

EKSTRAKSI DNA *Salmonella* TIFOID

(Skripsi)

**Oleh:
Fajrin Nuraida**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016**

ABSTRAK

Ekstraksi DNA *Salmonella* Tifoid

Oleh

Fajrin Nuraida

Demam tifoid merupakan penyakit endemik dengan angka kejadian yang tinggi di dunia. Penyakit ini disebabkan oleh makanan atau minuman yang terkontaminasi bakteri *Salmonella* tifoid melalui saluran pencernaan secara *fecal oral*. Diagnosis demam tifoid standar saat ini adalah melalui uji serologi dan imunologi dengan nilai spesifisitas dan sensitivitas belum maksimal. Untuk itu perlu dikembangkan metode deteksi yang lebih cepat dan akurat, salah satunya adalah dengan menggunakan metode berbasis DNA. Ekstraksi DNA merupakan salah satu alternatif untuk menunjang diagnosis yang kurang maksimal sebagai langkah awal penentu keberhasilan identifikasi organisme berbasis DNA. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengekstrak DNA *Salmonella* tifoid dari darah pasien terindikasi demam tifoid. Melalui penelitian ini diketahui bahwa DNA *Salmonella* tifoid berhasil diekstrak. Diperoleh konsentrasi DNA sebanyak 11,25 sampai 31,25 ng/ μ l dengan kemurnian antara 0,9 sampai 1,8. Nilai kemurnian DNA tertinggi dan terbaik adalah 1,8 dengan waktu inkubasi selama 48 jam. Sebagai data pendukung, bakteri *Salmonella* tifoid diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis. Diketahui ukuran selnya antara 2,5 sampai 5 μ m, berbentuk basil, gram negatif, ukuran koloni 2 sampai 5 mm, dan uji motilitas positif. Diharapkan Ekstrak DNA *Salmonella* tifoid dari isolat darah pasien terindikasi demam tifoid selanjutnya dapat diukur dengan perlakuan waktu inkubasi selama 48 jam untuk mendapatkan hasil yang optimal.

Kata kunci: ekstrak DNA, *Salmonella* tifoid, demam tifoid

EKSTRAKSI DNA *Salmonella* TIFOID

Oleh
Fajrin Nuraida

Skripsi
Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS

Pada
Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKADAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Wawan Abdullah Setiawan, M.Si.

Sekretaris : Dra. C.N. Ekowati, M.Si.

**Penguji
Bukan Pembimbing : Dr. Sumardi, M.Si.**

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Prof. Warsito, S.Si., D.E.A., Ph.D.
NIP. 19710212/199512 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 14 September 2016

Judul Skripsi : **EKSTRAKSI DNA *Salmonella* TIFOID**

Nama Mahasiswa : **Fajrin Nuraida**

No. Pokok Mahasiswa : 1217021028

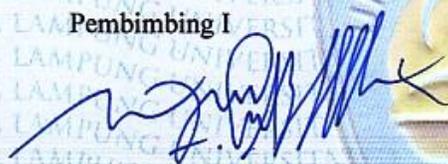
Jurusan : Biologi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

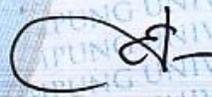
1. Komisi Pembimbing

Pembimbing I



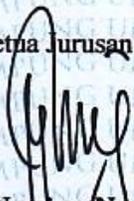
Wawan Abdullah Setiawan, M.Si.
NIP. 19791230 200812 1 001

Pembimbing II



Dra. C.N. Ekowati, M.Si.
NIP. 19580818 198503 2 001

2. Ketua Jurusan Biologi FMIPA



Dra. Nuning Nurcahyani, M.Sc.
NIP. 19660305 199103 2 001

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Serang, Banten pada 1 Januari 1994, merupakan putri kedua dari tiga bersaudara pasangan Bapak Mahfudi dan Ibu Jumaeti. Penulis menempuh pendidikan pertamanya di Taman Kanak-Kanak Aisyah Bustanul Athfal kota Serang pada tahun 2000. Pada tahun 2006, penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Dasar Negeri Batok Bali Serang. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Pertama Negeri 2 Kota Serang pada tahun 2009. Setelah itu, pada tahun 2012 penulis melanjutkan pendidikannya di Madrasah Aliyah Negeri 2 Kota Serang.

Pada tahun 2012, penulis terdaftar sebagai salah satu mahasiswa jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam di Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN). Selama menjadi mahasiswa penulis pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah Pengenalan Alat Labortaorium, Mikrobiologi Umum, dan Mikrobiologi Lingkungan. Selain itu, penulis juga pernah aktif di organisasi Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO),

Unit Kegiatan Mahasiswa Fakultas Pers Mahasiswa Natural, serta organisasi kedaerahan Keluarga Mahasiswa Banten.

Penulis melaksanakan Program Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada bulan Juli – Agustus 2015 di Desa Pesawaran Indah, Kabupaten Pesawaran. Pada bulan Juni – Juli 2015, penulis melaksanakan Program Kerja Praktik di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Balai Veteriner Lampung dengan judul **Uji Residu Hormon Trenbolon Asetat Pada Daging dan Hati Sapi dengan Metode Elisa Di Balai Veteriner Lampung**. Penulis melaksanakan penelitian pada bulan November 2015 – Februari 2016 di Laboratorium Mikrobiologi, Biologi Molekuler, dan Botani Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

PERSEMBAHAN

Bismillahirrihmanirrohim...

Sebuah karya sederhana berhasil dituliskan berkat karunia Allah SWT. Teriring doa dan syukur, penulis persembahkan karya sederhana ini sebagai bentuk rasa cinta dan sayang penulis kepada:

Ibu dan bapak tercinta yang senantiasa memberikan curahan kasih sayang, cinta, dan pengorbanan tanpa batas, senantiasa mendoakan disetiap langkahku menuju keberhasilan yang tak akan pernah terbalaskan walaupun dengan pengabdian seumur hidupku dan tak akan tergantikan oleh apapun selain Jannah-Nya.

Kakak tersayang Asri Yatunfadillah, M. Pd dan Adikku tersayang Muhammad Nurul Huda Fauzan, terimakasih atas segala motivasi dan kasih sayang yang menantikan keberhasilanku

Seorang pangeran yang menjadi imam masa depanku kelak yang akan membimbing dan menemani kehidupanku di dunia hingga ke Jannah-Nya.

MOTTO

*Wahai orang-orang beriman! Jika kamu menolong (agama)
Allah, niscaya Dia akan menolongmu dan meneguhkan
kedudukanmu
(47. Muhammad:7)*

*Semua orang binasa kecuali yang berilmu. Semua yang berilmu
binasa kecuali yang beramal. Semua yang beramal binasa
kecuali yang ikhlas (Imam Al-Ghazali)*

*Hidup itu Perjuangan. Kita tidak bisa memperoleh apa
yang kita inginkan dengan cara *pasrah* atau meminta belas
kasihan (Gol a Gong)*

*Tugas kita bukanlah untuk berhasil, melainkan untuk mencoba,
karena didalam mencoba itulah kita akan menemukan dan
membangun kesempatan untuk berhasil, semangat!!
(Budi Waluyo)*

Para pendidik dan almamater yang kubanggakan.

SANWACANA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT Sang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala berkat, rahmat, dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Ekstraksi DNA *Salmonella* Tifoid”** sebagai salah satu syarat kelulusan akademis menempuh pendidikan Sarjana Sains di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Shalawat serta salam selalu tercurahkan kepada baginda Rasulullah Muhammad SAW, teladan terbaik bagi seluruh umat.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini tidak terlepas dari peran berbagai pihak. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu dan Bapak yang tak pernah putus doa dan cinta kasihnya yang selalu mengiringi setiap langkah buah hatinya tanpa lelah. Semoga Allah SWT membalasnya dengan balasan Surga-Nya.
2. Bapak Wawan A. Setiawan, M.Si., selaku dosen Pembimbing utama dan Pembimbing Akademik yang telah sabar memberikan saran dan bimbingan selama proses penelitian serta penulisan skripsi
3. Ibu Dra. C.N. Ekowati, M.Si., selaku pembimbing kedua yang telah sabar membimbing, mengarahkan, dan mengoreksi kesalahan penulis

4. Bapak Dr. Sumardi, M. Si., selaku pembahas dan penguji atas saran, kritik, dan bantuannya dalam penyempurnaan skripsi ini
5. Bapak Prof. Warsito, S.Si., D.E.A., Ph.D., selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung
6. Ibu Dra. Nuning Nurcahyani, M.Sc., selaku Ketua jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung
7. Seluruh Bapak dan Ibu Dosen serta karyawan jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung
8. Seluruh staf laboratorium dan karyawan jurusan Biologi FMIPA Unila atas bantuan dan kerjasamanya terutama Pak Imron, Pak Tris, Pak Hambali, Mba Nunung, Bu Ambar, Kak Ali, dan Mas Yanto.
9. Saudari penulis Asriyatun Fadilah dan adik penulis Muhammad Nurul Huda Fauzan, serta sanak saudara yang selalu memberikan semangat dan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan tulisan ini.
10. Teman-teman seperjuangan Biologi angkatan 2012: Huda, Meri, Mustika, Marli, Kadek, Apri, Agung, Abdi, Jevika, Dewi, Arum, Sheila, Olin, Rahma, Dwi, Emilia, Imamah, Sayu, Amalia, Faizatin, Etika, Puty, Welmi, Minggar, Amanda, Naomi, Afrisa, Linda, Nisa, Wina, Della, Propalia, Pepti, Bebi, Putri Rahayu, Sabrina, Luna, Riza, Reni, Nindya, Lulu, Kasmita, Ria, Asri, Lia, Aska, Nikken, Indi, Nikke, Catur, Khorik, dan Henny atas doa dan kebersamaannya
11. Sahabat *Microholic* yang menemani penulis melaksanakan penelitian hingga selesai; Yelbi Yulian, Try Larasati, Ambar Prameswari, Kak Indah, Kak Ajeng, dan Kak Shofi terimakasih atas motivasi, canda, tawa, semangat, dan

kebersamaan yang telah diberikan.

12. Adik-adik *Microholic*: Rohman, Hafiz, Hendra, Rizani, Aini, Dea, Sarah, Linda, Vina, Yovita, Fatmawati, Carina, Bella Cikal, Bella Noor, Nailul, dan Balqis atas doa dan kebersamaannya, tetap semangat melanjutkan karya hebatnya di Mikrobiologi

13. Teman-teman selama menempa ilmu di luar bangku kuliah, penulis sangat bahagia bersama kalian Puja, Alfi, Kak Sigit, Kak Andi, Kak sepria, Kak Umi, Imas, Mila, Nico, Pupu, Nong Hesti, Nong Luthfi, Fatia, Fenti, Hana, Pazry, dan Dicky.

14. Almamater tercinta

Serta seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan didalam penyusunan skripsi dan masih jauh dari kesempurnaan. Penulis berharap semoga tulisan ini dapat berguna dan bermanfaat bagi kita semua. Amin.

Bandar Lampung, 27 September 2016

Penulis,

Fajrin Nuraida

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan	3
C. Manfaat Penelitian	3
D. Kerangka Pemikiran.....	3
E. Hipotesis.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Demam Tifoid	5
B. <i>Salmonella</i> Tifoid.....	6
C. Diagnosis Demam Tifoid	7
D. Ekstraksi DNA	10
E. Spektrofotometri	11
III. METODE PENELITIAN	
A. Waktu dan Tempat	14
B. Alat dan Bahan	14
1. Alat.....	14
2. Bahan.....	15
C. Metode Penelitian	15
D. Prosedur Kerja.....	16
1. Preparasi sampel uji	16
2. Preparasi media	16
3. Kultur bakteri <i>Salmonella</i> tifoid	16
4. Isolasi bakteri	16

5. Identifikasi makroskopis	17
6. Identifikasi mikroskopis.....	17
7. Persiapan kultur bakteri <i>Salmonella</i> tifoid.....	18
8. Ekstraksi DNA	18
9. Kuantifikasi ekstrak DNA menggunakan spektrofotometer	20
10. Kuantifikasi nilai absorbansi pertumbuhan bakteri.....	21

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Kultur Bakteri Terindikasi Demam Tifoid.....	22
B. Morfologi Koloni <i>Salmonella</i> Tifoid	22
C. Uji Motilitas <i>Salmonella</i> Tifoid	23
D. Morfologi Sel <i>Salmonella</i> Tifoid	24
E. Ekstrak DNA <i>Salmonella</i> Tifoid.....	25

V. SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan	28
B. Saran	28

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1 Kuantifikasi ekstrak DNA dan kepadatan sel bakteri	25
2 Hasil absorbansi ekstraksi DNA	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Spin column</i> CB3	19
2. Kultur bakteri <i>Salmonella</i> tifoid	22
3. Koloni <i>Salmonella</i> tifoid pada medium SSA.....	23
4. Uji motilitas positif <i>Salmonella</i> tifoid pada medium SSA.....	24
5. Sel bakteri <i>Salmonella</i> tifoid.....	24
6. <i>Rapid test</i> IgM antibodi <i>Salmonella</i>	34
7. Kit isolasi <i>Genomic</i> DNA TIANamp dari TIANGEN®	34

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Demam tifoid merupakan salah satu penyakit penyebab kematian yang tinggi, sebanyak 21 juta kasus demam tifoid mencapai angka kematian 216.000 jiwa tiap tahunnya (Zhou dan Pollard, 2010). Berdasarkan data Riskesdas (2007), tercatat provinsi Lampung merupakan daerah endemis demam tifoid meskipun tidak termasuk angka prevalensi demam tifoid tertinggi. Demam tifoid disebabkan oleh bakteri *Salmonella enterica* subspecies *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B*, dan *Salmonella paratyphi C*. Bakteri tersebut dapat menimbulkan gejala ringan seperti demam, malaise, dan batuk kering hingga gejala berat dengan demam yang terus meningkat setiap harinya dan beragam keluhan lainnya (Nelwan, 2012).

Menurut Rahmajati (2011) angka kematian demam tifoid yang masih tinggi dapat disebabkan oleh diagnosis uji penunjang yang kurang cepat dan akurat. Diagnosis penyakit demam tifoid yang banyak digunakan di masyarakat adalah uji serologi melalui *Widal test* dengan nilai sensitivitas dan spesifisitas yang masih rendah dikarenakan titer yang digunakan tidak mempunyai standar uji positif. Hal ini dapat menghalangi kerja antibodi pada pasien yang diberi obat terapi antibiotik. Antigen *Salmonella* tifoid yang digunakan

bukan dari daerah endemik setempat sehingga akan mempengaruhi spesifisitas (Wardhani dkk., 2005). Keddy dkk. (2011) menjelaskan diagnosis penunjang lain yaitu metode *Rapid test* IgM anti *Salmonella* dengan nilai sensitivitas dan spesifisitas yang lebih baik namun dimungkinkan untuk melakukan tes ulang setelah 48 jam serta tidak dapat membedakan anatar kasus akut dan kasus dalam masa penyembuhan.

Diagnosis dini demam tifoid sangat diperlukan untuk mendapatkan hasil cepat dan optimal sehingga dapat mencegah timbulnya gejala berat (Nelwan, 2012). Untuk meningkatkan nilai sensitivitas dan spesifisitas yang lebih optimal dari uji serologi dan imunologi, maka diperlukan diagnosis alternatif lain salah satunya adalah metode biomolekuler (Mulyani dkk, 2011).

Salah satu metode biomolekuler yaitu ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA merupakan tahapan yang dapat membantu identifikasi spesifik untuk mengetahui spesies hingga serotipe organisme berbasis DNA. Kasus demam tifoid dengan angka kejadian yang tinggi serta kurang maksimal metode diagnosis yang dilakukan saat ini, maka diperlukan penelitian berbasis biomolekuler yaitu ekstraksi DNA *Salmonella* tifoid sebagai langkah awal metode diagnosis berbasis DNA untuk membantu diagnosis yang lebih sensitif dan spesifik.

B. Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan ekstrak DNA *Salmonella* tifoid dari isolat bakteri *Salmonella* tifoid yang berasal dari darah pasien terindikasi demam tifoid.

C. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi mengenai ekstraksi DNA *Salmonella* tifoid dari isolat bakteri *Salmonella* tifoid yang berasal dari darah pasien terindikasi demam tifoid sebagai alternatif lain untuk menunjang diagnosis yang kurang maksimal.

D. Kerangka Pemikiran

Diagnosis penyakit demam tifoid yang banyak digunakan di masyarakat adalah metode konvensional yaitu serologi *Widal test* dan *Rapid test* dengan nilai akurasi spesifisitas dan sensitivitas belum maksimal. Metode molekuler sebagai diagnosis pasti dianggap lebih unggul dibandingkan metode konvensional karena lebih spesifik, sensitif, dan cepat. Untuk mendapatkan diagnosis pasti, maka sangat tergantung pada tingkat keberhasilan ekstraksi DNA. Bakteri *Salmonella* tifoid dapat diisolasi dari darah pasien, lalu dinokulasi ke dalam medium sintesis untuk memastikan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri *Salmonella* tifoid. Setelah isolat bakteri sel ditapat, selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA menggunakan kit komersial dengan

beberapa tahapan yaitu memecahkan membran sel, ekstraksi dalam larutan, pemurnian, dan pengendapan. Konsentrasi dan kemurnian DNA merupakan faktor penting dalam analisis biomolekuler berbasis DNA. Kedua faktor tersebut dapat diukur menggunakan spektrofotometri berdasarkan absorbansi dengan *optical density* (OD) pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. DNA dikatakan murni jika memiliki rasio OD_{260}/OD_{280} antara 1,8 sampai 2,0. Konsentrasi DNA (ng/ μ l) dihitung dengan nilai absorbansi panjang gelombang 260 nm dikali faktor pengenceran.

E. Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah diperoleh ekstrak DNA *Salmonella* tifoid dari isolat bakteri *Salmonella* tifoid yang berasal dari darah pasien terindikasi demam tifoid.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Demam Tifoid

Demam tifoid atau tifus adalah penyakit bakterimia yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* dan *Salmonella parathypi A*, *Salmonella parathypi B*, *Salmonella enteritidis*, dan *Salmonella typhimurium* (Abhijit dan Sunita, 2011).

Demam tifoid merupakan suatu infeksi sistemik yang dapat menghasilkan endotoksin yang mempengaruhi kadar leukosit pada pemeriksaan hematologi dan menimbulkan demam pada penderita. Penyakit ini ditularkan melalui konsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi oleh tinja atau urin orang yang terinfeksi (Rosinta dkk., 2014).

Demam tifoid merupakan salah satu penyakit gastrointestinal yang juga dapat tersebar oleh bantuan lalat yang hinggap pada makanan atau minuman yang terkontaminasi *Salmonella* tifoid. Penularan secara *fecal oral* atau bakteri yang masuk melalui mulut selanjutnya masuk ke dalam lambung untuk mencapai usus halus. Patogen ini masuk ke dalam kelenjar getah bening kemudian memasuki *ductus thoracicus*. Tahap selanjutnya bakteri patogen *Salmonella* tifoid masuk dalam saluran darah, sehingga timbul gejala klinis kemudian sampai ke hati,

limpa, sumsum tulang, ginjal, dan organ lainnya. Di dalam organ tubuh tersebut *Salmonella* tifoid berkembang biak (Inawati, 2009). Setelah 7 sampai 21 hari inkubasi bakteri dalam tubuh, penderita demam tifoid akan mengalami gejala klinis seperti demam tinggi, lesu, sakit kepala, mual, kehilangan nafsu makan, sembelit atau diare, serta bintik-bintik merah muda di dada.

Demam tifoid dapat dicegah dengan memperhatikan konsumsi makanan dan minuman agar tidak mudah terkontaminasi. Pencegahan juga dapat dilakukan dengan menyediakan air bersih untuk menjaga higienitas perorangan terutama kebersihan tangan dan lingkungan, serta melakukan vaksinasi (Nelwan, 2012).

B. *Salmonella* tifoid

Salmonella penyebab demam tifoid adalah bakteri gram negatif, ukuran sel berkisar antara 1 μm sampai 3,5 μm , berbentuk batang, tidak berkapsul, dan tidak berspora. Bakteri ini termasuk ke dalam bakteri anaerob fakultatif dan memiliki flagel berjenis peritrik sebagai alat gerak yang dapat dibuktikan melalui uji motilitas. Pada uji laktosa dan sukrosa negatif karena tidak dapat mereduksi serta uji MR positif (Brown, 2001).

Salmonella enterica penyebab demam tifoid pada manusia terdapat beberapa antigen penyusun sel bakteri yaitu antigen O (somatik) pembentuk antibodi IgM, antibodi yang dibentuk dari antigen H (flagel) yaitu pembentuk antibodi IgG, dan antigen Vi atau antigen permukaan agar *Salmonella* mampu hidup secara

intraseluler (Darmawati, 2009). Sandersoon (2015) menjelaskan, *Salmonella* tifoid dibagi menjadi empat subspecies berdasarkan sifat serologinya yaitu *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B*, *Salmonella paratyphi C*.

Menurut Sandersoon dkk. (2015) *Salmonella* spp. penyebab demam tifoid dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
Phylum : Proteobacteria
Class : Gamma Proteobacteria,
Ordo : Enterobacteriales
Family : Enterobacteriaceae
Genus : *Salmonella*
Spesies : *Salmonella enterica*
Subspecies : *Salmonella typhi*
Salmonella paratyphi A
Salmonella paratyphi B
Salmonella paratyphi C

C. Diagnosis Demam Tifoid

Diagnosis awal demam tifoid dan pemberian terapi yang tepat bermanfaat untuk mendapatkan hasil cepat, sensitif, dan spesifik secara optimal yang dapat

mencegah timbulnya gejala berat. Diagnosis pasti demam tifoid berdasarkan tiga prinsip pemeriksaan laboratorium yang dapat dilakukan antara lain isolasi bakteri, deteksi antigen mikroba, dan titrasi antibodi terhadap organisme penyebab penyakit (Nelwan, 2012).

Menurut Retnosari dan Tumbelaka (2000) uji laboratorium demam tifoid dilakukan dengan beberapa cara yaitu (1) isolasi bakteri melalui spesimen biakan baik dari darah, sumsum tulang, urin, tinja, dan cairan duodenum penderita (2) uji serologi untuk mendeteksi antibodi terhadap antigen *Salmonella* tifoid, dan (3) uji pelacakan DNA bakteri. Uji laboratorium melalui isolasi bakteri *Salmonella* tifoid akan menghasilkan diagnosis pasti dengan memerlukan waktu 5 sampai 7 hari pengujian. Spesimen yang diuji akan lebih baik pada minggu pertama sakit dan pasien belum mendapatkan terapi antibiotik.

Pemeriksaan serologi atau *Widal test* adalah untuk mendeteksi antigen bakteri *Salmonella enterica* penyebab demam tifoid berdasarkan reaksi antigen dan antibodi dari darah. Uji serologis *Widal test* merupakan uji standar dan melalui proses yang cepat, namun uji ini kurang sensitif dan spesifik serta tidak praktis dilakukan di daerah endemik (Zhou dan Pollard, 2010). Diagnosis penyakit demam tifoid yang diuji secara serologi melalui *Widal test* sampai saat ini masih dinilai meragukan (Abhijit dan Sunita, 2011). Sensitivitas *Widal test* adalah sebesar 16,7% dan spesifisitasnya sebesar 73,7% (Rahmajati, 2011).

Sensitivitas yang masih rendah disebabkan oleh titer yang digunakan tidak mempunyai standar uji positif, dan pada pasien yang diberi obat terapi antibiotik akan menghalangi kerja antibodi terhadap antigen *Salmonella* tifoid. Antigen *Salmonella* tifoid yang digunakan bukan dari daerah endemik setempat akan menurunkan spesifisitasnya (Wardhani dkk., 2005).

Selain *Widal test*, diagnosis demam tifoid dapat dilakukan secara imunologi berdasarkan Imunoglobulin utama (IgG) dan Imunoglobulin M (IgM). Diagnosis yang lebih dikenal dengan *Rapid test* ini memiliki nilai sensitivitas dan spesifisitas yang lebih tinggi dibandingkan *Widal test* dengan nilai sensitivitas sebesar 75,0%, dan spesifisitas 60,7%. Kelemahan diagnosis tersebut yaitu diperlukan tes ulang setelah 48 jam untuk memastikan hasil diagnosis. Selain itu, hasil *Rapid test* tidak dapat membedakan antara kasus akut dan kasus dalam masa penyembuhan (Keddy dkk., 2011).

Untuk meningkatkan nilai sensitivitas dan spesifisitas yang lebih optimal dari uji serologi dan imunologi, maka diperlukan diagnosis alternatif lain salah satunya adalah metode biomolekuler berbasis DNA (Mulyani dkk, 2011). Prayoga (2015) menjelaskan metode identifikasi cepat menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) saat ini merupakan alternatif lain yang dapat menunjang diagnosis awal. Sebelum metode ini digunakan dalam mendeteksi *Salmonella* tifoid harus didapatkan DNA sampel hasil ekstraksi yang prosesnya dilakukan dengan tepat sehingga sampel DNA yang digunakan mampu bekerja pada

substansi sampel yang sangat kompleks, bekerja secara cepat dan spesifik dengan akurasi yang tinggi hanya dalam beberapa jam.

D. Ekstraksi DNA

DNA (*Deoxyribonucleic acid*) merupakan asam nukleat berbentuk heliks ganda yang mengandung komponen gula deoksiribosa, serta memiliki empat basa nitrogen yang berpasangan, yaitu guanin dalam satu pasang untai dengan sitosin serta adenin dalam satu pasang untai timin (Alberts dkk., 2008). DNA adalah urutan nukleotida yang menyimpan materi genetik yang diwarisi oleh organisme dari induknya, sehingga dapat membedakan organisme tertentu terhadap organisme yang lain (Campbell dkk., 2008). DNA pada sel eukariotik dapat ditemukan baik pada kromosom inti (DNA kromosomal) maupun pada organel, yaitu pada mitokondria dan kloroplas (DNA ekstrakomosomal) (Fatchiyah dkk., 2011). Bakteri *Salmonella* merupakan mikroorganisme kelompok utama bakteri Protobacteria gamma yang mengandung DNA kromosom dan plasmid di dalam nukleoid pada sel prokariotik (Campbell dkk., 2008).

Ekstraksi DNA merupakan langkah awal yang harus dikerjakan dalam uji pelacakan DNA bakteri. Bakteri *Salmonella* tifoid dapat diisolasi dari darah pasien, lalu dinokulasi ke dalam medium sintetis untuk memastikan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri *Salmonella* tifoid. Isolat bakteri *Salmonella* tifoid yang didapat selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA dengan beberapa tahapan,

yaitu (1) Pemecahan membran sel (2) Ekstraksi dalam larutan (3) Pemurnian dan (4) Pengendapan DNA. Pada saat melakukan proses ekstraksi, DNA harus dijaga agar tetap bersuhu rendah supaya tidak rusak dan didapatkan DNA dalam bentuk rantai yang panjang (Faatih, 2009).

Fatchiyah dkk. (2011) menjelaskan bahwa tahap pertama ekstraksi DNA yaitu pemecahan dinding sel secara fisik dan kimiawi, kemudian ditambahkan proteinase K yang berfungsi untuk pemisahan DNA dari kontaminan protein. Untuk pemisahan DNA dari molekul lainnya dapat digunakan garam berkonsentrasi tinggi. Tahapan selanjutnya yaitu proses pemurnian akhir DNA dengan menambahkan etanol dingin, dan terakhir melarutkan pelet DNA dengan menambahkan akuabides steril. Konsentrasi dan kemurnian DNA merupakan faktor penting dalam analisis molekuler berbasis DNA menggunakan metode spektrofotometri. Untuk mengukur nilai absorbansi molekul DNA dapat menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 260 nm.

E. Spektrofotometri

Spektrofotometri Ultra Violet dan Tampak (UV-Visible) adalah metode analisis untuk menentukan komposisi suatu senyawa organik secara kuantitatif maupun kualitatif berdasarkan interaksi antara materi dan cahaya dengan alat spektrofotometer. Spektrofotometer digunakan untuk mengukur absorbansi atau penyerapan dari suatu partikel dengan panjang gelombang tertentu. Secara luas

teknik penggunaan spektrofotometer UV untuk analisis organik yang mengandung gugus kromofor dan enon, serta mempunyai kisaran sinar dengan panjang gelombang 200 – 900 nm, sedangkan sinar tampak mempunyai kisaran sinar dengan panjang gelombang 200 – 400 nm untuk analisis senyawa berwarna. (Sitorus dan Ibrahim, 2013).

Spektrofotometer merupakan alat yang biasa digunakan untuk mendeteksi gugus fungsional, mengidentifikasi senyawa, dan menganalisis campuran dengan mengukur sederetan sampel yang diabsorbansi oleh panjang gelombang tertentu (Day dan Underwood, 2002). Pada umumnya spektrofotometri mempunyai komponen-komponen untuk pengoprasian alat spektrofotometer antarlain:

1. Sumber cahaya

Sumber energi untuk daerah tampak maupun ultraviolet dan inframerah adalah sebuah lampu pijar dengan kawat rambut yang terbuat dari *wolfram*. Keluaran dari lampu *wolfram* berkisar 325 atau 350 nm hingga sekitar 3 μ m. Energi yang dipancarkan oleh kawat yang dipanaskan cukup bervariasi tergantung panjang gelombang yang digunakan (Day dan Underwood, 2002).

2. Monokromator

Monokromator merupakan piranti optis untuk mengisolasi suatu berkas radiasi dari suatu sumber yang mempunyai kemurnian spektral yang tinggi dengan panjang gelombang yang diinginkan. Komponen yang penting dari sebuah monokromator adalah suatu sistem celah dan suatu unsur dispersif (Day dan Underwood, 2002).

3. Wadah sampel atau sel

Sel atau kuvet merupakan bagian dari lintasan optis dalam spektrofotometer yang digunakan untuk menaruh cairan sampel yang akan diukur serapannya. Sel lebih baik bila permukaan optisnya datar, sel juga harus diisi sedemikian rupa agar berkas cahaya menembus larutan dengan ketebalan berkisar 0.1 – 1 mm untuk mempermudah absorpsi oleh pelarut (Day dan Underwood, 2002).

4. Detektor

Detektor berperan sebagai pemberi respon terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang, sehingga dapat mengubah cahaya menjadi sinyal listrik oleh *amplifier* yang akan ditampilkan dalam bentuk numerik pada komputer (Khopkar, 2002).

5. Penguatan dan pembacaan

Penguatan untuk membaca sinyal listrik dari detektor akan menentukan konsentrasi dan kemurnian dengan mengukur transmitans larutan sampel dalam besaran absorbansi (Khopkar, 2002).

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2015 hingga Februari 2016 di Laboratorium Mikrobiologi, Biologi Molekuler, dan Botani jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *Coolbox*, *micropipet*, *tip*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, vorteks, *mikrotube* 1,5 ml, rak *mikrotube*, cawan petri, neraca, erlenmeyer, gelas ukur, *laminar air flow cabinet*, *hot plate magnetic stirrer*, pembakar bunsen, botol semprot, sarung tangan, masker, aluminium foil, inkubator, otoklaf, mikroskop, penangas air, jarum ose bulat, jarum ose lurus, gelas benda, spektrofotometer, sentrifugasi mikro, dan sentrifus suhu rendah.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sampel darah pasien terduga demam tifoid, akuades, akuabides steril, NaCl 0,85%, alkohol 70%, kain kasa, minyak imersi, larutan Gram A, Gram B, Gram C, dan Gram D, media *Tryptone Soy Broth* (TSB) dan *Salmonella Shigella Agar* (SSA), kit isolasi *Genomic DNA* TIANamp dari TIANGEN[®] yang terdiri dari *buffer* GA, proteinase K, *buffer* GB, *buffer* GD, *buffer* PW, dan *buffer* TE, dan *spin columns* CB3.

C. Metode Penelitian

Metode penelitian dilakukan secara deskriptif. Bakteri *Salmonella* tifoid didapat dengan cara mengisolasi bakteri *Salmonella* tifoid dari sampel darah menggunakan metode kit isolasi. DNA diekstrak dari kultur bakteri *Salmonella* tifoid yang diinkubasi selama 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Kemurnian dan konsentrasi DNA ditentukan menggunakan spektrofotometer berdasarkan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Tingkat kemurnian DNA ditentukan berdasarkan rasio OD_{260}/OD_{280} . Konsentrasi DNA (ng/ μ l) dapat dihitung dengan nilai absorbansi panjang gelombang 260 nm dikali faktor pengenceran (Fatchiyah dkk., 2011).

D. Prosedur Kerja

Prosedur kerja yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Preparasi sampel uji

Sampel darah yang dimasukkan ke dalam tabung yang sudah ditambahkan antikoagulan EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*), diambil dari laboratorium Kosasih Rajabasa Bandar Lampung sebagai klinik penyedia sampel darah terduga demam tifoid yang diuji menggunakan *rapid test*.

2. Preparasi media

Media yang digunakan pada penelitian ini adalah *Tryptone Soy Broth* (TSB) dan *Salmonella Shigella Agar* (SSA). Cara pembuatan media tersebut dijelaskan pada Lampiran 1.

3. Kultur bakteri *Salmonella* tifoid

Bakteri dikultur menggunakan medium *Tryptone Soy Broth* (TSB). Sampel darah pasien terduga demam tifoid dimasukkan 1 ml ke dalam medium TSB 9 ml untuk proses pengkayaan bakteri. Kultur bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian kultur digunakan untuk proses ekstraksi DNA dan identifikasi makroskopis maupun mikroskopis.

4. Isolasi bakteri

Kultur bakteri pada medium pengkayaan kemudian diencerkan berseri mulai dari pengenceran 10 kali hingga 60 kali. Hasil pengenceran lalu

diinokulasikan ke dalam medium Salmonella Shigela Agar (SSA) pada cawan petri dish dengan metode *pour plate* untuk selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diisolasi, dilakukan identifikasi mikrobiologi secara makroskopis dan mikroskopis.

5. Identifikasi makroskopis

Identifikasi makroskopis yang dilakukan meliputi identifikasi morfologi koloni dan uji pergerakan atau motilitas. Identifikasi morfologi koloni dilakukan setelah isolat bakteri diinkubasi 24 jam menggunakan metode *pour plate* pada medium SSA untuk memudahkan memperoleh koloni bakteri yang terpisah-pisah, sehingga bakteri aerob maupun anaerob dapat tumbuh. Parameter yang diamati meliputi bentuk, warna, dan ukuran koloni (Ekowati dkk., 2011).

Uji motilitas dilakukan dengan cara metode tusuk (*deep*). Bakteri ditusukkan ke dalam medium SSA di tabung reaksi lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Apabila hasil positif, maka akan timbul pelebaran koloni bakteri di daerah bekas tusukan pada medium uji yang berarti adanya pergerakan bakteri.

6. Identifikasi mikroskopis

Identifikasi mikroskopis dilakukan melalui pengecatan Gram untuk mengetahui sifat Gram bakteri. Bentuk dan ukuran sel diamati menggunakan mikroskop yang dilengkapi dengan mikrometer.

7. Persiapan kultur bakteri *Salmonella* tifoid

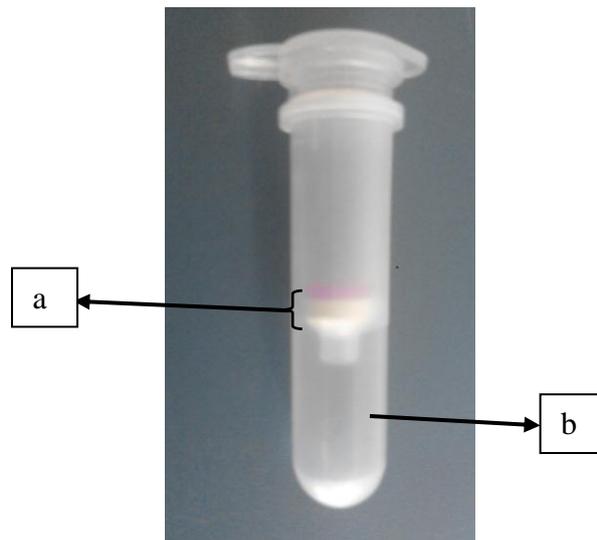
Kultur bakteri diambil sebanyak 0,5 ml dimasukkan ke dalam TSB 4,5 ml kemudian diinkubasi selama 24 jam, 48 jam, dan 72 jam pada suhu 37°C. Kultur bakteri dengan 3 perlakuan waktu inkubasi ini selanjutnya digunakan untuk proses ekstraksi DNA.

8. Ekstraksi DNA

Metode ekstraksi DNA genom bakteri yang digunakan adalah metode kit dari TIANamp TIANGEN[®]. Ekstraksi DNA kultur bakteri *Salmonella* tifoid dari tiga perlakuan waktu inkubasi selama 24 jam, 48 jam, dan 72 jam di atas dilakukan sebagai berikut:

- a. Masing-masing kultur bakteri *Salmonella* tifoid diambil sebanyak 1 ml untuk disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Supernatan dibuang dan ditambahkan akuabides steril sebanyak 500 µl, sehingga diperoleh suspensi sel *Salmonella* murni.
- b. Suspensi sel diambil sebanyak 200 µl dan dipindahkan ke dalam mikrotub 1,5 ml yang baru kemudian ditambahkan 200 µl *buffer* GA dan dihomogenkan.
- c. Proteinase K ditambahkan sebanyak 20 µl ke dalam suspensi dan dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 – 3 menit.
- d. *Buffer* GB ditambahkan 200 µl ke dalam suspensi, dihomogenkan kemudian disentrifugasi sebentar untuk membersihkan gelembung dari dalam tutup lalu diinkubasi selama 10 menit pada suhu 70°C.

- e. Etanol 96-100% ditambahkan sebanyak 250 μ l ke dalam suspensi dan perlahan-lahan tabung dibolak-balik 2-3 kali agar larutan homogen.
- f. Suspensi tersebut dipindahkan ke dalam *spin column* CB3 dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm pada 32°C selama 30 detik kemudian cairan dibuang ke dalam tabung pembuangan cairan *spin column*.



Gambar 1. *Spin column* CB3. (a) membran silika (b) tabung penampung cairan

- g. Sebanyak 500 μ l *buffer* GD ditambahkan ke dalam *spin column* CB3 lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 2-3 menit. Disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada 32°C selama 30 detik, kemudian cairan dibuang.
- h. Sebanyak 600 μ l *buffer* PW ditambahkan ke dalam *spin column* CB3 lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 2-3 menit. Disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada 32°C selama 30 detik kemudian cairan dibuang.

- i. Langkah h diulang kembali. *Spin column* disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada 32°C selama 2 menit untuk mengeringkan membran dari protoplasma. Kemudian *spin column* CB3 dimasukkan kedalam mikrotub 1,5 ml yang baru.
- j. *Buffer* TE atau akuabides steril ditambahkan sebanyak 200 µl tepat ke tengah membran dan diinkubasi selama 2-5 menit pada suhu 20°C kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit pada suhu 20°C.
- k. Ekstrak DNA disimpan ke dalam *freezer* untuk uji kuantifikasi menggunakan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

9. Kuantifikasi ekstrak DNA menggunakan spektrofotometer

Sebanyak 200 µl ekstrak DNA dilarutkan dengan 4800 µl ddH₂O steril kemudian dianalisis secara kuantitatif dengan spektrofotometer. Nilai absorbansi diukur dua kali pada OD₂₆₀ dan OD₂₈₀ kemudian dihitung konsentrasi DNA pada pengenceran 25 kali.

Konsentrasi DNA dapat ditentukan dengan rumus sebagai berikut

(Fatchiyah dkk., 2011)

Konsentrasi DNA (ng/µl) = OD₂₆₀ x 50 x faktor pengenceran.

Keterangan : OD₂₆₀ = Nilai absorbansi pada 260 nm.

50 = Larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 50 ng untai ganda DNA per µl.

Selain konsentrasi, dihitung pula rasio nilai absorbansinya pada OD₂₆₀ dan OD₂₈₀. Untuk mengukur kemurnian DNA terhadap kontaminan, nilai maksimal DNA dapat diserap dengan panjang gelombang 260 nm sedangkan nilai maksimal residu protein atau fenol dapat diserap dengan panjang gelombang 280 nm. DNA dikatakan murni jika memiliki rasio OD₂₆₀/OD₂₈₀ antara 1,8 sampai 2,0 (Sambrook dan Russel, 2001).

10. Kuantifikasi nilai absorbansi pertumbuhan bakteri

Selain ekstraksi DNA bakteri, isolat dari darah pasien terindikasi demam tifoid diuji kepadatan jumlah sel bakteri dari kultur bakteri *Salmonella* tifoid pada tiga perlakuan waktu inkubasi selama 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Masing-masing isolat diambil sebanyak 200 µl dari 500µl isolat bakteri yang sama untuk proses ekstraksi, kemudian dipindahkan ke dalam mikrotub 1,5 ml dan dilarutkan dengan 4800 µl ddH₂O steril. Campuran tersebut dianalisis secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Absorbansi dengan *Optical density* 600 nm merupakan penyerapan maksimal pada perkembangan jumlah sel bakteri. Kepadatan jumlah sel bakteri dihitung menggunakan metode turbidimetri. Pengukuran ini digunakan untuk mengetahui kepadatan sel bakteri yang dapat mempengaruhi kemurnian dan konsentrasi ekstrak DNA yang didapatkan.

V. SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan disimpulkan bahwa DNA *Salmonella* tifoid dari darah pasien terindikasi demam tifoid telah berhasil diekstrak. Nilai kemurnian DNA tertinggi dan terbaik adalah sebesar 1,8 dengan waktu inkubasi selama 48 jam. Konsentrasi DNA tertinggi adalah sebesar 31,25 ng/ μ l dan terendah sebesar 11,25 ng/ μ l.

B. Saran

Ekstraksi DNA *Salmonella* tifoid dari isolasi darah pasien terindikasi demam tifoid selanjutnya dapat dilakukan dengan perlakuan waktu inkubasi selama 48 jam untuk mendapatkan hasil yang optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas H.F dan Ibtisam H.N.A.M. 2016. Evaluation three methods of the extraction and purification of bacterial DNA of Gram positive and Gram negative bacteria. *Wordl Jurnal of Experimental Biosciences*. 4(1): 62 – 65.
- Abhijit, A. dan Sunita. 2011. The study of Salmonellosis with reference to *Salmonella typhi* in enteric fever patients. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 5(3): 467 – 469.
- Alberts, B., Alexander J., Julian L., Martin R., Keith R., Peter W. 2008. *Molecular Biology of the Cell*.Ed.-5. Garland Science. New York
- Amarantini, C., Widya, A., Haripurnomo, K., dan Langkah, S. 2009. Seleksi Bakteri *Salmonella typhi* dari Kultur Darah Penderita Demam Tifoid. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan, dan Penerapan MIPA*. Universitas Negeri Yogyakarta: B-13 – B-20
- Andre dan Prima R. 2016. Isolasi dan Deteksi Genstn bakteri *Salmonella* spp. pada Usus Ayam dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) serta Uji Sensitivitasnya Terhadap Beberapa Antibiotik. *Thesis*. Universitas Andalas. Padang.
- Arifin, I.M. 2015. Deteksi *Salmonella* sp. pada daging di pasar tradisional dan pasar modern di kota Makassar. *Skripsi*. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Brown, A.E001. *Benson:Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiological*. Ed-8. The McGraw-Hill Compenies. Boston. Massachusetts
- Campbell, A., Jane B. R., Michael L. C., Steven A. W., Peter V. M., dan Robert B. J. 2008. *Biologi Edisi Kedelapan*. Erlangga. Jakarta.
- Cita Y. P. 2011. Bakteri *Salmonella typhi* dan demam tifoid. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. Vol 6 (1): 42 – 46.

- Darmawati S. 2009. Keanekaragaman genetik *Salmonella typhi*. *Jurnal Kesehatan*. Vol. 2 (1): 27 – 33.
- Day, R.A., JR. dan A.L. Underwood. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Ed ke-6. Terjemahan: Sopyan L. Erlangga. Jakarta.
- Ekowati, C.N., Sumardi, dan Handayani, K. 2011. *Panduan Praktikum Mikrobiologi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Lampung
- Faatih, M. 2009. Isolasi dan digesti DNA kromosom. *Jurnal penelitian Sains dan Teknologi*. 10 (1):61 – 67.
- Fatchiyah, Estri, L. A, Sri, W., dan Sri, R. 2011. *Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga. Jakarta
- Inawati. 2009. *Demam Tifoid*. Buku Departemen Patologi Anatomi Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. ISSN 1978-2071. Surabaya
- Keddy K.H., Arvinda S., Maupi E.L., Greta H., Clarie L.C., Anne B.M., Jhon A.C. 2011. Sensitivity and specificity of typhoid fever rapid antibody test for laboratory diagnosis at two sub-Saharan African sites. *Journal Bull World Health Organ*. 89: 640 – 647.
- Khopkar, S.M. 2002. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Universitas Indonesia Press. Jakarta
- Kinesha, M. 2016. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Tersedia pada: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?scale=1.0&query=&map=sent01110&scale=0.35&auto_image=&show_description=hide&multi_query=&show_module_list= (Diunduh pada tanggal 15 Juli 2016)
- Lee. Y.K, H.W. Kim, C.L. Liu, H.K. Lee. 2003. A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular material. *Elsevier science Journal of Microbiological Methods*. 52: 245 – 250.
- Nelwan. 2012. Tata laksana terkini demam tifoid. Departemen penyakit dalam FK-UI. RSCM-Jakarta. *Continuing medical education*. CDK-192. 39 (4):247 – 250.
- Prayoga, W. dan Wardani, A.K. 2015. *Polymerase Chain Reaction* untuk Deteksi *Salmonella* sp.: Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 3 (2):483 – 488.
- Rahmajati, A. 2011. Perbandingan Tingkat Akurasi antara Tes Widal dengan Tes Tubex pada Anak dengan Demam Tifoid di Semarang. *Skripsi*. Fakultas kedokteran Universitas Diponegoro.

- Retnosari, S., Alan, R. T. 2000. Pendekatan diagnostik serologik dan pelacak Antigen *Salmonella typhi*. *Jurnal Sari Pediatri* 2 (2): 90 – 95
- Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas). 2007. *Laporan Nasional Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Rosinta, L., Suryani, Y. D., dan Nurhayati E. 2014. Hubungan durasi demam dengan kadar leukosit pada penderita demam tifoid anak usia 5-10 tahun yang dirawat inap di Rumah Sakit Al-Ihsan periode Januari-Desember tahun 2014. *Proseding Pendidikan Dokter*. ISSN: 2460657X: 44 – 48.
- Sambrook J, dan Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Ed ke-3. Cold Spring Harbor: Cold Spring Laboratory Pres. ISBN: 0-87969-576-3
- Sanderson, K. E., Shu-Lin L., Le Tang, Randal N. J. 2015. *Salmonella typhi* and *Salmonella paratyphi A*. *Molecular Medical Microbiology*. Chapter 71
- Schmid. 2003. DNA isolation. Tersedia pada:
<http://www.classroom.sdmesa.edu/eschmid/Lab11Biol210.htm>. (Diunduh pada tanggal: 26 Juni 2016)
- Sitorus M. dan Sanusi I. 2013. *Teknik Laboratorium Kimia Organik*. Graha Ilmu. ISBN: 978-979-756-925-9. Yogyakarta.
- Wardhani P., Prihatini, M.Y. Probahoeso. 2005. Kemampuan uji tabung widal menggunakan antigen import antigen lokal. *Indonesian Journal of clinical Pathology and medical Laboratory*. 12 (1): 31 – 37.
- Zhou L., Andrew J.P. 2010. A fast and highly sensitive blood culture PCR method for clinical detection of *Salmonella enterica* serovar *typhi*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 9 (14): 1 – 7