

HAEMAGGLUTINATION ACTIVITY OF *Salmonella typhi* FLAGELLIN PROTEIN BASED ON ABO BLOOD GROUP

Ragil Saptaningtyas¹, Sri Darmawati², Sri Sinto Dewi³

^{1,2,3.} Health and Nursing Faculty Muhammadiyah University of Semarang
Jl. Kedungmundu Raya No. 18 Semarang

1. ragiltyastyus@yahoo.com
2. ciciekdarma@yahoo.com
3. sintomun@yahoo.com

ABSTRACT

Salmonella typhi is a negative basil Gram bacterium that causes typhoid fever. Flagel of *S. typhi* contain proteins, as locomotor and it can help bacteria to attach on host cells. Haemagglutinin protein is protein that can agglutinate erythrocytes. The goal of this research is to analyze *S. typhi* flagellin proteins haemagglutination activity Based on ABO blood group. Flagellin proteins isolation method of modified Alexan method (2009) and haemagglutination test method of Finkeltein and Hanne method (1982). Haemagglutination result of ABO blood type show that SLT-1 *S. typhi* flagellin proteins can't agglutinate human erythrocytes A, B, and O, but it can agglutinate human erythrocytes until 8 times dilution of AB blood type from 50 µg/µl concentration in 50 µl. BA 07.4 *S. typhi* flagellin proteins can agglutinate human erythrocytes of A blood type until 16 times dilution, 8 times dilution of AB blood type, 4 times dilution of O blood type, and it can't agglutinate human erythrocytes B blood type.

Keywords: *Salmonella typhi*, Flagellin Proteins, Haemagglutination, Erythrocytes of ABO System.

PENDAHULUAN

Salmonella typhi (*S. typhi*) adalah bakteri bentuk batang Gram negatif penyebab demam tifoid yang termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae*. Demam tifoid adalah penyakit infeksi yang bersifat endemis dan merupakan masalah kesehatan dunia termasuk di Indonesia (Darmawati, 2009). Rahman (2011) mengatakan bahwa demam tifoid menyebabkan 1,6% kematian penduduk Indonesia untuk semua umur pada tahun 2007. Bakteri *S. typhi* masuk melalui mulut bersama makanan atau minuman yang telah terkontaminasi oleh *S. typhi*. Bakteri *S. typhi* yang berhasil mencapai usus halus dan masuk ke dalam tubuh dapat menimbulkan demam tifoid (Darmawati *et al.*, 2010).

Bakteri *S. typhi* merupakan salah satu bakteri yang memiliki flagel, flagel dimiliki oleh sebagian besar bakteri.

Flagel terdiri dari tiga bagian, yaitu *basal body*, *hook*, dan *filament* yang tersusun atas sub unit protein flagellin. Flagel merupakan struktur penting yang berperan dalam patogenesis, promosi adhesi sel, dan invasi (Oliveira *et al.*, 2011).

Flagel pada bakteri *S. typhi* berfungsi sebagai alat gerak dan dapat membantu bakteri untuk masuk ke dalam sel *host* (Hatta *et al.*, 2011), merupakan salah satu faktor virulensi dari bakteri patogen melalui adhesi dan invasi pada sel *host*. Flagel mampu merangsang respon imun, seperti merangsang terbentuknya interleukin 8 (IL-8) (Oliveira *et al.*, 2011). Flagellin juga mampu menstimulasi sistem imun adaptif, sehingga menghasilkan antibodi anti flagellin (Alexan *et al.*, 2009).

Menurut Hidayati (2010), adhesi bakteri bentuk batang Gram negatif diperankan oleh protein hemagglutinin dengan berat molekul tertentu yang dapat

mengaglutinasi eritrosit mamalia. Eritrosit merupakan bagian dari sel darah yang berbentuk cakram bikonkaf tak berinti dan fungsi utama eritrosit adalah membawa O₂ ke jaringan dan mengembalikan CO₂ dari jaringan ke paru-paru (Indrapraja, 2009). Permukaan eritrosit memiliki antigen tertentu, yaitu antigen A dan antigen B dimana ada tidaknya antigen tersebut dapat membedakan golongan darah berdasarkan sistem ABO (Hartanto, 2005).

Protein hemagglutinin merupakan molekul adhesin yang tersusun oleh lektin. Lektin mempunyai afinitas yang tinggi untuk berikatan dengan karbohidrat, sehingga hemagglutinasia dapat terjadi ketika lektin pada protein flagellin bereaksi dengan N-asetilglukosamin pada membran eritrosit (Mufida, 2009).

Tujuan penelitian ini untuk menganalisis aktivitas hemagglutinasia protein flagellin pada *S. typhi* terhadap eritrosit manusia berdasarkan sistem golongan darah ABO.

METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain mikroplate U, mikropipet, sentrifuge 4⁰ C, dan shaker. Bahan yang digunakan yaitu media *Mac Concey* (Oxoid), *Brain Heart Infusion* cair (Oxoid), *Phosphate Buffer Saline* pH 7, dan eritrosit 1%.

Sampel

Sampel bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat *S. typhi* dari penderita demam tifoid di Puskesmas Bangetayu (BA 07.4) Semarang dan Salatiga (SLT-1).

Prosedur

Penelitian ini dilakukan dengan 3 tahapan, yaitu : kultivasi bakteri dengan media BHI cair, isolasi protein flagellin, dan uji hemagglutinasia.

1. Kultivasi Bakteri

Kultivasi bakteri menggunakan media BHI cair. Satu koloni pada media MC ditanam pada 50 mL BHI cair sebagai

starter kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37⁰C dengan agitasi. Setelah itu kultur dimasukkan ke dalam 500 mL BHI cair dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37⁰C dengan agitasi, kultur siap dipanen (Alexan *et al.*, 2009).

2. Isolasi Protein Flagellin

Kultur bakteri dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge steril sebanyak 500 mL, kemudian disentrifuge 3000 rpm 4⁰C selama 35 menit. Setelah itu supernatan dibuang, pellet ditambah dengan 5 mL NaCl fisiologis kemudian disuspensikan. Suspensi ditambahkan HCl 1 M sampai mencapai pH 2, kemudian distirer selama 30 menit pada suhu ruang. Selanjutnya suspensi disentrifuge 3000 rpm 4⁰C selama 20 menit, supernatan adalah protein flagellin. Protein flagellin ditambah NaOH 1 M sampai mencapai pH 7. Konsentrasi protein flagellin diukur dengan Biorad assay pada panjang gelombang 595 nm menggunakan spektrofotometer. Protein flagellin difreeze dryer dan siap digunakan untuk uji hemagglutinasia (Alexan *et al.*, 2009).

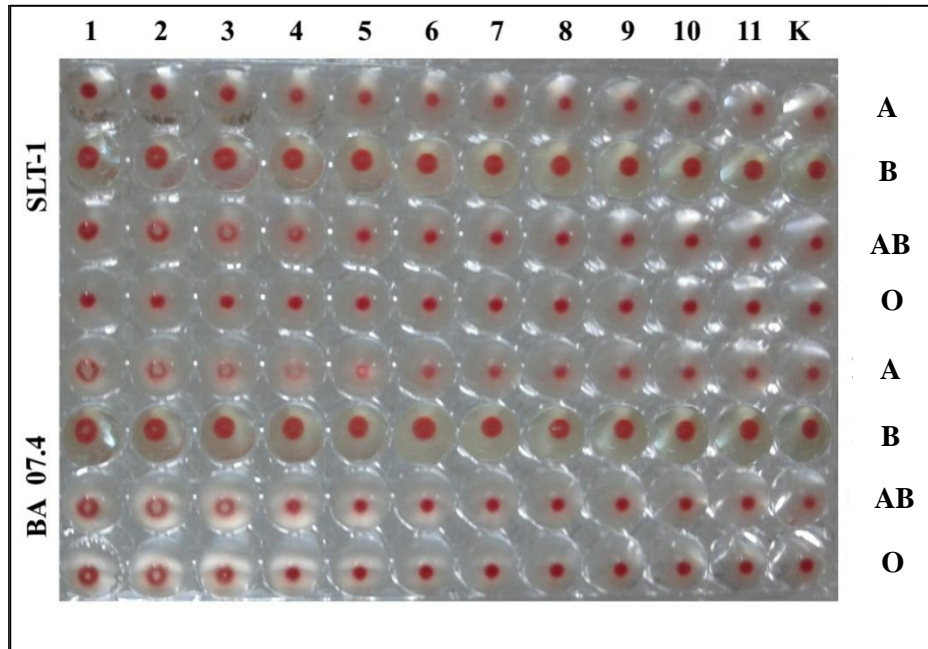
3. Uji Hemagglutinasia

Sampel eritrosit manusia golongan darah A, B, AB, dan O dicuci dengan PBS pH 7 sebanyak 3 kali kemudian diencerkan sampai didapatkan konsentrasi eritrosit 1%. Sumur pertama pada mikroplate diisi dengan 50 µL protein flagellin *S. typhi* BA 07.4 yang diencerkan dengan 50 µL PBS pH 7 sehingga konsentrasi menjadi 1:2. Sumur ke-2 sampai sumur ke-11 dilakukan pengenceran serial dengan menambahkan 50 µL PBS pH 7 kemudian dihomogenkan. Setelah itu, 50 µL eritrosit manusia golongan darah A dengan konsentrasi 1% ditambahkan pada sumur ke-1 sampai sumur ke-11 sebagai sampel dan sumur ke-12 sebagai kontrol negatif. Selanjutnya mikroplate digoyangkan perlahan dengan *shaker* selama 1 menit, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam dan amati terjadinya hemagglutinasia. Prosedur yang sama dilakukan untuk uji hemagglutinasia menggunakan golongan darah B, AB, dan

O, begitu juga untuk uji hemaglutinasi pada *S. typhi* SLT-1 (Noorhamdani, 2004).

HASIL

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari isolat *S.typhi* yang diambil dari penderita demam tifoid di Bangetayu Semarang dan Salatiga hasil isolasi kultur darah widal positif (Darmawati, 2011). Protein flagellin diisolasi dengan metode Alexan (2009) yang dimodifikasi. Uji hemaglutinasi terhadap sel darah merah manusia golongan A, B, AB, dan O (1%) oleh protein flagellin sebanyak 50 µl (50µg/µl). Hasil uji hemaglutinasi menunjukkan bahwa protein flagellin *S. typhi* SLT-1 tidak mampu mengaglutinasikan eritrosit manusia pada golongan darah A, B, dan O, serta mampu mengaglutinasikan eritrosit manusia golongan darah AB sampai pengenceran 8 kali (titer 1/8) sedangkan sampel protein flagellin *S. typhi* BA 07.4 mampu mengaglutinasikan eritrosit manusia golongan darah A sampai pengenceran 16 kali (titer 1/16), AB sampai pengenceran 8 kali (titer 1/8), O sampai pengenceran 4 kali (titer 1/4), dan tidak mampu mengaglutinasikan eritrosit manusia golongan darah B.



Gambar 1. Hasil Uji Hemaglutinasi Protein Flagellin *S. typhi* SLT-1 dan *S. typhi* BA 07.4 terhadap Golongan Darah Sistem ABO.

Tabel 1. Interpretasi Hasil Uji Hemaglutinasi

<i>S. typhi</i>	Golongan Darah	Kisaran titer	Aktivitas Hemaglutinasi	Keterangan
SLT-1	A	0	0	Negatif
	B	0	0	Negatif
	AB	1/8	8 HA	Positif
	O	0	0	Negatif
BA 07.4	A	1/16	16 HA	Positif
	B	0	0	Negatif
	AB	1/8	8 HA	Positif
	O	1/4	4 HA	Positif

PEMBAHASAN

Berdasarkan Tabel 1, dapat diketahui bahwa protein flagellin *S. typhi* SLT-1 tidak mampu mengaglutinasikan eritrosit manusia golongan darah A, sedangkan protein flagellin *S. typhi* BA 07.4 mampu mengaglutinasikan eritrosit manusia golongan darah A sampai pengenceran 16 kali (titer 1/16). Hal ini terjadi karena pada membran eritrosit manusia golongan darah A mempunyai karbohidrat yang

strukturnya tidak cocok dengan struktur protein flagellin *S. typhi* SLT-1, sedangkan struktur karbohidrat pada membran eritrosit manusia golongan darah A cocok dengan struktur protein flagellin *S. typhi* BA 07.4.

Protein flagellin *S. typhi* SLT-1 maupun BA 07.4 tidak mampu mengaglutinasikan eritrosit manusia golongan darah B. Membran eritrosit manusia golongan darah B mempunyai karbohidrat yang strukturnya tidak sesuai dengan reseptor dari protein flagellin *S.*

typhi SLT-1 maupun *S. typhi* BA 07.4 sehingga tidak terjadi reaksi yang menyebabkan aglutinasi.

Eritrosit manusia golongan darah AB mampu diaglutinasikan oleh protein flagellin *S. typhi* SLT-1 maupun *S. typhi* BA 07.4 sampai pengenceran 8 kali (titer 1/8). Struktur karbohidrat pada membran eritrosit manusia golongan darah AB sesuai dengan reseptor protein flagellin *S. typhi* SLT-1 dan *S. typhi* BA 07.4 sehingga terjadi reaksi seperti *lock and key* yang tampak secara makroskopis sebagai aglutinasi.

Protein flagellin *S. typhi* SLT-1 tidak mampu mengaglutinasikan eritrosit manusia golongan darah O, sedangkan protein flagellin *S. typhi* BA 07.4 mampu mengaglutinasikan eritrosit manusia golongan darah O sampai pengenceran 4 kali (titer 1/4). Reaksi aglutinasi yang terjadi disebabkan oleh ketidaksesuaian reseptor karbohidrat pada membran eritrosit manusia golongan darah O dengan protein flagellin *S. typhi* SLT-1, tetapi reseptor yang ada pada membran eritrosit manusia golongan darah O sesuai dengan struktur protein flagellin *S. typhi* BA 07.4 dan tampak sebagai reaksi aglutinasi.

Protein flagellin *S. typhi* SLT-1 tidak mampu mengaglutinasikan eritrosit manusia pada semua golongan darah karena ukuran flagellin gen *fliC* pada *S. typhi* SLT-1 lebih pendek dari *S. typhi* BA 07.4 yaitu 1267 bp. Tipe flagel dari *S. typhi* SLT-1 kurang motil dan kurang invasif, sehingga kurang optimal dalam mengaglutinasikan eritrosit (Darmawati & Prastiyanto., 2014).

Hasil hemaglutinasi positif oleh protein flagellin *S. typhi* BA 07.4 terhadap golongan darah A, AB, dan O yang ditunjukkan pada Tabel 1 terjadi karena pada membran eritrosit golongan darah

A, AB, dan O terdapat N-asetilglukosamin yang bereaksi dengan lektin pada protein flagellin sehingga terjadi aglutinasi yang dapat dilihat secara makroskopis (Anggraeni, 2014).

Semakin tinggi titer yang ditunjukkan dalam mengaglutinasikan eritrosit, semakin tinggi patogenitas dari *S. typhi* dalam menginfeksi sel *host*. Patogenitas *S. typhi* sangat dipengaruhi oleh tingkat motilitas *S. typhi* yang diperankan oleh flagel. Motilitas dan kualitas flagel yang tinggi akan meningkatkan kemampuan *S. typhi* dalam melakukan *adhesi* terhadap sel *host* dan semakin cepat menyebabkan infeksi (Abrar, 2009). Aglutinasi protein flagellin *S. typhi* BA 07.4 terhadap golongan darah A menunjukkan titer yang lebih tinggi dari golongan darah AB dan O, hal ini menunjukkan bahwa manusia dengan golongan darah A lebih rentan terinfeksi *S. typhi* BA 07.4 daripada manusia dengan golongan darah B, AB, maupun O.

Hasil uji hemaglutinasi dengan reaksi positif menunjukkan bahwa protein flagellin *S. typhi* BA 07.4 merupakan protein hemaglutinin yang mampu mengaglutinasikan eritrosit manusia golongan darah A, AB, dan O. Titer aglutinasi yang ditunjukkan sebanding dengan protein hemaglutinin yang terdapat pada protein flagellin *S. typhi* BA 07.4.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dari penelitian yang sudah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa sampel protein flagellin *S. typhi* SLT-1 tidak mampu mengaglutinasikan eritrosit manusia pada golongan darah A, B, dan O, tetapi mampu mengaglutinasikan eritrosit manusia golongan darah AB sampai pengenceran 8 kali (titer 1/8) dari

konsentrasi 50 µg/µl sebanyak 50 µl sedangkan sampel protein flagellin *S. typhi* BA 07.4 mampu mengaglutinasi eritrosit manusia golongan darah A sampai pengenceran 16 kali (titer 1/16), AB sampai pengenceran 8 kali (titer 1/8), O sampai pengenceran 4 kali (titer 1/4), dan tidak mampu mengaglutinasi eritrosit manusia golongan darah B.

KEPUSTAKAAN

- Abrar, M. 2009. *Peranan Hemaglutinin Escherichia coli dalam Proses Adhesi. Jurnal Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Lumpur*. Vol. 3 No. 1.
- Alexan, AF. S. H. Mohamed and A.M. Ibrahim. 2009. *Immune Response Elicited in Mice after Immunization with Flagellin from Salmonella enterica Serovar*. *Global Veterineria*. Vol 3 No. 6. ISSN: 1992-6197.
- Anggraeni, Desy. 2014. *Hubungan Antara Golongan Darah dengan Penyakit Tuberculosis (TB) di Balai Pengobatan Penyakit Paru-paru (BP4) Purwokerto*. Skripsi Program Sarjana Keperawatan Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Keperawatan Universitas Jendral Sudirman.
- Darmawati, S.. 2009. *Keanekaragaman Genetik Salmonella typhi*. *Jurnal Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang*. Vol. 2 No. 1. ISSN: 2085-0301.
- Darmawati, S., S. Anwar, W. T. Artama. 2010. *Analisis Molekuler Profil Protein Pili untuk Mengungkap Hubungan Similaritas 26 Strain Salmonella typhi Isolat Jawa*. *Prosiding Seminar Nasional Universitas Muhammadiyah Semarang*. ISBN : 978.979.704.883.9.
- Darmawati, S., M. Evy Prastiyanto. 2014. *Analisis Kekerabatan Salmonella Typhi Asal Jateng Dan Yogyakarta Berdasarkan Sekuens Gen Flagellin Flic*.
- Hanne LL and Finkelstein RA. *Characterization and Distribution of the Hemagglutinins Produced by Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, 1982; 36: 209-214.
- Hartanto, F. 2005. *Hubungan Golongan Darah O dengan Kejadian Syok pada Penderita Demam Berdarah Dengue*. Tesis Program Pendidikan Dokter Spesialis-1 Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
- Hatta, M. A.R. sultan, R. pastor and H.L. Smits. 2011. *New Flagellin Gene for Salmonella enteric serovar Typhi from The East Indonesian Archipelago*. *Am. Journal. Trop. Med. Hyg*. 84(3): 429-434
- Hidayati, D., 2010. *Identifikasi Molekul Pili Pseudomonas aeruginosa pada Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Culture*. *Jurnal of Experimental Life Science*. ISSN: 2087-2852.
- Indrapraja, O., 2009. *Efek Minyak Atsiri Bawang Putih (Allium sativum) dan Cabe Jawa (Piper retrofractum Vahl.) terhadap Jumlah Eritrosit pada Tikus yang diberi Diet Kuning Telur*. Skripsi Program Pendidikan Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
- Noorhamdani. 2004. *Aktivitas Hemaglutinasi Bakteri Acinetobacter baumannii yang Berasal dari Spesimen Klinik dan Lingkungan*. *Jurnal*

- Kedokteran Brawijaya*. Vol. 20
No. 2.
- Mufida, Diana Chusna, Candra Bumi,
dan Heni Fatmawati. 2009.
*Peran Protein Membran Luar
55 KDa Salmonella typhi Isolat
Jember sebagai Protein
Hemaglutinin dan Adhesin.
Jurnal Penelitian Hayati* Vol.
15 No. 11-16.
- Oliveira B.H., M. R. Silva, C. J. M.
Braga, L. M. Massis, L. C. S.
Ferreira, M. E. Sbrogio-Almeida
dan M. Takagi. 2011.
*Production Of Native Flagellin
From Salmonella Typhimurium
In A Bioreactor And
Purification By Tangential
Ultrafiltration. Brazillian
Journal of Engineering*. Vol. 28
No. 4, pp. 575 -584, October -
December, 2011. ISSN : 0104-
6632.
- Rachman, F., 2011. *Uji Diagnostik Tes
Serologi Widal dibandingkan
dengan Kultur Darah sebagai
Baku Emas untuk Diagnosis
Demam Tifoid pada Anak di
RSUP Dr. Kariadi Semarang.*
Skripsi Program Sarjana
Kedokteran Fakultas
Kedokteran Universitas
Diponegoro Semarang.