

IN VIVO PROTECTIVENESS OF *SALMONELLA* TYPHI Adh036 PROTEIN OF THE MALANG ISOLATE AT BALB/C MICE

PROTEKTIVITAS IN VIVO PROTEIN Adh036 *SALMONELLA* TYPHI ISOLAT MALANG PADA MENCIT BALB/C

Sanarto Santoso

Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

ABSTRACT

In general, It has been revealed in an earlier investigation that *Salmonella typhi* has an afimbrial adhesin protein (AFA) coming from the outer membrane protein (OMP), has a molecular weight of around 36 kDa, and which has afterwards been referred to as AdhO36 protein. In the present study the protectiveness testing was an AdhO36 treatment consisting of an oral AdhO36 protein immunization with CTB (Cholera Toxin sub unit B) adjuvan. This was continued by infecting the Balb/C mice with *Salmonella typhi* orally, after which comparison was made with the negative control, positive control and CTB treatment. Observation concerned the in vivo adhesion inhibition by measuring the number of *Salmonella typhi* colonies growing from the cultured intestines of the Balb/C mice at the BSA (Bismuth Sulphite Agar). At the negative control treatment, no significant *Salmonella typhi* growth was evident at the BSA medium. This indicates that no *Salmonella typhi* functioning as normal flora was found in the Balb/C mice intestines. Highly significant difference was evident between the AdhO36 treatment and the positive control treatment or CTB treatment ($p=0.001$) as shown by the very low growth of *Salmonella typhi* colonies at the BSA medium. This indicates that the AdhO36 protein has a mucosal immunogen potency which is capable of inhibiting the adhesion process and therefore averting the *Salmonella typhi* initial step of infection.

Key words: in vivo protectiveness, AdhO36 protein of *Salmonella typhi*

ABSTRAK

Pada penelitian terdahulu telah terbukti bahwa *Salmonella typhi* memiliki protein adhesin afimbrial (AFA) yang berasal dari OMP (outer membrane protein) dengan berat molekul sekitar 36 kDa dan kemudian diberi nama protein AdhO36. Pada penelitian ini dilakukan uji protektivitas melalui perlakuan AdhO36, imunisasi per oral protein AdhO36 disertai adjuvan CTB (Cholera Toxin sub unit B) kemudian diinfeksi *Salmonella typhi* pada mencit Balb/C, dibandingkan dengan kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan CTB. Yang diamati adalah hambat adhesi in vivo dengan cara menghitung jumlah koloni *Salmonella typhi* yang tumbuh dari biakan usus mencit Balb/c pada medium BSA (Bismuth Sulfite Agar). Pada perlakuan kontrol negatif sama sekali tidak ada pertumbuhan *Salmonella typhi* pada medium BSA, hal ini menunjukkan bahwa pada usus mencit Balb/c tidak didapatkan *Salmonella typhi* sebagai flora normal. Terdapat perbedaan yang sangat bermakna antara perlakuan AdhO36 dengan perlakuan kontrol positif atau perlakuan CTB ($p=0.001$) yang ditunjukkan dengan pertumbuhan koloni *Salmonella typhi* yang sangat sedikit pada medium BSA. Hal ini membuktikan bahwa protein AdhO36 adalah imunogen mukosal poten yang mampu menghambat proses adhesi sehingga tahap awal infeksi *Salmonella typhi* dapat dicegah.

Kata kunci: protektivitas in vivo, protein AdhO36 *Salmonella typhi*

PENDAHULUAN

Pada Demam tifoid yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi* sampai sekarang masih merupakan problem kesehatan, utamanya di negara-negara yang sedang berkembang karena tingginya urbanisasi, kontaminasi suplai air, adanya galur yang resisten terhadap antibiotika, lambatnya diagnosa dan belum adanya vaksin yang benar-benar efektif (1). Vaksin untuk demam tifoid yang beredar di pasaran saat ini ada dua macam, ialah Ty21a suatu oral attenuated vaccine dan parenteral purified Vi polysaccharide (2).

Tampaknya vaksin untuk demam tifoid memang perlu dikembangkan lebih lanjut mengingat efikasi yang diberikan kedua vaksin ini masih sekitar 65 – 70%. Berbagai investigasi dilakukan untuk mendapatkan galur kandidat vaksin demam tifoid yang dapat ditoleransi dengan baik dan lebih imunogenik dari pada Ty21a, antara lain adalah galur CVD 908, CVD 908-htrA^{X4073}, dan Ty800 (3). Namun untuk pengembangan vaksin ini perlu penelitian yang mendalam tentang imunogenisitas faktor-faktor virulensi bakteri, genetik dan patogenesis timbulnya penyakit infeksi demam tifoid.

Seperti diketahui, faktor virulensi bakteri secara umum dapat diklasifikasikan menjadi dua kategori, ialah yang mempromosikan kolonisasi dan invasi bakteri ke dalam tubuh hospes dan yang menyebabkan kerusakan hospes (4). Kolonisasi bakteri pada jaringan hospes diperantarai oleh adhesin, yang bertanggung jawab untuk mengenal reseptor khusus pada hospes. Reseptor biasanya berupa karbohidrat spesifik atau residu peptida pada permukaan sel eukariotik, sedangkan adhesin bakterial merupakan komponen makromolekul yang terdapat pada permukaan sel bakteri. Adhesin dan reseptor berikatan secara komplementer dan spesifik (5).

Ada dua strategi bakteri untuk mengadakan perlekatan pada permukaan 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 (6).

Dalam hal mengawali proses infeksi, protein adhesin berperan sangat penting untuk memperantarai perlekatan bakteri dengan sel target. Oleh karena protein adhesin merupakan salah satu faktor virulensi, dan pada umumnya faktor virulensi memiliki potensi imunogenik, maka keberadaan protein adhesin dapat dikembangkan sebagai kandidat vaksin. Vaksin yang berdasarkan adhesin ini merupakan pendekatan baru untuk mencegah infeksi (7).

Pada umumnya bakteri patogen menyebabkan infeksi dengan cara kolonisasi pada atau invasi ke dalam mukosa. Oleh karenanya sangatlah penting untuk mengembangkan metode yang mampu menginduksi respons imun lokal sehingga dapat memproteksi permukaan mukosa terhadap patogen (8).

Pada penelitian terdahulu telah terbukti bahwa *Salmonella typhi* memiliki protein adhesin afimbrial (AFA) yang berasal dari OMP (*outer membrane protein*) dengan berat molekul sekitar 36 kDa dan kemudian diberi nama AdhO36 (9).

Apakah protein adhesin *Salmonella typhi* dapat mencegah adhesi dan kolonisasi bakteri *Salmonella typhi* pada mukosa usus halus, belum pernah diungkap. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah protein AdhO36 apabila diberikan per oral mampu menghambat adhesi dan kolonisasi bakteri *Salmonella typhi* di usus halus mencit Balb/c, dalam usaha menemukan kandidat vaksin mukosal yang lebih efektif dan aman untuk mencegah demam tifoid.

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), Ajuvan : CTB, *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 (10,11).

Pemisahan bagian sel dari fimbriae 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 (11,12). Sampel kemudian diputar dalam sentrifus dingin 4°C 12.000 rpm selama 15 menit. Filtrat dipisahkan (mengandung fraksi fimbriae) dan endapan disuspensi dengan PBS pH 7,4 secukupnya, kemudian dilakukan pemotongan fimbriae lagi. Proses ini diulangi sampai kira-kira 7 kali dan dihentikan setelah terlihat perbedaan pola protein yang jelas antara fraksi fimbriae dengan fraksi sel (dilakukan elektroforesis). Dari prosedur ini, diperoleh endapan yang merupakan bagian sel bakteri dan digunakan untuk fraksinasi OMP.

Preparasi antigen

Yang disebut antigen dalam hal ini adalah protein Adhesin-O36 (AdhO36). 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 (1970) (14). Kemudian pita protein pada posisi berat molekul sekitar 36 kDa dipotong dan dikumpulkan, selanjutnya dilakukan elektroelusi sehingga diperoleh endapan kering protein yang dimaksud.

Uji Protektivitas in vivo

Parameter yang diamati pada uji ini adalah jumlah koloni yang tumbuh pada medium BSA. Dalam uji ini ada 4 perlakuan ialah (1) kontrol usus mencit (kontrol negatif), (2) kontrol *Salmonella typhi* (kontrol positif), (3) perlakuan CTB, dan (4) perlakuan protein adhesin OMP. Setiap perlakuan membutuhkan : 4 kelompok mencit (n = 4) untuk pemeriksaan hitung koloni, dimana setiap kelompok terdiri atas 1 ekor mencit. Kelompok kontrol negatif, mencit tidak diimunisasi dan tidak diinfeksi dengan *Salmonella typhi*; kelompok kontrol positif, mencit tidak diimunisasi tetapi diinfeksi dengan *Salmonella typhi*; kelompok perlakuan CTB, mencit diimunisasi dengan CTB saja dengan

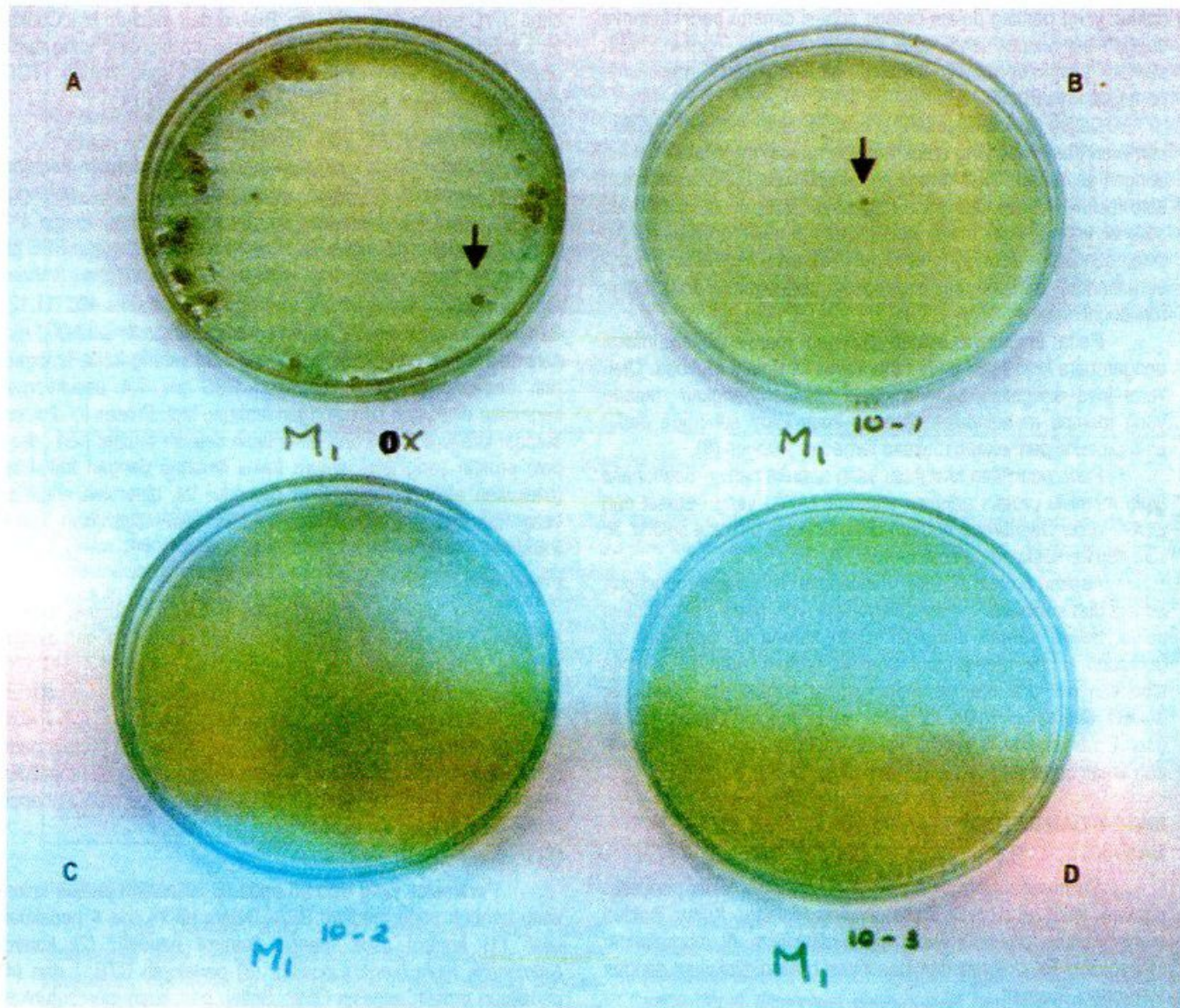
dosis 7 μg per mencit (jumlah CTB sesuai dengan yang digunakan untuk mengikat protein adhesin) dan diinfeksi bakteri *Salmonella typhi*; dan kelompok perlakuan protein adhesin O36, mencit diimunisasi dengan CTB + protein adhesin O36 dosis 250 g/0.3 ml PBS dan diinfeksi dengan bakteri *Salmonella typhi*. Sebelum diberi perlakuan, masing-masing mencit diberi larutan natrium bikarbonat 0,2 M sebanyak 0,3 ml. Semua perlakuan ini diberikan per oral. Imunisasi diberikan 4 kali selang satu minggu, kemudian pada minggu terakhir diinfeksi dengan bakteri *Salmonella typhi*. Dosis infeksi bakteri *Salmonella typhi* adalah 2×10^8 CFU/ml sebanyak 0.3 ml *nutrient broth* dan diberikan 2x selang dua hari. Selanjutnya pada hari ke lima setelah infeksi terakhir setiap mencit diambil usus halusnya, dihomogenisasi dengan PBS steril volume sama untuk setiap mencit. Homogenat diencerkan secara serial: 1 x, 10 x, 100 x dan 1000 x. Dari setiap pengenceran ditanam pada medium BSA sebanyak 20 μl ,

diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37 C. Koloni yang tumbuh diidentifikasi dan yang memiliki karakteristik *Salmonella typhi* dihitung dengan penghitung koloni (*colony counter*). Prosedur ini juga dilakukan pada kelompok kontrol usus mencit dan kelompok kontrol *Salmonella typhi* (15,16,17).

Percobaan dilaksanakan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap, dengan 4 ulangan dan pada setiap unit percobaan dilakukan pengamatan 3 kali (triplo). Sebelum melakukan Anova terlebih dulu dilakukan transformasi $\log(X + 1)$ terhadap data jumlah koloni, kemudian dilanjutkan dengan tes Tukey. Analisis statistika dilakukan dengan menggunakan paket Statistika Minitab Versi 13.,

HASIL

1. Rekaman Gambar Kultur Protektivitas In vivo



Gambar 1. Kontrol Negatif

(Biakan usus mencit tanpa diimunisasi dan tanpa diinokulasi *Salmonella typhi* pada BSA)

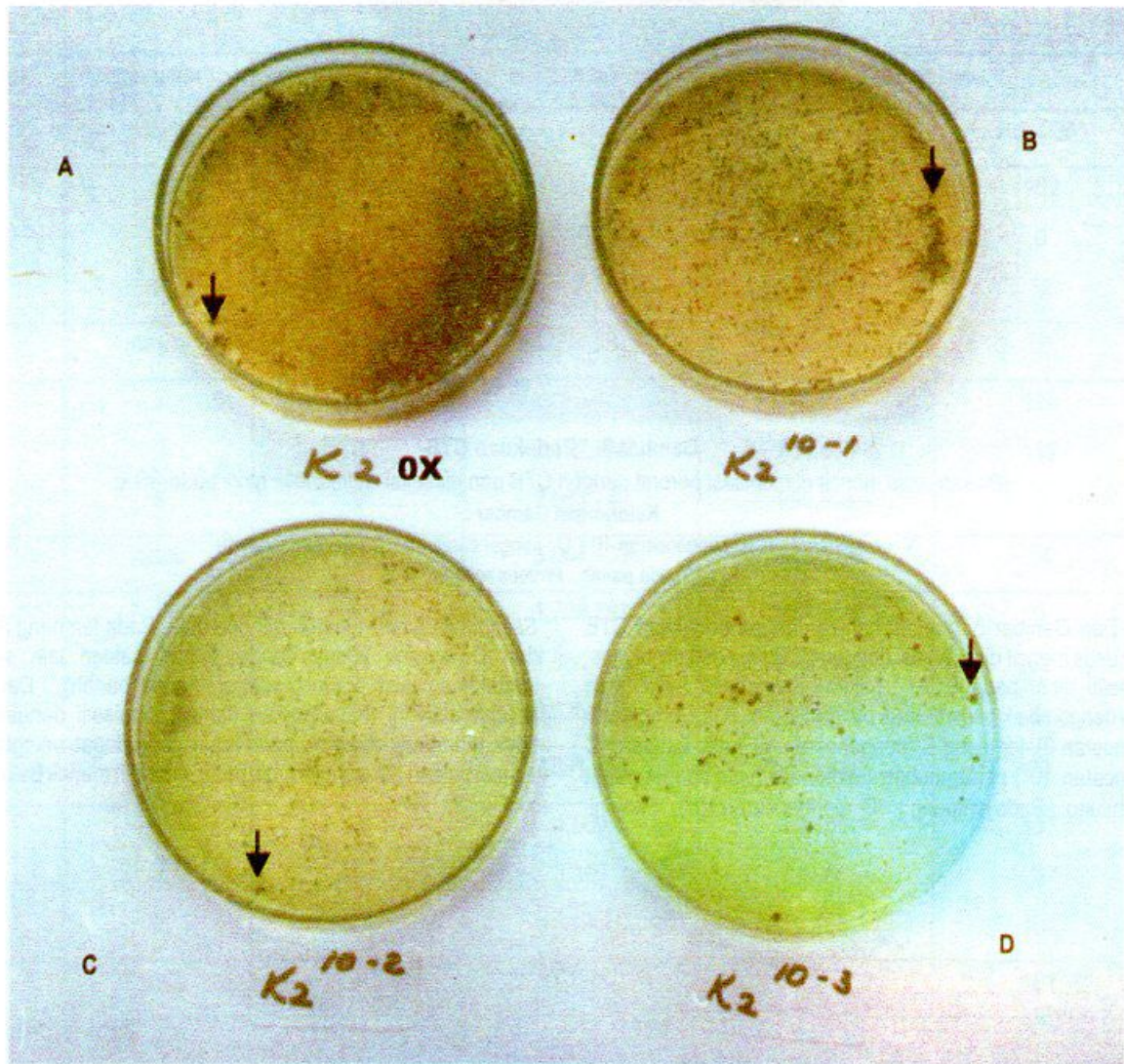
Keterangan Gambar :

A : pengenceran 0X, B : pengenceran 10^{-1} , C : pengenceran 10^{-2} , D : pengenceran 10^{-3}

Tanda panah : *Klebsiella pneumoniae*

Dari Gambar 1. dapat diamati bahwa dengan perlakuan kontrol negatif (biakan usus mencit tanpa diimunisasi dan tanpa diinfeksi *Salmonella typhi* pada BSA) tidak ada pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* pada semua pengenceran. Koloni yang tumbuh pada lempeng A dan B bukan *Salmonella typhi* melainkan bakteri

lain ialah *Klebsiella pneumoniae*. Pada lempeng C dan D sama sekali tidak ada pertumbuhan bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa dalam usus mencit Balb/c pada percobaan ini tidak terdapat *Salmonella typhi* sebagai flora normal.



Gambar 2. Kontrol Positif

(Biakan usus mencit tanpa diimunisasi, tetapi diinokulasi *Salmonella typhi* pada BSA)

Keterangan Gambar :

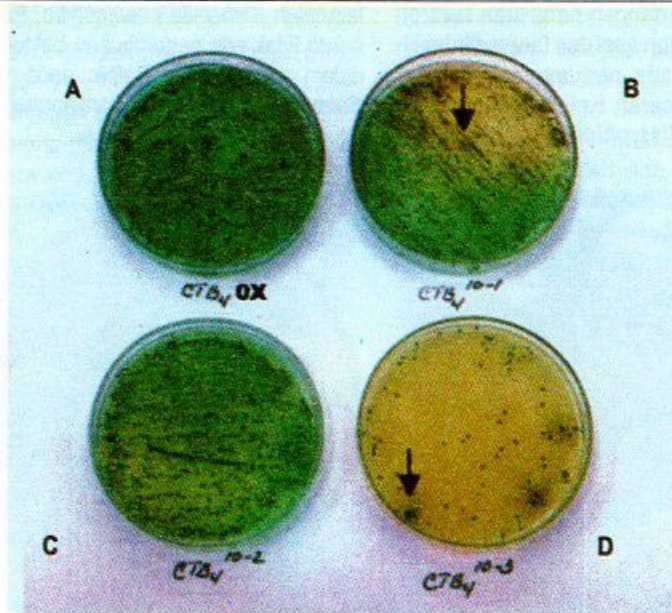
A : pengenceran 0, B : pengenceran 10^{-1} , C : pengenceran 10^{-2} , D : pengenceran 10^{-3}

Tanda panah: *Proteus rettgeri*

Dari Gambar 2 dapat diamati bahwa dengan perlakuan kontrol positif (biakan usus mencit tanpa diimunisasi, tetapi diinokulasi *Salmonella typhi* pada BSA) tampak pertumbuhan *Salmonella typhi* yang sangat padat pada lempeng A (pengenceran 0) dan B (pengenceran 10^{-1}), pada lempeng C (pengenceran 10^{-2}) juga masih padat, dan pada lempeng D (pengenceran 10^{-3}) tampak masih banyak juga koloni *Salmonella typhi* yang tumbuh. Pada perlakuan kontrol positif ini diikuti pula

dengan pertumbuhan bakteri lain ialah *Proteus rettgeri* (tanda panah) pada setiap pengenceran, namun jumlahnya tidak banyak.

Dari hasil pengamatan ini menunjukkan bahwa bakteri *Salmonella typhi* dapat melakukan adhesi dengan baik pada usus halus mencit Balb/c.



Gambar 3. Perlakuan CTB

(Biakan usus mencit diimunisasi peroral dengan CTB dan diinfeksi *Salmonella typhi* pada BSA)

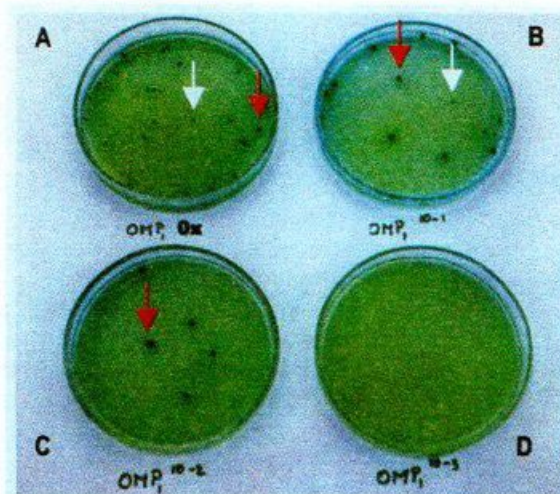
Keterangan Gambar :

A : pengenceran 0, B : pengenceran 10^{-1} , C : pengenceran 10^{-2} , D : pengenceran 10^{-3}

Tanda panah : *Proteus rettgeri*

Dari Gambar 3. tampak bahwa dengan perlakuan CTB (biakan usus mencit diimunisasi dengan CTB saja dan diinokulasi *Salmonella typhi* pada BSA) bakteri *Salmonella typhi* tetap tumbuh dengan baik pada semua pengenceran. Pada lempeng A (pengenceran 0), lempeng B (pengenceran 10^{-1}) dan lempeng C (pengenceran 10^{-2}) pertumbuhan *Salmonella typhi* sangat padat tak terhitung. Pada lempeng D pengenceran 10^{-3} koloni

Salmonella typhi tumbuh dengan baik. Pada lempeng A, B, C dan D tampak adanya pertumbuhan bakteri lain sebagai kontaminan ialah *Proteus rettgeri* (tanda panah). Dari hasil pengamatan ini menunjukkan bahwa imunisasi dengan CTB tidak membangkitkan respons imun yang dapat menghambat adhesi bakteri *Salmonella typhi* pada enterosit mencit Balb/c.



Gambar 4. Perlakuan (CTB + AdhO36)

(Biakan usus mencit yang diimunisasi peroral dengan (CTB + AdhO36) dan diinfeksi dengan *Salmonella typhi* pada BSA)

Keterangan Gambar :

A : pengenceran 0, B : pengenceran 10^{-1} , C : pengenceran 10^{-2} , D : pengenceran 10^{-3}

Tanda panah merah : *Enterobacter gergoviae*, tanda panah putih : *Salmonella typhi*

Dari Gambar 4. dapat diamati bahwa pada perlakuan AdhO36 (biakan usus mencit yang diimunisasi peroral dengan (CTB + AdhO36) dan diinfeksi dengan *Salmonella typhi* pada

BSA) tampak adanya pertumbuhan bakteri pada lempeng A, B dan C sedangkan lempeng D sama sekali tidak ada pertumbuhan bakteri. Pada lempeng A dan B terdapat pertumbuhan koloni

bakteri *Salmonella typhi* (tanda panah putih) dan *Enterobacter* *gergovieae* (tanda panah merah). Pada lempeng C tidak terdapat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*, hanya *Enterobacter*

gergovieae. Walaupun pada lempeng A dan B terdapat pertumbuhan koloni *Salmonella typhi*, namun jumlahnya sangat sedikit dibandingkan kontrol positif atau perlakuan CTB.

2. Analisis Statistik

Tabel 1. Uji Hambat Adhesi In Vivo

Replikasi	Pengamatan	Jumlah Koloni pada Medium BSA per 1 cc Homogenat Usus			
		K (-)	K (+)	CTB	AdhO36*
1	1	0	3,316,793	3,309,226	162
	2	0	3,589,533	3,124,386	0
	3	0	2,924,366	3,468,340	12
	rerata	0	3,276,897	3,300,650	58
2	1	0	3,075,873	796,986	112
	2	0	3,122,786	455,466	112
	3	0	2,963,740	995,506	0
	rerata	0	3,054,133	749,319	74
3	1	0	1,769,793	3,939,540	0
	2	0	1,850,100	3,803,166	62
	3	0	2,625,893	2,863,760	0
	rerata	0	2,081,928	3,535,488	20
4	1	0	4,500	79,166	137
	2	0	3,333	89,000	287
	3	0	5,333	53,166	150
	rerata	0	4,388	73,777	191

*) AdhO36 = AdhO36 + CTB

Percobaan dilaksanakan dengan menggunakan *Completely Randomized Design*, dengan 4 ulangan dan pada setiap unit percobaan dilakukan pengamatan 3 kali (triplo). Angka yang terdapat pada Tabel 1. merupakan angka akhir dari hasil perhitungan jumlah koloni per lempeng agar, per ml homogenat usus. Terdapat angka 0 pada perlakuan Kontrol negatif pada semua pengulangan, yang menunjukkan sama sekali tidak ada pertumbuhan koloni *Salmonella typhi*. Sebaliknya pada perlakuan Kontrol positif dan perlakuan CTB terdapat banyak angka bilangan juta, yang menunjukkan bahwa banyak sekali pertumbuhan koloni *Salmonella typhi*. Pada perlakuan (CTB + AdhO36) juga terdapat angka 0 sampai yang tertinggi bilangan ratusan, hal ini menunjukkan bahwa sedikit sekali pertumbuhan koloni *Salmonella typhi*.

Oleh karena dalam hasil pengamatan pada Tabel 1. tersebut terdapat nilai yang sangat besar dan juga terdapat nilai 0, maka sebelum melakukan Anova terlebih dahulu dilakukan

transformasi $\log(X + 1)$ terhadap data jumlah koloni. Dari hasil Anova terhadap $\log(X + 1)$ jumlah koloni, terdapat perbedaan yang sangat bermakna pengaruh perlakuan terhadap jumlah koloni ($p=0.001$). Pemisahan pengaruh perlakuan dengan menggunakan ortogonal kontras terhadap jumlah koloni menunjukkan bahwa:

- Terdapat perbedaan yang sangat bermakna terhadap jumlah koloni antara Kontrol (+) dibanding Kontrol (-) ($p=0.001$)
- Terdapat perbedaan yang sangat bermakna di antara 4 perlakuan yang dicoba ($p=0.001$).
- Terdapat perbedaan yang sangat bermakna antara perlakuan CTB dengan AdhO36 ($p=0.001$).

Hasil Tukey's test disajikan pada tabel dibawah ini :

Tabel 2. Hasil Tukey's test

Perlakuan	Rerata Asli	Rerata Log(X + 1)
Kontrol (+)	2,104,337	5.73805 a
CTB	1,914,809	5.94321 a
AdhO36	86	1.33416 b
Kontrol (-)	0	0 c

Nilai rerata X yang didampingi huruf sama berarti tidak berbeda bermakna dengan $p=0.05$ dan nilai HSD 5% sebesar 0.761

Hasil Tukey's test mendukung Anova, dimana perlakuan kontrol (+) dengan perlakuan CTB tidak berbeda bermakna. Perlakuan kontrol (+) dan CTB berbeda bermakna dengan perlakuan CTB+AdhO36. dan perlakuan kontrol (-) berbeda bermakna dengan perlakuan yang lain.

Dari percobaan ini menunjukkan bahwa protein AdhO36 adalah imunogen mukosal yang poten dan mampu membangkitkan respons imun yang dapat menghambat adhesi bakteri *Salmonella typhi* pada usus halus mencit Balb/c, sehingga tahap awal proses infeksi dapat dicegah.

PEMBAHASAN

Guna menghindari *oral tolerance* dimana sistem imun mukosal menjadi tidak responsif terhadap imunogen oral, maka protein adhesin-O36 (AdhO36) harus dikonyugasikan dengan ajuvan, dalam hal ini adalah *cholera toxin subunit-B* (CTB). Selain itu digunakannya CTB sebagai ajuvan sekaligus sebagai *carrier* pada percobaan ini antara lain karena (1) CTB merupakan salah satu ajuvan yang poten yang sering digunakan, (2) CTB bisa diterima baik oleh traktus gastro intestinalis, dan stabil pada suasana asam, (3) CTB bertanggung jawab pada pengikatan dengan reseptor G_{M1} yang terdapat pada semua sel berinti termasuk epitel usus, dan (4) CTB tidak toksik, terutama apabila vaksin ini akan dicobakan kepada manusia (18).

Pada uji protektivitas ini yang bisa diamati berupa hasil hambatan adhesi *in vivo* dengan menghitung jumlah koloni *Salmonella typhi* yang tumbuh dari biakan usus mencit. Sebagai media perbenihan digunakan *bismuth sulfite agar* (BSA), karena BSA adalah media selektif untuk mengisolasi *Salmonella typhi*. Dalam BSA terkandung *bismuth sulfite* dan *brilliant green* yang dapat menghambat pertumbuhan kebanyakan bakteri komensal Gram negatif maupun Gram positif, serta *ferrous sulfate* sebagai indikator apabila bakteri memproduksi H_2S (19).

Walaupun BSA disebutkan sebagai media selektif untuk *Salmonella typhi*, namun pada percobaan ini masih bisa ditumbuhi oleh bakteri lain seperti *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus rettgeri* dan *Enterobacter gergoviae*. Tetapi pertumbuhan bakteri ikutan tersebut tidak banyak bila dibandingkan dengan *Salmonella typhi* yang tumbuh, seperti terlihat pada perlakuan kontrol positif dan perlakuan CTB (lihat Gambar 2. dan Gambar 3). Pada kontrol negatif (Gambar 1) bakteri ikutan yang tumbuh adalah *Klebsiella pneumoniae*, pada kontrol positif (Gambar 2) *Proteus rettgeri*, pada perlakuan CTB (Gambar 3) *Proteus rettgeri*, dan pada perlakuan AdhO36 (Gambar 4) juga

Enterobacter gergoviae. Untuk membedakan antara bakteri ikutan dengan bakteri *Salmonella typhi* tidak sulit, karena di samping jumlah bakteri ikutan tersebut sedikit, bakteri *Salmonella typhi* memiliki karakteristik koloni tersendiri yang mudah dibedakan dengan bakteri lain. Apakah bakteri ikutan tersebut merupakan bakteri kontaminan ataukah flora normal usus mencit Balb/c, tidak jelas dan hal ini tidak dibahas lebih lanjut pada penelitian ini.

Dilihat pada Tabel 1 tampak bahwa pada perlakuan kontrol negatif sama sekali tidak ada pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*. Hal ini menunjukkan bahwa pada usus mencit Balb/c tidak ada *Salmonella typhi* sebagai flora normal.

Pada perlakuan kontrol positif, mencit diinokulasi dengan *Salmonella typhi* tanpa imunisasi, tampak bahwa dari hasil biakan usus mencit Balb/c, bakteri *Salmonella typhi* tumbuh dengan baik yang ditunjukkan dengan pertumbuhan koloni yang sangat banyak pada media BSA. Dengan demikian pada percobaan *in vivo* ini ditunjukkan bahwa, proses adhesi bakteri *Salmonella typhi* pada enterosit mencit Balb/c berlangsung dengan baik. Dari perlakuan kontrol positif ini tampak pada pengulangan 4, koloni *Salmonella typhi* yang tumbuh sangat sedikit dibandingkan pengulangan yang lain. Hal ini terjadi mungkin karena adanya banyak faktor dalam usus yang menghambat perlekatan *Salmonella typhi*, diantaranya adalah lingkungan asam dari lambung, terperangkap dalam mukus yang tebal, adanya lysozyme dan komponen antimikroba yang lain dalam lumen intestinal serta kompetisi dengan flora normal usus mencit (20). Mungkin juga karena memang inokulum *Salmonella typhi* yang masuk jumlahnya sedikit.

Pada perlakuan CTB pertumbuhan *Salmonella typhi* sangat padat pada BSA, hanya pada pengenceran 10^{-3} koloni baru bisa terhitung (Gambar 3). Dari analisis statistik Tukey's test (Beda Nyata Jujur), perlakuan CTB tidak berbeda bermakna dengan perlakuan Kontrol positif (Tabel 3). CTB sebagai bagian dari *cholera toxin* (CT), selain berperan sebagai *mucosal adjuvant* juga bersifat imunogenik (18). Dalam percobaan ini ditunjukkan bahwa respons imun mukosal yang ditimbulkan oleh CTB ternyata tidak berpengaruh terhadap proses adhesi *Salmonella typhi* pada enterosit mencit.

Pada perlakuan AdhO36 tampak bahwa pertumbuhan *Salmonella typhi* pada BSA sedikit sekali, dan pada Anova (analisis ragam) (Tabel 2.) serta Tukey's test (Beda Nyata Jujur) Tabel 3. menunjukkan bahwa perlakuan tersebut berbeda sangat bermakna terhadap perlakuan Kontrol positif dan perlakuan CTB ($p=0.001$). Hal ini membuktikan bahwa protein AdhO36 adalah benar merupakan imunogen mukosal poten yang mampu membangkitkan respons imun mukosal yang dapat menghambat proses adhesi sehingga tahap awal infeksi *Salmonella typhi* dapat dicegah. Namun perlu penelitian lebih lanjut mengenai produksi *secretory IgA* (S-IgA) akibat induksi protein AdhO36 per oral, karena S-IgA adalah antibodi mukosal yang berperan pada hambatan adhesi dan kolonisasi mikroba pada mukosa usus halus (21).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dan pembahasan tersebut diatas dapat disimpulkan bahwa :

1. Protein adhesin-O36 (AdhO36) adalah imunogen mukosal yang poten, karena telah terbukti bahwa pada pemberian per

oral mampu menghambat proses adhesi dan kolonisasi bakteri *Salmonella typhi* pada mukosa usus halus mencit Balb/c; yang ditunjukkan dengan pertumbuhan yang sangat minimal pada medium BSA.

2. Meskipun medium BSA dikatakan medium yang *highly selective* untuk bakteri *Salmonella typhi* ternyata bakteri lain masih bisa tumbuh, walaupun sangat sedikit.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui produksi *secretory IgA* (S-IgA) akibat induksi protein AdhO36 per oral, karena S-IgA adalah antibodi mukosal yang berperan pada hambatan proses adhesi dan kolonisasi mikroba pada mukosa usus halus.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Pang, T., Koh, C.L., Puthucherry, S.D., Typhoid Fever: Strategies for the 90's. Singapore: World Scientific. 1992.
2. Murphy, J.R., Grez, L., Immunogenicity of *Salmonella typhi* Ty21a Vaccine For Young Children. *Infect Immun.* 1991; 59: 4291-4293
3. Nataro, J.P. and Levine, M.M., Enteric Bacterial Vaccine, in: Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J.R., Mucosal, Immunology 2nd ed, Academic Press. 1999: 851 - 865.
4. Salyers, A.A. and Whitt, D.D., Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. Washington DC: American Society for Microbiology Press. 1994: 30-41, 229-241.
5. Todar, K., Bacteriology 330 Lecture Topics: Colonization and Invasion. University of Wisconsin Department of Bacteriology. 1997.
6. Salyers, A.A. and Whitt, D.D., Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach, 2nd ed. Washington DC; American Society for Microbiology Press. 2002: 93-94, 115-126
7. Henahan, S., *E.coli* vaccine; Science Update. 1997.
8. Michalek, Suzanne, M., Childers, Noel, K., Dertzbaugh, Mark, T., Vaccination Strategies For Mucosal Pathogens, in Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1995: 269-301.
9. Santoso, S., Winarsih, S., Sumarno., Protein Hemagglutinin 36 kDa OMP *Salmonella typhi*, Majalah Kedokteran UNIBRAW. 1995: 15 (3): 87-93.
10. Finegold, S.M., Barron, E.J., Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 7th ed. CV Mosby Company, USA. 1986: 682, 862, 863, 879.
11. 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.
12. 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.
13. Dhaenens, L., Szczepara, F., Husson, M.O., Identification, Characterization and Immunogenicity of Lactoferrin-Binding Protein from *Helicobacter pylori*, *Infect Immun.* 1997: 65 (5): 514-518.
14. Laemli, U.K., Cleavage of Structural Protein During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature.* 1970: 227: 680-686.
15. Liang, X., Lamm, M.E., Nedrud, J.G., Cholera Toxin as Mucosal Adjuvant - Glutaraldehyde Treatment Dissociates Adjuvanticity From Toxicity., *The Journal of Immunology, American Association of Immunologist, USA.* 1989: 143 (2) : 484-490.
16. Velden, A.W.M., Baumler, A.J., Tsolis, R.M., Heffron, F., Multiple Fimbrial Adhesins Are Required for Full Virulence of *Salmonella typhimurium* in Mice, *Infect Immun.* 1998: 66 (6): 2803-2808.
17. Goto, T., Nishizono, A., Fujioka, T., Ikewaki, J., Mifune, K., Nasu, M., Local Secretory Immunoglobulin A and Postimmunization Gastritis Correlate with Protection against *Helicobacter pylori* Infection after Oral Vaccination of Mice, *Infect Immun.* 1999: 67 (5): 2531-2539.
18. Elson, C.O., Cholera Toxin As A Mucosal Adjuvant, in Ogra PL, Lamm ME, Bienenstock J, Mestecky J, Strober W, McGhee JR, Mucosal Vaccine, Academic Press. 1996: 59 - 72.
19. Chapin, K.C. and Murray, P.R., Media, in Manual of Clinical Microbiology 7th ed, ASM, Washington DC 2000. 1999: 1687- 1707.
20. Brumell, J.H. and Finlay, B.B., Bacterial Adherence, Colonization, and Invasion of Mucosal Surfaces, in Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens 3rd ed, ASM Press, Washington, D.C. 2000: 3 - 17.
21. Abbas, Abul, K., Lichtman, Andrew, H., Pober, Jordan, S., Cellular and Molecular Immunology, 4th ed. W.B. Saunders Company. 2000: 199, 331 - 333.