jika digunakan di area endemik (Ismail, 2000).

Pengembangan berbagai uji memerlukan antigen yang spesifik untuk diagnosis tifoid. Upaya untuk memperoleh antigen spesifik telah dilakukan bertahun-tahun. Antigen kandidat yang digunakan dalam pengembangan uji deteksi antigen atau antibodi memiliki beragam sensitivitas dan spesifisitas. Beberapa kandidat antigen, diantaranya protein membran terluar (OMP), lipopolisakarida dan protein heat shock (Ismail, 2000). LPS dapat bertindak sebagai mitogen sel B yang menstimulasi diferensiasi poliklonal dan multiplikasi sel-sel B dan sekresi immunoglobulin, terutama IgG dan IgM (Todar, 2005)

Dengan demikian, melalui penelitian ini, kami akan mengevaluasi sensitivitas dan spesifisitas kedua uji serologi yang berbasis agglutinas ini, yakni ELISA dan PBA terhadap Lipopolisakarida (LPS) dengan menggunakan antigen lokal yang diperoleh dari isolat *Salmonella Typhi* di Makassar.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan adalah spoit 1 ml, sentrifuge, Eppendorf 1.5 ml, mikropipet multichannel 400 µl, mikropipet 200 µl, ELISA reader, water bath, Round bottom microtiter plate, Tip Pipet, rak tabung, pipet 5 ml, Tabung falcon 50 ml, Vortex, Neraca elektrik, alat *reading mirror*, *Micromixer*, tabung reaksi kecil, incubator, otoklaf, ose, Bunsen, gelasukur, kamera digital.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah 50 sampel serum suspek penderita demam tifoid, antigen LPS dari isolat *S. Typhi* di Makassar, *Bile Broth*, medium *Salmonella-Shigella Agar* (SSA), TSIA agar, Medium SIM, Medium MR-VP, Medium uji urea, medium Uji Citrate (SCA), Medium uji gula-gula, Buffer pencuci (PBST 0,1 %), Larutan Pemblok (PBS 1% BSA), Larutan H₂SO₄, larutan Substrat (TMB), Buffer fosfat sitrat pH 5,0, Buffer karbonat, Conjugate (Capple), Phosphate-Buffered

Salin (PBS) pH 7,4, alcohol 96%, aseton, formalin, PBS 0,03 M. Bromfenol Blue (BFB) 0,01%, Biakan *Eschericia coli*, Biakan *Staphylococcus aureus*.

Prosedur Kerja

Kultur Bakteri

Sampel dimasukkan ke dalam medium *Ox Bile Broth* 1:10 kemudian diinkubasi pada suhu 35-37 °C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diinokulasi ke dalam medium *Salmonella shigella* pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan uji biokimiawi yakni uji *Triple Sugar iron Agar* (TSIA), *Sulfit Indol Motility* (SIM), *Methyl Red-Voges Proskauer* (MR-VP), urea, citrate (uji SCA) dan uji gula-gula. Masing-masing diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Teknik ELISA

Tahap pertama : Antigen LPS 1/1000 dilarutkan dalam *coating buffer* dan dimasukkan sebanyak 50 µl dalam tiap *well*, sementara *well* pada A dibiarkan kosong. Plate ditutup dan diinkubasi selama 16-18 jam pada suhu 4 °C (dalam lemari es).

Tahap kedua : dilakukan rakasi antigen-antibodi. Plate dicuci dengan *washing buffer* (0,85% NaCl + 0.05 tween 20) sebanyak 3 kali selama 1x1 menit dan 2x2 menit. Kemudian *blocking buffer* (PBS + 1% BSA) sebanyak 100 µl ditambahkan pada setiap *well* dimasukkan sebanyak 50 µl sampel serum yang telah didilusi 100x dengan PBST + 10% NGS. Plate ditutup dan diinkubasi selama 4 jam pada suhu ruangan. Kemudian, plate dicuci sebanyak 5 kali, selanjutnya pada tiap *well* dimasukkan sebanyak 50 µl larutan conjugate yang telah didilusi 20.000x dengan PBST + 10% NGS, lalu diinkubasi pada suhu 4 oC selama satu malam.

Tahap ketiga: plate dicuci dengan *washing buffer* (0,85% NaCl + 0.05 tween 20) sebanyak 4x, kemudian pada tiap *well* ditambahkan TMB sebanyak 50 µl. Plate ditutup dan disimpan pada suhu ruangan selama 15 menit dalam tempat gelap (sampai warna berubah menjadi biru). Reaksi dihentikan dengan penambahan H₂SO₄ 0,5 M pada tiap *well* sebanyak 50 µl dan substrat akan berwarna kuning. Hasil reaksi dibaca dengan *ELISA reader* pada filter 450 nm. Reaksi positif apabila hasilnya 0,350.

Teknik Passive Bacterial Agglutination (PBA)

Untuk kontrol positif, sebanyak 5 µl reagent PBA (1 koloni *Staphylococcus aureus* distabilkan dengan formalin, disensitisasi dengan campuran 10% (vol/vol) suspensi PBS 0,03 M dengan antiserum *S. Typhi* dengan perbandingan 10:1 (vol/vol). kemudian diinkubasi pada suhu 37 °c selama 2 jam dalam waterbath. Disentrifus pada 12.000 rpm, lalu dicampur dengan 1000 µl PBS, divortex, disentrifus lagi hingga diperoleh sedimen. Sedimen diambil dan ditambahkan dengan 1000 µl PBS 1%, kemudian divortex. Disimpan pada suhu -4 °C), 5 µl antigen LPS, 80 µl PBS dan 10 µl BFB 0.01% dimasukkan dalam setiap *well*, dihomogenkan dengan mikromixer, diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Diamati dengan alat *reading mirror*.

Untuk kontrol negatif, sebanyak 5 µl reagen kontrol (1 koloni *Staphylococcus* dicampur dengan 500 µl antiserum, kemudian divortex selama 5 menit, disimpan pada suhu -4 °C), 5 µl antigen LPS, 80 µl PBS dan 10 µl BFB 0.01% dimasukkan dalam setiap *well*, dihomogenkan dengan mikromixer, diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Diamati dengan alat *reading mirror*.

Untuk skrining serum penderita, sebanyak 5 µl serum penderita, 5 µl antigen LPS, 80 µl PBS dan 10 µl BFB 0.01% dimasukkan dalam setiap *well*, dihomogenkan dengan mikromixer, diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Diamati dengan alat *reading mirror*. Reaksi positif jika terjadi penggumpalan.

Untuk pembacaan hasil uji PBA didasarkan pada gumpalan yang terbentuk, dimana:

- Jika gumpalan yang terjadi besar, dan jelas di seluruh permukaan *microplate*, disebut positif 4 (++++)
- Jika gumpalan kecil-kecil dan memenuhi *microplate*, disebut positif 3 (+++)
- Jika gumpalan kecil-kecil, setengah dari *microplate*, disebut positif 2 (++)
- Jika gumpalan kecil dan sedikit, kurang dari setengah *microplate*, disebut positif 1 (+)
- Jika tidak ada gumpalan, disebut negatif (-)

Analisis Data

Tingkat sensitifitas, spesifisitas, Positive Predictive Value (PPV) dan Negative Predictive Value (NPV) dihitung dengan rumus berikut :

Sensitivitas = $a/(a+c) \times 100$, spesifisitas = $d/(d+b) \times 100$, PPV = $a/(a+b) \times 100$ dan NPV = $d/(d+c) \times 100$

Dimana a ; *test positive & true positive*

b : *test positive & true negative*

c : *test negative & true positive*

d : *test negative & true negative*

true positive & true negative masing-masing merupakan kultur darah positif atau negatif. Data juga dianalisis dengan menggunakan analisis statistic tabulasi silang (*crosstabs*) yang dilanjutkan dengan uji *chi-square* (chi kuadrat) pada program SPSS versi 12.0

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini digunakan 50 sampel serum suspek penderita demam tifoid yang dibagi dalam beberapa kelompok , yakni kelompok umur dengan kisaran umur 4-85 tahun, lama demam dengan kisaran 2-13 hari dan jenis kelamin (Laki-laki dan perempuan). Berdasarkan umur, pasien dikelompokkan menjadi 0 – 10 tahun sebanyak 7 orang (14%), 11-20 tahun sebanyak 11 orang (22%), 21-30 tahun sebanyak 3 orang (6%), 31-40 tahun sebanyak 13 orang (26%), 41-50 tahun sebanyak 9 orang (18%) dan > 50 tahun sebanyak 7 orang (14%). Berdasarkan lama demam, dapat dikelompokkan menjadi 1-6 hari sebanyak 15 orang (30%), 7-14 hari sebanyak 26 orang (52 %) dan > 14 hari sebanyak 9 orang (18 %). Berdasarkan jenis kelamin, terdapat pasien laki-laki sebanyak 29 (58 %) dan perempuan sebanyak 21 orang (42%).

Dalam penelitian ini, dilakukan pengujian untuk melihat respon antibodi serum terhadap antigen LPS yang berasal dari isolat *S. Typhi* di Makassar (antigen lokal) pada penderita suspek demam tifoid dan mengevaluasi beberapa uji serologi dalam mendiagnosis demam tifoid. Dalam hal ini, Kultur bakteri tetap digunakan sebagai uji standar baku (*gold standard*) yang dibandingkan dengan uji lain yakni ELISA dan PBA. Teknik ELISA digunakan untuk mendeteksi kelas antibodi spesifik anti-LPS (IgM) yang dibandingkan dengan lain yang berbasis sama (agglutinasi), yakni PBA.

Tabel 1. Frekuensi penderita demam tifoid dari hasil uji kultur berdasarkan kelompok umur, lama demam dan jenis kelamin

	Uji Kultur (%)		Total (%)
	Positif	Negatif	
Kelompok umur			
0-10 tahun		11 (22%)	11 (22%)
11-20 tahun	2 (4%)	9 (18%)	11 (22%)
21-30 tahun	2 (4%)	1 (2%)	3 (6%)
31-40 tahun	10(20%)	2 (4%)	12(24%)
41-50 tahun	7 (14%)	1 (2%)	8 (16%)
>50 tahun	4 (8%)	1 (2%)	5 (10%)
Total	25(50%)	25 (50%)	50 (100%)
Lama Demam :			
1-6 hari	9 (18%)	22 (44%)	31 (62%)
7-14 hari	16 (32%)	3 (6%)	19 (38%)
>14 hari			
Total	25 (50%)	25 (50%)	50 (100%)
Jenis Kelamin			
Laki-laki	20 (40%)	9 (18%)	29 (58%)
Perempuan	5 (10%)	16 (32%)	21 (42%)
Total	25 (50%)	25 (50%)	50 (100%)

Berdasarkan analisis dengan uji *chi-square* menunjukkan bahwa tidak ada hubungan antara kelompok umur dan jenis kelamin dengan kejadian demam tifoid (P 0.05). tetapi ada hubungan antara lama demam dengan tingkat kejadian demam tifoid (P <0.05)

Positivitas dan negativitas yang ditunjukkan pada pengujian dengan kultur dibandingkan dengan hasil pengujian dengan teknik *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), diperoleh data berikut ini:

Tabel 2. Hasil Pengujian Teknik ELISA terhadap Uji Kultur

Teknik ELISA	Uji Kultur (%)		Total (%)
	Positif	Negatif	
Positif	21 (42%)	18 (36%)	39 (78%)
Negatif	4 (8%)	7 (14%)	11 (22%)
Total	25 (50%)	25 (50%)	25 (50%)

Berdasarkan analisis dengan uji *chi-square* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara hasil pengujian Teknik ELISA dengan Uji Kultur (P<0.05).

Tabel 3. Hasil pengujian Teknik ELISA berdasarkan kelompok umur, lama demam, dan jenis kelamin

	Teknik ELISA (%)		Total (%)
	Positif	Negatif	
Kelompok umur			
0-10 tahun	8 (16%)	3 (6%)	11 (22%)
11-20 tahun	9 (18%)	2 (4%)	11 (22%)
21-30 tahun	3 (6%)		3 (6%)
31-40 tahun	8 (16%)	4 (8%)	12 (24%)
41-50 tahun	7 (14%)	1 (2%)	8 (16%)
>50 tahun	4 (8%)	1 (2%)	5 (10%)
Total	39 (78%)	11 (22%)	50 (100%)
Lama Demam :			
1-6 hari	9 (18%)	22 (44%)	31 (62%)
7-14 hari	16 (32%)	3 (6%)	19 (38%)
>14 hari			
Total	25 (50%)	25 (50%)	50 (100%)
Jenis Kelamin			
Laki-laki	20 (40%)	9 (18%)	29 (58%)
Perempuan	5 (10%)	16 (32%)	21 (42%)
Total	25 (50%)	25 (50%)	50 (100%)

Berdasarkan analisis dengan uji *chi-square* menunjukkan bahwa tidak terdapat hubungan antara lama demam, jenis kelamin dan kelompok umur dengan hasil pengujian Teknik ELISA ($P > 0.05$). Adapun sensitivitas, spesifisitas, *Positive Predictive Value* (PPV) dan *Negative Predictive Value* (NPV) dari teknik ELISA adalah masing-masing 84%, 26%, 53.8 % dan 63.6%. Positivitas dan negativitas yang ditunjukkan pada pengujian dengan kultur juga dibandingkan dengan hasil pengujian dengan Teknik *Passive Bacterial Agglutination* (PBA), diperoleh data berikut ini:

Tabel 4 : Hasil Pengujian Teknik PBA terhadap Uji Kultur

Teknik PBA	Uji Kultur (%)		Total (%)
	Positif	Negatif	
0		22 (44%)	22 (44%)
+1	1 (2%)	3 (6%)	4 (8%)
+2	6 (12%)		6 (12%)
+3	12 (24%)		12 (24%)
+4	6 (12%)		6 (12%)
Total	25 (50%)	25 (50%)	50 (100%)

Berdasarkan analisis dengan uji *chi-square* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara hasil pengujian dengan teknik PBA dengan Uji Kultur ($P < 0.05$)

Adapun pengujian dengan Teknik *Passive bacterial Agglutination* (PBA) diperoleh hasil sebagai berikut :

Tabel 5. Hasil Pengujian Teknik PBA Berdasarkan Kelompok Umur, Lama Demam, dan Jenis Kelamin

	Teknik PBA (%)		Total (%)
	Positif	Negatif	
Kelompok umur			
0-10 tahun		3 (6%)	11 (22%)
11-20 tahun	5 (10%)	2 (4%)	11 (22%)
21-30 tahun	2 (4%)		3 (6%)
31-40 tahun	10 (20%)	4 (8%)	12 (24%)
41-50 tahun	7 (14%)	1 (2%)	8 (16%)
>50 tahun	4 (8%)	1 (2%)	5 (10%)
Total	28 (56%)	11 (22%)	50 (100%)
Lama Demam :			
1-6 hari	12 (24%)	22 (44%)	31 (62%)
7-14 hari	16 (32%)	3 (6%)	19 (38%)
>14 hari			
Total	28 (56%)	25 (50%)	50 (100%)
Jenis Kelamin			
Laki-laki	20 (40%)	9 (18%)	29 (58%)
Perempuan	8 (16%)	16 (32%)	21 (42%)
Total	28 (56%)	25 (50%)	50 (100%)

Berdasarkan analisis dengan uji *chi-square* menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara umur, lama demam dan jenis kelamin dengan hasil pengujian Teknik PBA ($P < 0.05$). Adapun sensitivitas, spesifisitas, *Positive Predictive Value* (PPV) dan *Negative Predictive Value* (NPV) dari Teknik PBA adalah masing-masing 100%, 88%, 89% dan 100%. Nilai sensitivitas, spesifisitas, *Positive Predictive Value* (PPV) dan *Negative Predictive Value* (NPV) dari Teknik ELISA dan PBA dapat dilihat pada tabel berikut ini :

Tabel 6. Sensitivitas, spesifisitas, *Positive Predictive Value* (PPV) dan *Negative Predictive Value* (NPV) dari Teknik ELISA dan PBA dibandingkan dengan Uji Kultur

Uji	% Karakteristik Uji			
	Sensitivitas	Spesifisitas	PPV	NPV
ELISA	84	28	53.8	63.6
PBA	100	88	89	100

Berdasarkan hasil analisis *chi-square*, diperoleh bahwa terdapat hubungan antara hasil Uji Kultur dengan lama demam, dimana rentang 7-14 hari paling banyak ditemukan hasil positif. Hal ini dapat disebabkan oleh meningkatnya jumlah *S. Typhi* dalam darah penderita (fase bakterimia/septicemia yang berat) karena belum mendapatkan pengobatan antibiotik. Dari hasil yang diperoleh dengan pengujian ELISA, diketahui bahwa reaksi positif yang diperoleh dengan Teknik ELISA dibandingkan dengan Uji Kultur, bahkan ditemui adanya penderita kultur negatif menunjukkan reaksi positif dengan ELISA, begitupun pada beberapa sampel penderita kultur positif menunjukkan reaksi negatif. Hal ini mempengaruhi tingkat sensitivitas dan spesifisitas ELISA.

Tingkat sensitivitas Teknik ELISA adalah 84% dan tingkat spesifisitasnya adalah 28%. Hal ini menunjukkan bahwa Teknik ELISA cukup sensitif tetapi kurang spesifik. Ini disebabkan karena

terjadinya reaksi silang antara antigen LPS *S.Typhi* dengan antigen lain (antigen O *Salmonella* grup A dan B). Antigen O dari grup *Salmonella* yang banyak mengandung LPS pada seluruh permukaannya, sangat kompleks, artinya terdiri dari banyak determinan (faktor) yang berbeda satu dengan yang lainnya dan tiap spesies *Salmonella* bisa memiliki dua atau lebih determinan, dimana satu diantara determinan itu merupakan *major determinant* yang bereaksi dengan kuat. Hal ini dapat menyebabkan antigen LPS mudah bereaksi silang dengan antigen serogrup *Salmonella* lainnya (antigen yang memiliki hubungan kekerabatan yang erat). Oleh karena itu, meningkatnya titer antibodi terhadap antigen LPS menunjukkan paparan terhadap agen-agen *Salmonella* demam enterik lainnya (*S.Typhi*, *S. Paratyphi A* dan *S. Paratyphi B*) atau adanya mikroorganisme lain yang memiliki antigen yang sama. Kenyataan ini berkontribusi terhadap kurangnya spesifisitas uji diagnostik serologi di daerah endemik tifoid (House, *et al.*, 2001).

Faktor Rheumatoid (RF) juga mempengaruhi terjadinya reaksi silang, dimana antibodi dari kelas IgM yang kadangkala didapatkan pada individu normal dapat pula ditemui pada penderita yang terinfeksi dengan kadar yang tinggi. Faktor ini dapat membentuk kompleks dengan antigen komplemennya atau dalam bentuk agregat yang nantinya dapat dikenali oleh konjugat spesifik untuk IgM menghasilkan reaksi positif palsu (Burgess, 1995). Selain itu, banyaknya penderita dengan kultur negatif memberikan reaksi positif dengan ELISA, menunjukkan adanya persistensi IgM. IgM khususnya muncul pada awal respon imun dan dapat bertahan lama sebagai respon terhadap beberapa antigen bakteri (Burgess, 1995). Respon IgM pada infeksi bakteri yang berhasil diobati, pada umumnya hanya dijumpai pada beberapa minggu pertama. Adanya antibodi IgM terhadap antigen *Salmonella* dapat menjadi diagnostik bermakna dibandingkan deteksi IgG pada polupasi endemik (Ismail, 2000). Selain ELISA, dilakukan juga uji serologi lain, yakni Teknik PBA. Pada teknik PBA, dilakukan reaksi antara antibodi yang terdapat di dalam serum penderita dengan antigen LPS *S.Typhi*, PBS dan BFB. Penggunaan BFB adalah sebagai indikator untuk terjadinya aglutinasi antara antigen dan antibodi.

Kebanyakan penderita masuk rumah sakit setelah demam beberapa hari dan mungkin telah mencapai titer antibodi puncak pada saat spesimen darah diambil. Beberapa pasien antigennya terstimulasi oleh infeksi yang tidak nampak sebelum demam, sehingga bersifat anamnestic. Ada beberapa indikasi bahwa respon anamnestic terjadi pada pasien karena pada uji aglutinasi pasien tidak selalu memberikan respon terhadap antigen serogrup *Salmonella* sp. Yang diisolasi dari tubuh penderita. Hal ini ditunjukkan oleh pengujian dari Teknik PBA dengan ELISA, dimana beberapa sampel serum penderita negatif dengan PBA tetapi memberikan reaksi positif dengan ELISA. Dengan demikian, Teknik ELISA dianggap kurang akurat dibandingkan dengan teknik PBA untuk mendeteksi IgM terhadap antigen LPS *S.Typhi* yang terlihat dari tingkat spesifisitas yang rendah. Dalam hal ini diperlukan uji tambahan agar dapat mendukung keakuratan diagnosis demam tifoid. Menurut Coovadia (1986), PBA memiliki beberapa kelebihan karena tidak membutuhkan peralatan yang rumit, memberikan hasil positif dan negatif yang jelas, mudah dilakukan, dapat menggunakan *microtiter plate* untuk menguji spesimen dalam jumlah besar dalam sekali pengerjaan. Hal tersebut menjadikan Teknik PBA cocok digunakan khususnya di laboratorium kecil di area endemik. Penggunaan Teknik PBA untuk deteksi antibodi terhadap antigen LPS *S. Typhi* yang dikombinasikan dengan uji Kultur akan meningkatkan keakuratan diagnosis dan memungkinkan diagnosis dini dan cepat terhadap demam tifoid.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa tingkat sensitivitas dan spesifisitas dari Teknik ELISA adalah 84% dan 28%, sedangkan tingkat sensitivitas dan spesifisitas dari Teknik PBA adalah 100% dan 92%. Teknik PBA lebih akurat dibandingkan dengan Teknik ELISA dalam mendiagnosis demam tifoid terhadap antigen LPS *Salmonella* Typhi. Antigen Lipopolisakarida (LPS) yang berasal dari isolat *Salmonella* Typhi di Makassar dapat dijadikan sebagai antigen standar untuk mendeteksi produksi antibodi dari penderita demam tifoid.

DAFTAR PUSTAKA

- Buckle, G. C., Walker, C. L., and Black, R. E. 2012. Typhoid Fever and Paratyphoid Fever: Systematic Review to Estimate Global Morbidity and Mortality for 2010. *J. Glob. Health* 2:010401.
- Burgess, W. Graham. 1995. Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. *Textbook*. Univesitas Gadjah Mada Press. Yogyakarta.
- Coovadia, Y.M., Singh, V., Bhana, RH. 1986. Comparison of Passive Haemagglutination Test with Widal Agglutination Test for Serological Diagnosis of Typhoid Fever in an Endemic Area. *J.Clin.Pathol.* 39 : 680-683.
- Gopalakrishnan V, Sekhar WY, Soo EH, Vinsent RA, Devi S. 2002. Typhoid fever in Kuala Lumpur and A Comparative Evaluation Of Two Commercial Diagnostic Kits For The Detection of Antibodies To Salmonella Typhi. *Singapore Med J*, 43(7): 354–358.
- Haque, A., Jambaz, javed, Q., 1999. Early Detection of Typhoid Fever by Polymeration Chain Reaction. *Ann Saudi Med.* Pakistan.
- House D, Wain J, Ho VA, Diep TS, Chinh NT, *et al* .,2001. Serology of Typhoid Fever in an Area of Endemicity and Its Relevance to Diagnosis. *J Clin Microbiol* . 39: 1002-1007.
- Ismail, A. 2000. New Advances Diagnosis of Typhoid and Detection of Typhoid Carriers. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 7(2): (3-8).
- Jensenius, M., P.V. Han, P. Schlagenhauf, E. Schwartz, P. Parola, F. Castelli, *et al*. 2013. Acute and Potentially Life-Threatening Tropical Diseases in Western Travelers--a GeoSentinel Multicenter Study,1996-2011. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*88:397–404.
- John, T. J., K. Sivadasan and Betty, K. 1984. Evaluation of Passive Bacterial Agglutination for the Diagnosis of Typhoid Fever. *Journal of Clinical Microbiology*. 20(4): 751-753.
- Keusch GT. Salmonellosis. In: Harrison's Principles of Internal Medicine (13rd ed). Ed: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. 1994. Mc GrawHill Book Company. New York. pp.671-676.
- Leder, K., J. Torresi, J.S. Brownstein, M.E. Wilson, J.S. Keystone, E. Barnett, *et al*. 2013. GeoSentinel Surveillance Network. Travel-associated illness trends and clusters, 2000-2010. *Emerg. Infect. Dis.*19:1049–1073.
- Lozano, R., M. Naghavi, K. Foreman, S. Lim, K. Shibuya, V. Aboyans, *et al*. 2012. Global and Regional Mortality from 235 Causes of Death for 20 Age Groups in 1990 and 2010: a Systematic Analysis for The Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 380:2095–2128.

- Rahman,T.,Hoden,I., Chakraborty, S., 2013. A Rapid Glimpse on Typhoid Fever: An Updated Mini Review. *Journal of Life Medicine JLM* Volume 1, Issue 3 October , PP. 71-82.
- Sattar, A.A, M Abdullah Yusuf, M Bodrul Islam. 2014. Different Diagnostic Procedure of Typhoid Fever: A Review Update *J Curr Adv Med Res* 1(2):35-41.
- Smith, Stella I. Moses. Bamidele, Muinah Fowora Helen T. Goodluck , Emmanuel A.Omonigbehin , *et al.*, 2011. Application of A Point-of-care Test for The Serodiagnosis Of Typhoid Fever in Nigeria and The Need for Improved Diagnostics. *J Infect Dev Ctries*: 5(7):520-526.
- Todar, K., 2005. *Todar's Online Textbook of Bacteriology. Salmonella and Salmonellosis*. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.
- Wain J, Hien TT, Connerton P, *et al.* 1999. Molecular Typing of Multiple Antibiotic-Resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi from Vietnam: Application to Acute and Relapse Cases of Typhoid Fever. *J Clin Microbio.* 37:2466-72.