

ARTIKEL ASLI

ADHESION TEST OF HEMAGGLUTININ-O36 PROTEIN OF *SALMONELLA TYPHI* MALANG ISOLATE AT BALB/C MICE ENTEROCYTES

Sanarto Santoso

Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

ABSTRACT

In general, the bacterial hemagglutinin (HA) protein also functions as an adhesin. Earlier research shows that the Malang isolate *Salmonella typhi* has afimbrial matter capable of agglutinating erythrocytes or functioning as the hemagglutinin (HA) protein, originating from the OMP (outer membrane protein) molecule weight of around 36kDa (HA-O36). In the present study, the adhesion test using 6 dosage treatments of HA-O36 protein reveals that the higher the dosage, the fewer the *Salmonella typhi* bacteria that will be attached onto the enterocyte cells of the Balb/c mice. Furthermore, the Anova test indicates that the dosage treatment significantly influences the adhesin index. Significant correlation is evident between the dosage treatment and the adhesin index value, as shown by the Pearson correlation coefficient of -0.830 and $p=0.001$. This proves that the *Salmonella typhi* HA-O36 protein is an OMP adhesin protein, or an afimbrial adhesin (AFA). This protein is hereinafter referred to as the O36-adhesin protein or AdhO36. In addition, this study reveals that the AdhO36 protein induces a kind of membrane ruffling onto the enterocyte cell, and that *Salmonella typhi* performs a localized adherence pattern.

Key words: adhesion test, O-36 hemagglutinin protein, *Salmonella typhi*

ABSTRAK

Pada umumnya protein hemagglutinin (HA) bakteri juga memerankan adhesin. Pada penelitian terdahulu diketahui bahwa *Salmonella typhi* isolat Malang memiliki material afimbrial yang dapat mengagglutinasikan eritrosit atau merupakan protein hemagglutinin (HA), berasal dari OMP (outer membrane protein) dengan berat molekul sekitar 36kDa (HA-O36). Dari hasil penelitian ini, melalui uji adhesi dengan 6 perlakuan dosis protein HA-O36, tampak bahwa dengan makin meningkatnya dosis makin sedikit bakteri *Salmonella typhi* yang menempel pada sel eritrosit mencit Balb/c, dan dari hasil Anova menunjukkan bahwa perlakuan dosis berpengaruh sangat bermakna terhadap indeks adhesi. Terdapat hubungan yang nyata antara perlakuan dosis dengan nilai indeks adhesi, yang ditunjukkan dengan koefisien korelasi Pearson sebesar -0.830 dengan $p=0.001$. Dengan demikian maka terbukti bahwa protein HA-O36 *Salmonella typhi* adalah protein adhesin OMP atau sebagai afimbrial adhesin (AFA), dan selanjutnya protein ini diberi nama protein adhesin -O36 atau AdhO36. Selain itu pada penelitian ini dapat diketahui bahwa protein AdhO36 mampu menginduksi semacam membrane ruffling pada sel enterosit, serta diketahui bahwa dari beberapa pengamatan *Salmonella typhi* juga menunjukkan pola adhesi tipe localized.

Kata kunci: uji adhesi, protein hemagglutinin-O36, *Salmonella typhi*

PENDAHULUAN

Pada umumnya protein hemagglutinin (HA) bakteri juga memerankan adhesin, misalnya interaksi *Helicobacter pylori* dengan epitel gaster yang diperantarai oleh CFA (colonization factor antigen) ternyata juga hemagglutinin (1), demikian halnya dengan adhesin bakteri *Bordetella pertussis* dan *Pseudomonas aeruginosa*, juga merupakan hemagglutinin. Karena eritrosit dari spesies hewan yang berbeda memiliki reseptor yang berbeda juga, maka interaksi HA - eritrosit memberikan ciri reseptor yang terlibat pada penangkapan bakteri patogen di mukosa. Pada beberapa patogen intestinal, termasuk *Vibrio cholerae*, terdapat korelasi antara sifat kemampuan hemagglutinasia dengan kemampuan adhesi pada mukosa intestinal (2).

Ada dua strategi bakteri untuk mengadakan perlekatan (adhesi) dan kolonisasi pada permukaan sel hospes, yaitu melalui pili atau fimbriae dan melalui afimbrial adhesin (AFA). Afimbrial adhesin merupakan protein permukaan (outer membrane protein) beberapa sel bakteri yang penting dalam proses adhesi dimana perlekatannya dengan sel hospes lebih kuat dibandingkan pili, namun masih sedikit yang diketahui tentang struktur dan mekanisme perlekatannya (3). Kolonisasi bakteri pada jaringan hospes diperantarai oleh adhesin tersebut, yang bertanggung jawab untuk mengenal reseptor khusus pada hospes. Reseptor biasanya berupa karbohidrat spesifik atau residu peptida pada permukaan sel eukariotik, sedangkan adhesin bakteri merupakan komponen makromolekul yang

terdapat pada permukaan sel bakteri. *Adhesin* dan reseptor berikatan secara komplementer dan spesifik (4).

Oleh karena *protein adhesin* merupakan salah satu faktor virulensi, dan pada umumnya faktor virulensi memiliki potensi imunogenik, maka keberadaan *protein adhesin* pada sel bakteri dapat dikembangkan sebagai kandidat vaksin. Menurut Hultgren, vaksin yang berdasarkan *adhesin* ini merupakan pendekatan baru untuk mencegah infeksi (5).

Telah diketahui bahwa *Salmonella typhi* memiliki *type-1 fimbriae* yang diduga merupakan satu-satunya *protein adhesin* yang dimilikinya (6), namun perannya pada virulensi masih dipertanyakan (7). Selain itu *Salmonella typhi* juga memiliki LPS yang juga berfungsi *adhesin* (8).

Salmonella typhimurium sebagai bakteri model untuk mempelajari *Salmonella typhi* selain memiliki *type-1 fimbriae* ternyata diketahui memiliki *fimbrial adhesin* lain ialah *plasmid-encoded* (PE) *fimbriae*, *long polar* (LP) *fimbriae* dan *thin aggregative fimbriae* (9).

Salmonella spp dan *E.coli* memiliki DNA homologi 90% sehingga kedua bakteri ini seyogyanya ditempatkan dalam satu genus (10). *E.coli* enterotoksigenik di samping *type-1 pili*, memiliki *fimbriae* lain: *CFA/I* dan *CFA/II*, sedangkan *Uropathogenic E.coli* selain memiliki *P pili* dan *type-1 pili*, juga memiliki *afimbrial adhesin*: *AFA I*, *AFA III* dan *fimbrial adhesin* yang lain ialah *Dr Adhesin* dan *F1845* (10,11).

Mengenai *protein adhesin* lain selain *type-1 fimbriae* pada *Salmonella typhi*, baik berupa *fimbrial adhesin* maupun *afimbrial adhesin* (AFA) belum pernah diungkap, namun pada penelitian terdahulu telah diketahui bahwa *Salmonella typhi* isolat Malang memiliki materi *afimbrial* yang dapat mengagglutinasikan eritrosit atau merupakan protein *hemagglutinin* (HA), berasal dari OMP (*outer membrane protein*) dengan berat molekul sekitar 36 kDa dan selanjutnya disebut HA-O36 (12).

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa protein *hemagglutinin*-O36 tersebut merupakan *protein adhesin*, dalam usaha menemukan kandidat vaksin mukosal yang lebih efektif dan aman.

MATERI DAN METODE

Bakteri :

Salmonella typhi diperoleh dari spesimen klinis penderita demam tifoid di R.S.Dr.Saiful Anwar Malang. Kultur bakteri menggunakan prosedur yang biasa dilakukan di laboratorium Mikrobiologi FK Unibraw dan identifikasi bakteri dilakukan dengan "Microbact System".

Bahan dan Reagensia :

MacConkey agar, BSA, TCG agar, BHI broth, *Trichloroacetic acid* (TCA), *Phosphat Buffer Saline* (PBS), EGTA, *dithiothreitol*, bahan & reagens untuk elektroforesis SDS-PAGE, *Sephacryl HR-100*, detergent untuk OMP : *Chaps* [3-((3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio)-1-propanesulfonate] (Sigma Ultra), Microbact System, bahan pewarnaan Gram.

Hewan Coba :

Mencit betina galur Balb/c, berat sekitar 25 gram, umur sekitar 8 minggu, yang diperoleh dari Pusvetma-Wonocolo, Surabaya.

Alat :

Sentrifus biasa, sentrifus dingin, alat pemotong *pili* "omnimixer" modifikasi, inkubator, timbangan elektrik, "shaker incubator", alat elektroforesis SDS-PAGE, kolom untuk kromatografi gel.

Perbanyakan bakteri

Setelah dilakukan identifikasi *Salmonella typhi*, bakteri isolat diperbanyak pada medium MacConkey diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam. Biakan dari medium MacConkey ini kemudian dipindahkan kedalam medium *biphasic* yang terdiri atas medium cair BHI dan medium agar miring TCG, diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam (13,14).

Fraksinasi OMP

Biakan cair dari medium *biphasic* dipindahkan kedalam tabung sentrifus 100cc, ditambahkan TCA sehingga konsentrasinya 3%, kemudian diputar pada sentrifus dingin 4°C 6000 rpm selama 15 menit. Endapan disuspensi dengan PBS pH 7,4 secukupnya, kemudian dilakukan pemotongan *fimbriae* menggunakan alat *omni-mixer* modifikasi pada suhu 4°C (14,15). Sampel kemudian diputar dalam sentrifus dingin 4°C 12.000 rpm selama 15 menit.

Bagian sel dari prosedur diatas, disuspensi dengan PBS pH 7,4 secukupnya, kemudian ditambahkan *Chaps* (3-((3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio)-1-propanesulfonate) sehingga diperoleh kadar 0,5% (b/v). Dikocok menggunakan vortex selama 5 menit, kemudian diputar pada sentrifus dingin 4°C 12.000 rpm selama 15 menit. Filtrat diambil, dilakukan dialisis menggunakan PBS pH 7.4 untuk menghilangkan *Chaps*. Dialisat disimpan sebagai fraksi OMP (16).

Preparasi antigen untuk Uji Adhesi

Yang disebut antigen dalam hal ini adalah *protein hemagglutinin* (HA)-OMP. Untuk pemurnian protein antigen dipakai metode kromatografi gel menggunakan *Sephacryl HR-100*. Sebagai *washing solution* dipakai TEA dan sebagai eluen adalah TEAN. Hasil eluat kromatografi dielektroforesis SDS-PAGE menurut metode Laemli (17) (1970). Kemudian pita protein pada posisi berat molekul HA-OMP (sekitar 36 kDa) dipotong dan dikumpulkan, selanjutnya dilakukan elektroelusi sehingga diperoleh protein murni yang dimaksud.

Uji Adhesi

Uji adhesi dilakukan menggunakan epitel usus halus (enterosit) mencit dengan alasan oleh karena tempat sasaran *Salmonella typhi* adalah epitel usus halus.

Prosedur Uji Adhesi :

Bakteri *Salmonella typhi* dibiakkan pada medium *nutrient broth* pada suhu 37°C selama 24 jam. Biakan cair kemudian disentrifugasi 6000 rpm, pada suhu 4°C selama 15 menit. Endapan disuspensikan didalam PBS yang mengandung BSA

1%. Kandungan bakteri dibuat $10^8/\text{ml}$ (konsentrasi sel pada $\text{OD}=1$, $\lambda=600\text{nm} = 10^8/\text{ml}$) (18).

Dibuat preparasi dosis protein HA-Fimbriae dan HA-OMP masing-masing sebanyak 0 μg (kontrol), 25 μg , 50 μg , 100 μg , 200 μg dan 400 μg dalam 300 μl PBS. Selanjutnya terhadap masing-masing dosis protein Fimbriae dan OMP ditambahkan suspensi enterosit sebanyak 300 μl dan digoyang perlahan pada *shaking water bath* pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian ke dalam campuran tersebut ditambah suspensi bakteri ($10^8/\text{ml}$) sebanyak 300 μl . Campuran diinkubasi pada '*shaking incubator*' selama 30 menit pada suhu 37°C . Selanjutnya disentrifugasi 1500 rpm, pada suhu 4°C selama 3 menit, kemudian endapan dicuci 2x menggunakan PBS. Endapan diambil, dibuat hapusan pada gelas obyek dan dicat dengan pewarnaan Gram. Preparat diamati dibawah mikroskop pembesaran 1000x, dan dihitung jumlah bakteri yang menempel pada enterosit. Indeks adhesi adalah jumlah bakteri rerata yang menempel pada setiap enterosit, dihitung untuk setiap pengamatan terhadap 100 enterosit (19,20).

Isolasi enterosit mencit dilakukan menurut metode Weisser (21) dimodifikasi. Setelah usus halus dipotong kecil-kecil, selanjutnya

jaringan usus dimasukkan kedalam cairan yang mengandung 1,5 mM KCl, 9,6 mM NaCl, 27mM Na-citrat, 8 mM KH_2PO_4 dan 5,6 mM Na_2HPO_4 pada pH 7,4. Campuran diinkubasi pada *shaking incubator* 37°C selama 15 menit. Supernatan dibuang, jaringan dipindahkan kedalam larutan PBS yang mengandung 1,5 M EDTA dan 0,5 mM dithiothreitol, digojog kuat selama 15 menit pada suhu 37°C . Campuran disentrifugasi 1500 rpm, pada suhu 4°C selama 5 menit. Enterosit diperoleh setelah jaringan disuspensi dalam larutan PBS yang mengandung BSA 1%.

HASIL

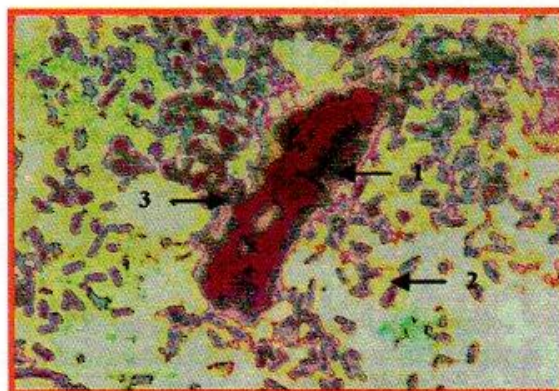
Uji Adhesi Protein HA-O36

Rekaman Gambar Uji Adhesi. Beberapa rekaman gambar uji adhesi protein hemagglutinin O36 seperti yang terlihat dibawah ini, merupakan hasil foto mikroskop merk Nikon.

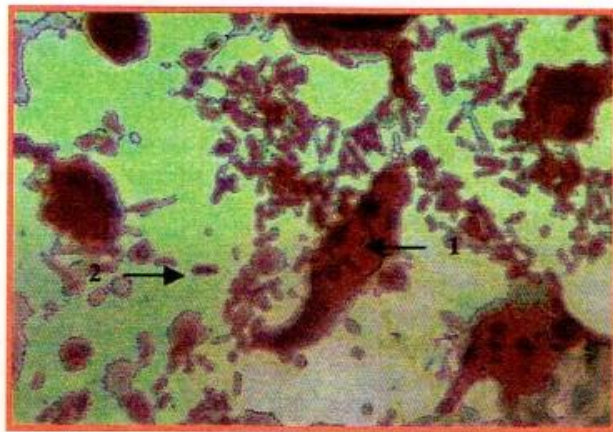
Dibawah ini adalah contoh gambar/foto dengan perlakuan dosis 0 μg (kontrol), 25 μg , 50 μg , 100 μg , 200 μg , dan 400 μg secara berurutan.



Gambar 1. Perlakuan Kontrol (Dosis 0 μg) (enterosit + *Salmonella typhi*)
Keterangan : 1.sel enterosit, 2. sel bakteri *Salmonella typhi*. Sediaan diwarnai secara Gram.

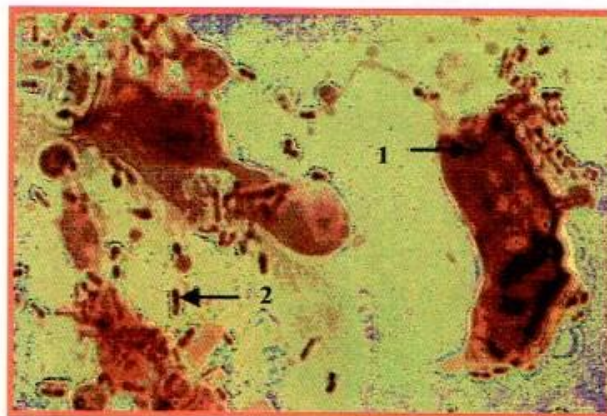


Gambar 2. Perlakuan dosis 25 μg
Keterangan : 1.sel enterosit, 2.sel bakteri *Salmonella typhi* 3. localized adherence. Sediaan diwarnai secara Gram



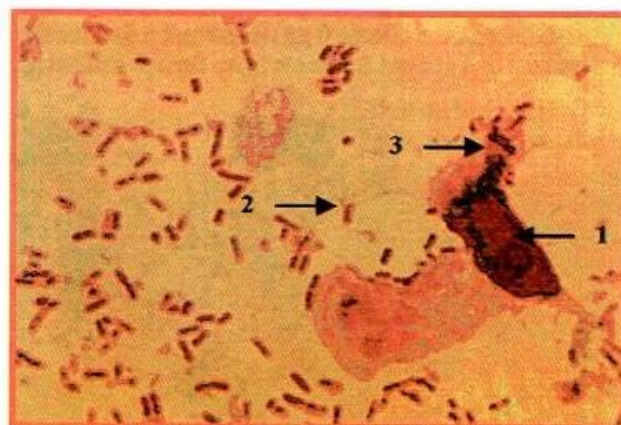
Gambar 3. Perlakuan Dosis 50 µg

Keterangan : 1.sel enterosit,2.sel bakteri *Salmonella typhi*. Sediaan diwarnai secara Gram



Gambar 4. Perlakuan Dosis 100 µg

Keterangan : 1.sel enterosit, 2.sel bakteri *Salmonella typhi*. Sediaan diwarnai secara Gram



Gambar 5. Perlakuan Dosis 200 µg

Keterangan : 1.sel enterosit, 2.sel bakteri *Salmonella typhi* 3.bentukan seperti *membrane ruffling*
Sediaan diwarnai secara Gram



Gambar 6. Perlakuan Dosis 400 µg

Keterangan : 1.sel enterosit, 2.sel bakteri *Salmonella typhi*. Sediaan diwarnai secara Gram

Gambar (foto) 1 adalah perlakuan kontrol dimana enterosit langsung direaksikan dengan bakteri *Salmonella typhi*. Disini tampak sel enterosit berwarna merah penuh dikelilingi dan ditemplei oleh bakteri *Salmonella typhi* yang berbentuk batang Gram negatif. Pada penghitungan indeks adhesi, yang dihitung adalah banyaknya bakteri yang menempel pada permukaan setiap sel enterosit, dihitung sampai seratus sel enterosit dan dibuat reratanya.

Dengan semakin meningkatnya dosis, tampak bahwa *Salmonella typhi* yang melekat pada sel-sel enterosit semakin sedikit, bahkan pada dosis 400 µg hampir tidak tampak adanya bakteri yang menempel (Gambar 6). Selain itu, pada Gambar 2 tampak juga adanya pola adhesi seperti tipe *localized*, dimana gambaran pola adhesi seperti tipe *localized* ini tampak pada beberapa pengamatan. Pada Gambar 5 tampak adanya tonjolan membrane sel yang mungkin merupakan awal *membrane ruffling*. Gambaran semacam ini juga tampak pada beberapa pengamatan.

Analisis Statistik Uji Adhesi

Tabel 1. Ringkasan Hasil Indeks Adhesi

Dosis (µg)	Protein HA-O36	
	Rerata	Simp.Baku
0	23.960	2.170
25	18.563	1.251
50	15.080	2.110
100	12.860	0.832
200	09.990	1.564
400	07.563	0.742

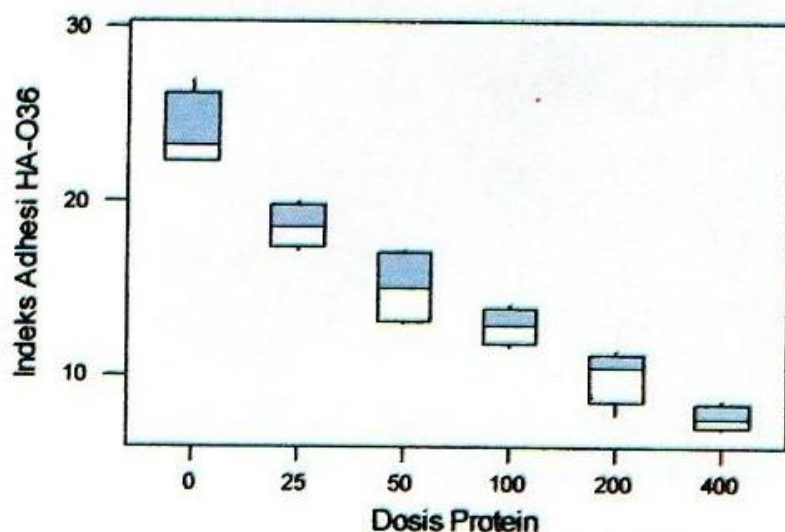
Tabel 2 Hasil Anova Indeks Adhesi Protein HA – 036

Sumber keragaman	db	JK	KT	F	P
Perlakuan	5	709.45	141.89	57.19	0.001
Galat	18	44.66	2.48		
Total	23	754.11			

Tabel 3. Hasil Tukey's Test Indeks Adhesi Protein HA-036

Dosis	Rerata
0	23,960 a
25	18,563 b
50	15,080 bc
100	12,660 cd
200	9,990 de
400	7,563 e

Nilai rerata yang didampingi huruf sama berarti tidak berbeda bermakna dengan $p=0.05$ nilai BNJ 5% = 3.53



Gambar 7. Diagram Kotak Indeks Adhesi Protein HA-O36

Dari hasil Anova (Tabel 2) dan Diagram Kotak (Gambar 7) tampak bahwa perlakuan dosis berpengaruh sangat bermakna terhadap indeks adhesi, dan selanjutnya *Tukey's test* menunjukkan bahwa perlakuan dosis 0 µg berbeda bermakna dengan semua perlakuan, sedangkan perlakuan dosis 25 µg dan dosis 50 µg, dosis 50 µg dan dosis 100 µg, dosis 100 µg dan dosis 200 µg, serta dosis 200 dan dosis 400 µg tidak berbeda bermakna. Perlakuan dosis 25 µg dan dosis 100 µg, dosis 50 µg dan dosis 200 µg, serta dosis 100 µg dan dosis 400, berbeda bermakna.

Secara umum pemberian protein HA-O36 menurunkan nilai adhesi. Terdapat hubungan yang nyata antara perlakuan dosis dengan nilai indeks adhesi, yang ditunjukkan dengan koefisien korelasi Pearson sebesar -0.830 dengan $p=0.001$. Dengan demikian maka terbukti bahwa protein HA-O36 adalah protein adhesin OMP atau sebagai *afimbrial adhesin* (AFA), dan selanjutnya protein ini diberi nama protein adhesin-O36 atau AdhO36.

PEMBAHASAN

Seperti telah diketahui bahwa pada beberapa patogen intestinal termasuk *Vibrio cholerae*, terdapat korelasi positif antara sifat kemampuan hemagglutinasinya dengan kemampuan adhesi pada mukosa intestinal (2). Demikian juga telah terbukti bahwa pada beberapa adhesin bakterial dapat mengagglutinasikan sel darah merah (memerankan hemagglutinin) misalnya pada bakteri *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis* dan *Pseudomonas aeruginosa* (1).

Dari penelitian terdahulu telah diketahui adanya protein hemagglutinin *Salmonella typhi* yang berasal dari *outer membrane protein* (OMP) dengan berat molekul sekitar 36 kDa (12). Pada penelitian ini akan dibuktikan bahwa protein

hemagglutinin OMP 36 kDa (HA-O36) tersebut adalah protein adhesin.

Sel yang digunakan pada penelitian ini adalah sel enterosit usus halus mencit Balb/c. Dipilihnya sel enterosit usus halus karena usus halus merupakan tempat masuk yang lazim bagi *Salmonella typhi* dan enterosit sendiri merupakan sel yang biasa digunakan untuk uji adhesi (14,20,22). Pada uji adhesi ini digunakan 6 perlakuan dosis untuk masing-masing protein : dosis 0 µg (kontrol), 25 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg, dan 400 µg, yang disalutkan pada sel enterosit sebelum direaksikan dengan bakteri *Salmonella typhi*. Penyalutan protein-protein ini dimaksudkan untuk menjenuhi reseptor yang terlibat pada proses adhesi sehingga yang diharapkan adalah efek inhibisi dari percobaan tersebut (21).

Seperti diketahui bahwa interaksi protein spesifik pada permukaan mikroba (adhesin) dengan rantai karbohidrat dari glikokonjugat (reseptor) pada sel hospes merupakan tahap awal suatu infeksi (23). Dari rekaman gambar uji adhesi protein HA-O36 (Gambar 1 s/d Gambar 6), tampak adanya penurunan yang nyata dari jumlah bakteri yang melekat pada sel enterosit dengan makin meningkatnya dosis. Terlihat jelas bahwa dengan makin meningkatnya dosis, makin banyak protein yang menjenuhi reseptor sehingga makin sedikit sel bakteri *Salmonella typhi* yang mampu menempel pada sel enterosit atau dengan perkataan lain mencegah penempelan bakteri pada sel enterosit. Dengan demikian maka jelas bahwa memang ada reseptor khusus pada sel enterosit mencit terhadap protein HA-O36.

Saat ini, interaksi adhesi lebih dari 100 bakteri patogen baik pada manusia maupun hewan telah diteliti. Dari hasil penelitian tersebut, ada tiga tipe interaksi adhesin-reseptor yang dapat dijelaskan. Tipe pertama yang mungkin terjadi pada kebanyakan bakteri patogen, berdasarkan pengenalan *lectin*-

karbohidrat, dimana lectin ini bisa berada pada bakteri maupun pada permukaan mukosa. Tipe kedua, melibatkan interaksi protein-protein, antara protein yang terdapat pada bakteri dan protein pasangannya yang terdapat pada permukaan mukosa. Tipe ketiga, yang mungkin terakhir diketahui, melibatkan interaksi antara protein dan lipid, dimana lipid bisa berada pada sel hospes atau pada permukaan sel bakteri (24).

Sejumlah besar adhesin adalah spesifik terhadap karbohidrat dan dikenal sebagai *lectin*. *Lectin* akan mengikatkan bakteri ke *carbohydrate moieties* dari glikoprotein atau glikolipid yang terdapat pada sel epitel atau sel lain dari hospes. Contoh ikatan *lectin*-karbohidrat adalah *lectin (type-1 fimbriae)* dengan reseptor glikoprotein (*uropodin* pada sel kandung kemih) (25). *Lectin* ini dapat berbentuk struktur fimbriae, kapsul atau komponen *outer membrane* dari bakteri gram negatif (26). Dengan demikian, protein HA-O36 yang merupakan komponen *outer membrane Salmonella typhi* kemungkinan besar juga terdiri atas *lectin*.

Ada tiga macam pola perlekatan (adhesi) bakteri seperti yang ditunjukkan oleh *E.coli* : (1) *localized* (LA) dimana mikrokoloni terbentuk pada satu atau lebih tempat tertentu pada permukaan sel, (2) *diffuse* (DA) jika bakteri menyelimuti seluruh permukaan sel secara merata, dan (3) *aggregative* (AggA) jika perlekatan bakteri tersusun seperti tumpukan batu bata (27,28). Gambar 2. menunjukkan gambaran seperti tipe *localized*, yang mana gambaran ini banyak dijumpai pada pengamatan berbagai perlakuan baik pada kontrol, maupun perlakuan dosis protein HA-O36. Hal ini sesuai dengan penelitian Hernandez *et al.* (1997) yang mana perlekatan *Diarrhaeogenic E.coli* pada 32 – 33 kDa *human intestinal brush border protein* menunjukkan bahwa strain LA lebih tinggi 6 – 7 kali dari pada strain AggA dan strain DA. Kemungkinan lain, gambaran seperti tipe *localized* ini terjadi karena sebagian besar reseptor pada sel tersebut terjeruji oleh *protein adhesin* sehingga bakteri hanya menempel pada bagian-bagian tertentu saja dari reseptor yang bebas pada permukaan sel. Pada penelitian ini tidak dijumpai gambaran tipe *aggregative* dan tipe *diffuse*.

Hasil Anova indeks adhesi protein HA-O36 juga menunjukkan bahwa perlakuan dosis pada Tabel 2. berpengaruh sangat bermakna terhadap indeks adhesi ($p = 0.001$). Bila dilakukan *Tukey's test*, sesuai dengan notasinya, tampak bahwa perlakuan dosis 0 μg berbeda bermakna terhadap semua perlakuan dosis yang lain. Perlakuan dosis 25 μg dan 50 μg , dosis 100 μg dan 200 μg , serta dosis 200 μg dan 400 μg tidak berbeda bermakna. Sedangkan perlakuan dosis 25 μg dan dosis 50 μg dengan dosis 100 μg , 200 μg dan 400 μg berbeda bermakna, demikian juga perlakuan dosis 50 μg dengan dosis 200 μg dan 400 μg , serta perlakuan dosis 100 μg dengan dosis 400 μg juga berbeda bermakna. Koefisien korelasi Pearson – 0.830 dengan $p = 0.001$ menunjukkan adanya hubungan yang erat antara perlakuan dosis protein HA-O36 dengan makin rendahnya indeks adhesi, sehingga dapat dikatakan bahwa protein HA-O36 berperan sebagai protein adhesin dan untuk selanjutnya disebut sebagai *protein adhesin* O36 (AdhO36).

Pada Gambar 5. perlakuan protein HA-O36 kadar 200 μg tampak adanya tonjolan sel enterosit dengan beberapa bakteri di atas tonjolan tersebut. Kemungkinan tonjolan ini menunjukkan sel dalam keadaan aktif untuk menelan bakteri

yang menempel pada permukaan sel. Aktivitas semacam ini ditunjukkan oleh *Salmonella typhimurium* dan *Salmonella choleraesuis* pada kultur sel yang memicu *actin rearrangements* dengan terbentuknya semacam pseudopodia untuk menelan bakteri yang disebut *membrane ruffling*. Satu model bagaimana *Salmonella spp.* menyebabkan *actin rearrangements* adalah melalui rangsangan *signal transduction pathway* sel hospes yang menyebabkan peningkatan level calcium intraseluler, suatu sinyal yang mengaktifkan *actin depolymerizing enzymes* (3). Tampaknya *Salmonella typhi* juga memiliki kemampuan untuk memicu semacam *membrane ruffling* yang mungkin melalui *protein adhesin* merangsang reseptor sel enterosit mencit dan selanjutnya akan terjadi internalisasi dan invasi sebagai awal proses infeksi. Gambaran seperti pada Gambar 5 tampak pada beberapa pengamatan.

Sampai saat ini diketahui bahwa *Salmonella typhi* tidak memiliki hewan coba yang sesuai, sehingga untuk mempelajari patogenesis demam tifoid digunakan model *Salmonella typhimurium* yang mampu menimbulkan penyakit yang sangat mirip dengan demam tifoid pada mencit (7); tetapi dari fenomena ini, walaupun tidak secara keseluruhan patogenesis demam tifoid dapat diketahui karena tidak menimbulkan gejala penyakit, paling tidak proses adhesi, kolonisasi sampai invasi pada sel enterosit akibat infeksi *Salmonella typhi* dapat dipelajari pada hewan coba mencit. Selain itu, kemampuan *protein adhesin Salmonella typhi* (AdhO36) menginduksi semacam *membrane ruffling*, menunjukkan kepekaan sel melakukan internalisasi bakteri yang justru memberi kesempatan bagi bakteri masuk ke sel lebih dalam, untuk kemudian melanjutkan proses infeksi. Dengan demikian, mungkin orang yang peka terhadap infeksi *Salmonella typhi*, akibat induksi protein adhesin (AdhO36) akan terjadi semacam *membrane ruffling* pada sel enterositnya untuk mempercepat terjadinya infeksi; namun hal ini perlu penelitian lebih lanjut.

E.coli penyebab infeksi saluran kemih memiliki dua bentuk adhesin ialah *fimbrial adhesins* (F1845 dan Dr) dan *afimbrial adhesins* (AFA-I dan AFA-III). *E.coli afimbrial adhesins* ini ternyata berkembang dari *fimbrial adhesins* tetapi telah berubah sifatnya, yaitu kemampuan untuk melakukan polimerisasi menjadi *pili* atau *fimbriae* telah hilang tetapi *adhesin domain* tetap berakar pada permukaan sel bakteri (11). Pada *Salmonella typhi* belum pernah ditemukan dan dijelaskan adanya protein AFA, dengan demikian maka protein AdhO36 ini merupakan temuan baru sebagai *afimbrial adhesin*.

Protein adhesin adalah salah satu faktor virulensi bakteri, dan pada umumnya faktor virulensi bakteri memiliki potensi imunogenik. Dengan demikian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang potensi imunogenik protein AdhO36 dan kemungkinannya digunakan sebagai vaksin mukosal yang dapat mencegah adhesi dan kolonisasi *Salmonella typhi* pada usus halus sebagai tahap awal infeksi.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dan pembahasan uji adhesi protein hemagglutinin-O36 (HA-O36) *Salmonella typhi* ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Telah terbukti bahwa protein hemagglutinin-O36 (HA-O36) *Salmonella typhi* adalah protein adhesin dan selanjutnya disebut sebagai protein AdhO36.
2. Protein AdhO36 adalah temuan baru sebagai afimbrial adhesin (AFA), karena sebelumnya tidak dikenal adanya protein AFA pada *Salmonella typhi*.
3. Protein adhesin (AdhO36) *Salmonella typhi* mampu menginduksi semacam membran ruffling yang menunjukkan kepekaan sel hospes melakukan internalisasi bakteri untuk terjadinya proses infeksi.
4. Pada beberapa pengamatan proses adhesi pada enterosit mencit, *Salmonella typhi* menunjukkan pola adhesi tipe localized.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui karakterisasi protein AdhO36 serta uji imunogenisitas guna mengetahui potensi imunogenik protein AdhO36 dan protektivitasnya in vivo dalam hal kemampuannya untuk mencegah tahap awal proses infeksi *Salmonella typhi*.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Evans, D.G., Evans, J.R., D.J., Moulds, J.J., Graham, D.Y., N-Acetylneuraminylactose-Binding Fibrillar Hemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a Putative Colonization Factor Antigen. *Infect Immun*. 1988; 56: 2896-2906.
2. Alam, M., Miyoshi, S.I., Tomochika, K.I., Shinoda, S., Purification and Characterization of Novel Hemagglutinin from *Vibrio mimicus*: a 39-Kilodalton Major Outer Membrane Protein and Lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 1996; 64: 4035 – 4041.
3. Salyers, A.A. and Whitt, D.D., Bacterial Pathogenesis: a Molecular Approach, 2nded. Washington DC; American Society for Microbiology Press. 2002: 93-94, 115-126
4. Todar, K., Bacteriology 330 Lecture Topics: Colonization and Invasion. University of Wisconsin Department of Bacteriology. 1997.
5. Henahan, S. *E.coli* vaccine; Science Update. 1997.
6. Satta, G., Ingiani, A., Muscas, P., Rossolini, G.M., Pompei, R., The Pathogenicity Determinants of *Salmonella typhi*: Potential Role of Fimbrial Structures. In: NATO ASI series volume: The Biology of *Salmonella*. Cabello *et al*, eds, New York, Plenum. 1993: 83-90.
7. Mills, D., Scott, and Finlay, Brett, B., Virulence Factor of *Salmonella typhi*, SEA J of Tropmed and PH, 26 suppl 2. 1995:102-108.
8. Mroczenski-Wildey, M.J., Di Fabio, J.L., Cabello, F.C. Invasion and lysis of HeLa Cell Monolayers by *Salmonella typhi*: The Role of Polysaccharide. *Microb Pathogen*. 1989; 6: 143-152.
9. Velden, A.W.M., Baumber, A.J., Tsois, R.M., Heffron, F., Multiple Fimbrial Adhesins Are Required for Full Virulence of *Salmonella typhimurium* in Mice, *Infect Immun*. 1998; 66 (6): 2803-2808.
10. Salyers, A.A., and Whitt, D.D., Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. Washington DC: American Society for Microbiology Press. 1994: 30-41, 229-241.
11. Finlay, B.B., and Caparon, M., Bacterial Adherence to Cell Surfaces and Extracellular Matrix, in Cellular Microbiology, ASM Press. 2000: 67 – 80.
12. Santoso, S., Winarsih, S., Sumarno., Protein Hemagglutinin 36 kDa OMP *Salmonella typhi*, *Majalah Kedokteran Unibraw Malang*. 1999:15 (3)
13. Finegold, S.M., Barron, E.J., Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 7th ed. CV Mosby Company, USA. 1986: 682, 862, 863, 879.
14. Ehara, M., Ishibashi, M., Ichinose, Y., Iwanaga, M., Shimotori, S., Naito, T., Purification and Partial Characterization of Fimbriae of *Vibrio cholerae* O-1, Vaccine. 1986; 5: 283-286.
15. Sumarno., Karakterisasi Molekuler Protein Adesi *Vibrio cholerae* O1 M094V dan Protein Reseptornya pada Sel Epitel Usus Halus Tikus Putih (Wistar), Studi Patogenesis *Vibrio cholerae* O1 M094V. Disertasi Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya. 2000
16. Dhaenens, L., Szczebara, F., Husson, M.O., Identification, Characterization and Immunogenicity of Lactoferrin-Binding Protein from *Helicobacter pylori*, *Infect Immun* 1997; 65 (5): 514-518.
17. Laemli, U.K., Cleavage of Structural Protein During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*. 1970: 227: 680-686.
18. Schillgaarde, M., Ulsen, P., Eijk, P., Brand, M., Stam, M., Kouame, J., Alphen, L., Dankert, J., Characterization of Adherence of Non-typeable *Haemophilus influenzae* to Human Epithelial Cells, *Infect Immun*. 2000; 68 (8): 4568 – 4665.
19. Martino, P.D., Bertin, Y., Girardeau, J.P., Livrelli, V., Joly, B., Michaud, A.D. Molecular Characterization and Adhesive Properties of CF29K an Adhesin of *Klebsiella pneumoniae* Strain Involved in Nosocomial Infections. *Infect Immun*. 1995; 63 : 4336-4344.
20. Winarsih, S., Sumarno, Roekistiningsih., Kajian Fungsi dan Sifat Imunogenisitas Protein Hemagglutinin 32kD & 20kD pada *Helicobacter pylori*, *Majalah kedokteran Universitas Brawijaya Malang*. 1998:13 (3): 135-141.
21. Nagayama, K., Oguchi, T., Arita, M., Honda, T., Purification and Characterization of a Cell Associated Haemagglutinin of *Vibrio parahaemolyticus*, *Infection and Immunity*. 1995; 63 (5):1987-1992.
22. Weinstein, D.L., O'Neill, B.L., Hone, D.M., Metcalf, E.S., Differential Early Interactions Between *Salmonella enterica* Serovar Typhi and Two Other Pathogenic *Salmonella* Serovars with Intestinal Epithelial Cells. *Infect Immun*. 1998; 66: 2310 – 2318.
23. Rostand, K.S and Esko, J.D., Microbial Adherence to and Invasion Through Proteoglycans. *Infect Immun*. 1997; 65: 1 – 8.
24. Abraham, S.M., Sharon, N., Ofek, I., Adhesion of Bacteria to Mucosal Surfaces, in Ogra PL, Lamm ME, Bienenstock J, Mestecky J, Strber W, McGhee JR, *Mucosal Immunology*, 2nd ed, Academic Pres. 1999 : 31 – 42.

25. Wu, X.R., Sun, T.T., Medina, J.J., In Vitro Binding of Type-1 Fimbriated *Escherichia coli* to Uroplakin Ia and Ib: Relation to Urinary Tract Infections, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*. 1996: 93: 9630 – 9635.
26. Goldhar, J., Bacterial lectinlike Adhesins: Determination and Specifity. In *Bacterial Pathogenesis, Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego. 1994: 236: 211 – 231.
27. Hernandez, A.M., Gavilanes-Parra, S., Chavez-Berrocal, M., Molina-Lopez, J., Cravioto, A., Binding of Diarrheagenic *Escherichia coli* to 32 to 33 Kilodalton Human Intestinal Brush Border Proteins. *Infect Immun*. 1997: 65: 4494-4501.
28. Gonzalez, R., Diaz, C., Marino, M., Cloralt, R., Pequenez, M., Perez-Schael, I., Age-Specific Prevalence of *Escherichia coli* with Localized and Aggregative Adherence in Venezuelan Infants with Acute Diarrhea. *J of Clin Microbiology*. 1997: 35: 1103 – 1107.