

RINGKASAN

Demam tifoid sebagai penyakit sistemik yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* sampai sekarang masih merupakan problem kesehatan, utamanya di negara-negara yang sedang berkembang, karena tingginya urbanisasi, kontaminasi suplai air, adanya strain-strain yang resisten terhadap antibiotika, lambatnya diagnosa, dan belum adanya vaksin yang benar-benar efektif (Pang *et al.*, 1992). Vaksin untuk demam tifoid yang beredar di pasaran saat ini ada dua macam, pertama ialah Ty21a suatu *oral attenuated vaccine* dan yang kedua adalah *parenteral purified Vi polysaccharide*.

Tampaknya vaksin untuk demam tifoid memang perlu dikembangkan lebih lanjut mengingat efikasi yang diberikan kedua vaksin ini masih sekitar 65 – 70%. Namun untuk pengembangan vaksin ini perlu penelitian yang mendalam tentang imunogenisitas faktor-faktor virulensi bakteri, genetik dan patogenesis timbulnya penyakit infeksi khususnya demam tifoid. Sehubungan dengan hal tersebut peneliti mencoba melakukan penelitian tentang protein adhesin *Salmonella typhi* sebagai faktor virulensi untuk terjadinya adhesi dan kolonisasi, dan kemungkinannya untuk digunakan sebagai kandidat vaksin oral yang protektif.

Seperti telah diketahui bahwa *Salmonella typhi* memiliki protein adhesin *type-1 fimbriae* seperti pada *Salmonella typhimurium*, namun peranannya pada virulensi tidak jelas (Lockman and Curtiss, 1992). Maka tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan adanya protein adhesin baru selain *type-1 fimbriae* pada *Salmonella typhi* serta mengungkap pengaruh protein adhesin tersebut, sebagai faktor virulensi yang berpotensi imunogenik untuk membentuk S-IgA protektif guna menghambat proses adhesi dan kolonisasi sehingga tahap awal infeksi dapat dicegah.

Penelitian yang dilakukan adalah studi eksperimental laboratorium dengan 4 tahap penelitian : tahap I adalah Uji Hemaglutinasi dan SDS-PAGE, tahap II Uji Adhesi Protein Hemaglutinin, tahap III Uji Imunogenisitas Protein Adhesin dan tahap IV adalah Uji Protektivitas Protein Adhesin *In vivo*. Sebagai sampel penelitian adalah bakteri *Salmonella typhi* yang diisolasi dari darah satu penderita demam tifoid yang dirawat di RSUD Saiful Anwar Malang dengan nomor register D5654, yang identifikasinya menggunakan *microbact system*.

Sebelumnya tidak diketahui secara pasti bahwa *Salmonella typhi* memiliki protein adhesin selain *type-1 fimbriae*. Untuk membuktikan hal itu dilakukan Uji Hemaglutinasi dan SDS-PAGE dari fraksi fimbriae dan fraksi OMP. Uji Hemaglutinasi bertujuan untuk mendapatkan protein hemaglutinin; karena pada umumnya protein hemaglutinin juga merupakan protein adhesin. Seperti diketahui bahwa pada beberapa patogen intestinal termasuk *Vibrio cholerae*, terdapat korelasi positif antara sifat kemampuan hemaglutinasi dengan kemampuan adhesi pada mukosa intestinal (Alam *et al.*, 1996).

Dari Uji Hemaglutinasi fraksi Fimbriae dan fraksi OMP *Salmonella typhi* dengan eritrosit marmut diperoleh titer 1/64 untuk fraksi Fimbriae dan titer 1/128 untuk fraksi OMP. Indikator yang menunjukkan adanya protein hemaglutinin adalah berpindahannya pita protein pada hemaglutinat OMP dan hemaglutinat Fimbriae, yang keduanya pada posisi berat molekul sekitar 36 kDa pada SDS-PAGE. Selanjutnya diperoleh protein hemaglutinin Fimbriae yang kemudian disebut protein HA-F36 dan protein hemaglutinin OMP yang kemudian disebut protein HA-O36. Apabila dilihat dari karakterisasinya

terhadap berbagai jenis eritrosit, ternyata baik protein HA-F36 maupun protein HA-O36 memberikan hasil hemaglutinasi positif dengan eritrosit manusia golongan darah O, eritrosit marmut dan eritrosit mencit. Diduga manusia golongan darah O lebih rentan terhadap infeksi *Salmonella typhi* bila dikaitkan dengan kemampuan hemaglutinasi dan adhesi protein HA-F36 dan protein HA-O36, namun masih perlu penelitian lebih lanjut. Meskipun kedua protein HA-F36 dan HA-O36 memiliki berat molekul kurang lebih sama dan masing-masing juga sensitif terhadap D-mannose, namun pada perlakuan suhu kamar keduanya berbeda, protein HA-O36 pada posisi BM sekitar 74 kDa, sedangkan protein HA-F36 tetap di sekitar 36 kDa. Dengan demikian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang rangkaian asam amino yang menyusun kedua protein tersebut. Karena protein HA-F36 dapat mengaglutinasi eritrosit marmut dan sensitif terhadap D-mannose maka dapat digolongkan dalam *type-1 fimbriae*.

Setelah ditemukan adanya protein HA-F36 dan HA-O36, selanjutnya dilakukan Uji Adhesi untuk membuktikan bahwa kedua protein hemaglutinin tersebut adalah protein adhesin. Seperti diketahui bahwa tahap awal suatu infeksi dimulai dari interaksi protein spesifik pada permukaan mikroba (adhesins) dengan reseptor yang pada umumnya merupakan rantai karbohidrat dari glikokonjugat pada sel hospes (Rostand and Esko, 1997). Pada penelitian ini terdapat 6 perlakuan dosis (0 µg, 25 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg, dan 400 µg) dari protein HA-F36 dan HA-O36 pada enterosit mencit Balb/c dan diuji menggunakan *Completely Randomized Design*.

Dari Anova baik pada protein HA-F36 maupun pada protein HA-O36 menunjukkan bahwa perlakuan dosis berpengaruh sangat bermakna terhadap indeks adhesi ($p=0.001$), dimana dengan makin meningkatnya dosis makin rendah indeks adhesinya. Selain itu terdapat pengaruh yang bermakna dan hubungan yang erat dari perlakuan dosis protein HA-F36 dan protein HA-O36 terhadap nilai indeks adhesi yang masing-masing secara berurutan ditunjukkan dengan koefisien korelasi Pearson sebesar - 0.733 dengan $p= 0.001$ dan - 0.830 dengan $p = 0.001$. Dengan demikian maka terbukti bahwa protein HA-F36 dan HA-O36 masing-masing berperan sebagai protein adhesin dan selanjutnya disebut sebagai protein adhesin F36 (AdhF36) dan protein adhesin O36 (AdhO36).

Apabila dilakukan Anova gabungan pengaruh dosis protein HA-F36 dan protein HA-O36 terhadap nilai indeks adhesi ternyata terdapat perbedaan sangat bermakna antara protein HA-F36 dengan protein HA-O36 ($p = 0.001$). Karena rerata indeks adhesi protein HA-F36 lebih rendah dari rerata indeks adhesi protein HA-O36 maka dapat dikatakan bahwa protein adhesin F36 (AdhF36) lebih mampu menghambat adhesi dari pada protein adhesin O36 (AdhO36). Dari hasil rekaman foto tampak bahwa pola adhesi *Salmonella typhi* mengikuti pola adhesi *E.coli* ada yang seperti tipe *diffuse* ada juga yang seperti tipe *localized*, tetapi tipe *aggregative* tidak dijumpai. Selain itu pada Uji Adhesi *Salmonella typhi* ini juga dijumpai bentukan tonjolan sel enterosit yang menyerupai *membrane ruffling* seperti yang terjadi pada *Salmonella typhimurium*.

Selanjutnya, untuk mengetahui potensi imunogenik dari kedua protein tersebut, dilakukan Uji Imunogenisitas bertujuan untuk membuktikan bahwa protein AdhF36 dan protein AdhO36 mampu membangkitkan respon imun humoral apabila diberikan secara par enteral. Dosis protein yang diberikan 100 µg (Harlow and Lane, 1988) dengan ajuvan Freund komplit dan inkomplit yang disuntikkan secara intraperitoneal kepada mencit Balb/c. Hasil yang diamati adalah antibodi akibat respons imun humoral sistemik

sekunder, melalui Uji Hambat Hemaglutinasi dan pemeriksaan IgA dan IgG serum dengan metode ELISA. Dari Uji Hambat Hemaglutinasi protein AdhF36 dan protein AdhO36 menunjukkan bahwa antibodi poliklonal yang terbentuk mampu menghambat hemaglutinasi dengan titer 1/8 dan 1/16 secara berurutan, sekaligus membuktikan bahwa kedua protein tersebut berpotensi imunogenik untuk membentuk respon imun humoral sehingga layak disebut sebagai imunogen. Dari hasil *paired t-test* antara IgA dan IgG dengan metode ELISA menunjukkan bahwa pada perlakuan AdhF36 kadar IgA lebih tinggi dari pada kadar IgG ($p = 0.009$) sedangkan pada perlakuan AdhO36 kadar IgA dan kadar IgG tidak berbeda bermakna ($p = 0.351$). Protein AdhF36 tampaknya lebih mampu menginduksi IgA dari pada IgG dalam serum mencit, sedangkan produksi IgA dan IgG kurang lebih sama pada perlakuan protein AdhO36. Hal ini tidak dapat dijelaskan dengan teori yang ada, dimana pada umumnya respons imun sekunder didominasi oleh IgG (Feldmann, 1998); dan secara teoritik apabila telah terjadi *isotype switching* ke IgG, maka IL-4 yang memicunya akan menekan terjadinya isotipe yang lain (Lydyard and Grossi, 1998). Pada manusia konsentrasi IgG dalam serum lebih kurang 1000 mg/dL, sedangkan IgA serum 200 mg/dL. IgG merupakan 75% dari total serum immunoglobulin pada dewasa normal dan merupakan antibodi yang paling banyak diproduksi selama respon imun humoral sekunder (Turner, 1998). Pada Anova untuk mengetahui pengaruh perlakuan protein AdhF36 dan AdhO36 masing-masing terhadap kadar IgA dan IgG, tampak bahwa kedua protein tersebut berpengaruh sangat bermakna ($p = 0.001$). Dengan demikian menunjukkan bahwa baik protein AdhF36 maupun protein AdhO36 merupakan imunogen yang poten untuk membangkitkan respon imun humoral. Diduga tingginya kadar IgA dalam serum merupakan indikator bahwa imunogen yang merangsang adalah imunogen mukosal. Sehubungan dengan hal ini diajukan 2 konsep teori, yang pertama akibat rangsangan 1 epitop, yang kedua akibat rangsangan 2 epitop dan pada keduanya terjadi keseimbangan antara IL-4 dengan TGF- β dan IL-5 serta tingginya kadar IgA juga karena terjadinya dua kali *isotype switching* dari IgM ke IgG kemudian dari IgG ke IgA.

Setelah potensi imunogenik protein AdhF36 dan AdhO36 diketahui, selanjutnya diuji kemampuannya sebagai imunogen mukosal untuk menginduksi terbentuknya S-IgA guna mencegah proses adhesi *Salmonella typhi* pada usus halus mencit Balb/c. Untuk itu dilakukan imunisasi peroral pada mencit Balb/c dengan protein AdhF36, protein AdhO36, CTB dan Kontrol. Dosis yang digunakan untuk masing-masing protein adalah 250 μg setiap kali pemberian (4 x selang satu minggu) dan dikonjugasikan dengan CTB sebagai ajuvan sekaligus sebagai *protein carrier* dan mencegah *oral tolerance* (Strober and Fuss, 1997). Sebagian dari mencit setelah diimunisasi, diinokulasi dengan *Salmonella typhi*. Yang diamati berupa hasil uji hambat adhesi in vivo dengan menghitung jumlah koloni *Salmonella typhi* dari biakan usus mencit pada medium BSA (*bismuth sulfite agar*) dan ELISA terhadap S-IgA dan IgG mukus usus serta untuk IgA dan IgG serum dengan menggunakan *Completely Randomized Design*.

Dari Anova terhadap jumlah koloni *Salmonella typhi* pada medium BSA, tampak bahwa pada perlakuan AdhF36 dan AdhO36 pertumbuhan *Salmonella typhi* pada BSA sedikit sekali dan kedua perlakuan tersebut tidak berbeda bermakna ($p = 0.061$); namun berbeda sangat bermakna dengan perlakuan Kontrol positif dan perlakuan CTB ($p = 0.001$). Dari Anova pengaruh perlakuan terhadap kadar IgG dan IgA, menunjukkan bahwa kadar IgG dalam serum lebih tinggi dari pada kadar IgG dalam mukus, sedangkan kadar IgA dalam serum lebih rendah dari pada kadar IgA dalam mukus, baik untuk

protein AdhF36 maupun untuk protein AdhO36, masing-masing dengan $p = 0.001$. Hal ini sesuai dengan respon imun humoral normal, bahwa kadar IgG dalam serum memang lebih tinggi dibandingkan dengan IgG dalam sekresi usus, demikian pula kadar IgA dalam sekresi usus (S-IgA) lebih tinggi dari pada IgA dalam serum (Mestecky *et al.*, 1999). Adanya IgG dalam serum menunjukkan bahwa protein AdhF36 dan AdhO36 sebagai antigen yang diberikan per oral tidak hanya mampu merangsang respon imun mukosal, tetapi juga mampu merangsang respon imun humoral secara sistemik.

Dari uji t kadar IgG dan IgA di dalam serum dan mukus untuk perlakuan AdhF36 dan perlakuan AdhO36 menunjukkan bahwa kadar IgG serum yang diproduksi pada perlakuan AdhF36 dan AdhO36 berbeda sangat bermakna ($p = 0.002$) sedangkan kadar IgA serum tidak berbeda bermakna ($p = 0.714$). Kadar IgG yang disekresikan ke dalam mukus berbeda bermakna ($p = 0.020$), sedangkan kadar IgA mukus tidak berbeda bermakna ($p = 0.0577$). Dari hasil ini menunjukkan bahwa protein AdhO36 lebih mampu menginduksi IgG baik di dalam serum maupun di dalam mukus dari pada protein AdhF36. Dengan demikian apabila protein AdhF36 dan protein AdhO36 digabungkan kemungkinan paling tidak dapat memberikan efek adisi untuk membangkitkan respons imun mukosal dan sekaligus mampu menginduksi respons imun humoral sistemik.

Akhirnya dapat dibuktikan bahwa *Salmonella typhi* selain memiliki protein adhesin AdhF36 (*fimbrial adhesin*) yang mempunyai ciri *type-1 fimbriae*, juga memiliki protein AdhO36 (*afimbrial adhesin*) yang merupakan temuan baru, keduanya merupakan faktor virulensi pada proses adhesi dan kolonisasi, yang berpotensi imunogenik untuk merangsang terbentuknya S-IgA protektif guna menghambat proses adhesi dan kolonisasi, sehingga tahap awal infeksi dapat dicegah. Dengan demikian maka hipotesis penelitian ini terbukti.

ABSTRACT

Typhoid fever, a systemic disease caused by *Salmonella typhi*, has so far been a health problem, especially in developing countries including Indonesia. This is, among others, due to the unavailability of a really effective vaccine. The oral Ty21a and parental Vi capsular polysaccharide have so far yielded unsatisfactorily results (65-70% efficacy) and a further development of the typhoid fever vaccine is deemed necessary. In line with this, a laboratory experimental research has been conducted on *Salmonella typhi* adhesin proteins in attempt of proving the existence of new adhesin protein aside from *type-I fimbrae*, and disclosing the effect of the adhesin protein as a virulence factor with immunogenic potency to elicit protective S-IgA for the inhibition of adhesion and colonization process of *Salmonella typhi* at Balb/c mice enterocytes so that the initial step of infection is prevented.

The availability of *Salmonella typhi* adhesin protein, both *fimbrial* and *afimbrial*, was tested using Hemagglutination and SDS-PAGE Tests on the Fimbriae and OMP fractions considering that hemagglutinin protein can also function as an adhesin protein. The hemagglutinin protein of fimbriae and OMP fractions resulted had a molecular weight of about 36 kDa at SDS-PAGE. These two hemagglutinin proteins (HA-F36 and HA-O36) differed at room temperature treatment: HA-O36 protein stood at a molecular weight of around 74 kDa whereas HA-F36 remained at a position of about 36 kDa. HA-F36 and HA-O36 were sensitive toward D-mannose and could agglutinate erythrocyte of the guinea pig, mice and man with the O blood group.

The Adhesion Test on Balb/c mice enterocytes showed that the HA-F36 and HA-O36 proteins were adhesin proteins, further named as AdhF36 for Adhesin-F36 and AdhO36 for Adhesin-O36.

The immunogenic potency of AdhF36 and AdhO36 proteins was significantly proven by Immunogenicity Test. It was evident that the IgA serum concentration induced by AdhF36 protein was higher than the IgG serum concentration whereas those induced by the AdhO36 protein were about the same. In addition, cross reaction was evident between AdhF36 and AdhO36.

In the Protectivity Test, the capability of AdhF36 and AdhO36 proteins as mucosal immunogenes on Balb/c mice was tested. The production of S-IgA and the significant *in vivo* adhesion inhibition show that *Salmonella typhi* contains adhesin proteins (AdhF36 and AdhO36) which have immunogenic potency as virulence factors toward the production of protective S-IgA.

Key words: *Salmonella typhi*, hemagglutinin protein, adhesin protein, and S-IgA.