

EKSPRESI PROTEIN ADHF36 PADA PERUBAHAN OSMOLARITAS SERTA pH LINGKUNGAN HIDUP *SALMONELLA TYPHI* SECARA *IN VITRO*

Expression of AdhF36 Protein on Change Osmolarity and pH of Salmonella Typhi in Environmental

I Nengah Kundera¹, Sanarto Santoso², Aulanni'am³, dan Sri Winarsih²

¹Program Studi Pendidikan Biologi Universitas Tadulako, Palu

²Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

³Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang

E-mail: citharade@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengamati stabilitas ekspresi protein AdhF36 *Salmonella typhi* pada perlakuan osmolaritas dan pH dengan metode eksperimen laboratorium-eksploratif. Hasil penelitian ini menunjukkan perbedaan ekspresi protein AdhF36 *Salmonella typhi* pada perlakuan osmolaritas dengan pH. Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa pita protein AdhF36 tetap terekspresi pada perlakuan osmolaritas 50-350 mM, sebaliknya pita protein ini tidak terdeteksi pada perlakuan pH 4,5-6,0. Hal ini didukung oleh hasil uji *Western Blot* yang berhasil mendeteksi protein AdhF36 hanya pada perlakuan osmolaritas. Hasil ini membuktikan bahwa *Salmonella typhi* lebih toleran terhadap perubahan osmolaritas dibandingkan dengan pH.

Kata kunci: *Salmonella typhi*, protein AdhF36

ABSTRACT

This study aimed to observe the stability of AdhF36 protein expression of *Salmonella typhi* in osmolarity and pH treatment using exploratory laboratory experiment methods. The results of this research showed that AdhF36 protein expression of *Salmonella typhi* was different to osmolarity and pH treatments. SDS-PAGE result showed that the AdhF36 protein band was remain expressed at 50-350 mM in osmolarity treatment, whereas this protein band was not detected in the pH 4.0-6.0 treatments. Western Blot test was successfully detect the AdhF36 protein in osmolarity treatment, thus proved that *Salmonella typhi* was more tolerant to osmolarity changes compared to pH.

Key words: *Salmonella typhi*, AdhF36 protein, osmolarity, pH

PENDAHULUAN

Salmonella typhi merupakan patogen fakultatif intraseluler yang memerlukan faktor virulensi untuk tetap hidup di dalam sel agar berhasil berkolonisasi dan bereplikasi masuk ke dalam jaringan (Cheminay *et al.*, 2005). Salah satu faktor virulensi yang dimiliki *Salmonella typhi* adalah villi atau *fimbriae*. *Fimbriae* merupakan protein polimer permukaan sel bakteri sebagai mediator penting interaksi bakteri terhadap hospes dan *survive* pada lingkungan, motilitas, kolonisasi serta invasi pada sel hospes (Burrows, 2005). Struktur filamen *fimbriae* pada permukaan sel bakteri sebagian besar terbentuk dari subunit pengulangan protein tunggal melalui ikatan non kovalen. *Fimbriae* mengikat satu adhesin yang berfungsi berikatan dengan reseptor seluler pada hospes, dan umumnya terdapat pada ujung dari struktur pili (Starks *et al.*, 2006). *Fimbriae* tersusun dari subunit protein FimA dan ujung kecil *fibrillae* (*small-tip fibrillae*) yang terdiri atas protein FimF, FimG, dan adhesin FimH (Rosen *et al.*, 2008). Protein FimH merupakan elemen pengenalan terhadap reseptor dari *fimbriae type-1* (Nymu, 2008). Gen penting untuk produksi *fimbriae type-1* disandi oleh klaster gen FimA, FimI, FimC, FimD, FimF, FimG, dan FimH sedangkan *Chaperon* dan protein *usher*, FimC, FimD dalam sistem pili tipe-1, keduanya mutlak diperlukan untuk biogenesis terbentuknya vilus. Bila

terjadi mutasi ke dua gen ini tidak akan terbentuk pili bakteri (Barnhart *et al.*, 2003). Analisis sekuensing DNA pada lokus ini terbukti mengandung tiga gen yaitu FimF, FimG, dan FimH.

Pada penelitian sebelumnya Santoso (2002) telah melaporkan bahwa *Salmonella typhi* isolat Malang memiliki *adhesin fimbria* yang mirip dengan protein *adhesin fimbriae type-1 Salmonella typhi*, selanjutnya diberi nama AdhF36. Protein AdhF36 merupakan protein hemaglutinin, dan berdasarkan hasil SDS-PAGE serta perhitungan berat molekulnya, protein tersebut memiliki BM sekitar 36 kDa. Seperti telah disebutkan di atas, bahwa kolonisasi bakteri pada jaringan hospes diperantarai oleh adhesin, yang bertanggung jawab untuk mengenali reseptor khusus pada sel hospes. Reseptor ini biasanya berupa karbohidrat spesifik atau residu peptida pada permukaan sel eukariotik, sedangkan adhesin bakteri merupakan komponen makromolekul yang terdapat pada permukaan sel bakteri. Kemampuan virulensi *Salmonella typhi* sangat terkait dengan stabilitas keberadaan protein adhesin pada permukaan sel bakteri. Oleh karena itu diperlukan multifaktor dalam mengontrol ekspresi gen virulensi dan variasi saat terjadi regulasi (Rhen dan Dorman, 2005).

Kemampuan *Salmonella typhi* melewati masa transisi dari respon dinamis hospes pada saat masuk ke dalam tubuh manusia seperti hiperosmolaritas, pH

rendah (*acidic stress*), garam empedu, dan respon imun lainnya, merupakan bentuk strategi bakteri untuk bertahan pada lingkungan hospes (Bader *et al.*, 2003). Menurut Bucarey *et al.* (2005), bahwa peningkatan virulensi *Salmonella typhi* akan terjadi bila berada pada kondisi lingkungan oksigen rendah, osmolaritas tinggi dan pH rendah, walaupun mekanismenya belum jelas. Namun telah diketahui bahwa gen FimYZ memainkan peranan penting dalam mengontrol patogenesis *Salmonella typhi* terhadap perubahan kondisi lingkungan hidupnya. Suatu sinyal lingkungan akan mampu mengaktifkan dan menonaktifkan gen FimYZ. Aktivasi gen FimYZ akan memandu ekspresi *fimbriae type-1* dan fenotip adhesi *Salmonella* (Baxter dan Jones, 2005).

Martinez dan Baquero (2002) menjelaskan bahwa, perubahan lingkungan hidup *Salmonella typhi* akan berpengaruh pada konsekuensi fungsi biologis bakteri pada habitat baru, yang mungkin disebabkan oleh adanya penolakan selektif (*counter selected*). Hal ini bisa terjadi karena adanya perbedaan kehidupan bakteri sebelum dan setelah memasuki hospes, sehingga dibutuhkan energi atau penataan gen baru. Berdasarkan pernyataan tersebut perlu dikaji mengenai ekspresi protein AdhF36 pada perubahan osmolaritas dan pH lingkungan hidup *Salmonella typhi* secara *in vitro* terkait dengan sifat virulensi serta kajian kandidat vaksin berbasis molekul adhesin pada demam tipoid.

MATERI DAN METODE

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimen laboratorium bersifat eksploratif. Bahan untuk isolasi protein AdhF36 meliputi, biakan *Salmonella typhi*, media SSA, MacConkey, BSA, BHI, TCG, dan TSA. Bahan gel untuk SDS-PAGE, *staining solution*, protein marker Sigma (BM 6,5-66 kDa), *washing solution*, reagen Biuret, larutan NaCl, dan HCl 2N. Bahan dan alat untuk uji *Western Blot*, *Dot Blot*, akuades steril (Bishop *et al.*, 2008). Bahan dan alat untuk pengamatan sel bakteri pada *scanning electron microscope* (SEM).

Perlakuan *Salmonella typhi* Terhadap Perubahan Osmolaritas dan pH

Biakan bakteri *Salmonella typhi* yang telah ditumbuhkan pada medium cair *brain heart infusion broth* (BHI) dan telah dikondisikan pada konsentrasi NaCl secara berturut-turut (50, 150, 250, dan 350 mM), pH 7,0. Inkubasi pada suhu 37° C selama 120 menit sambil di shaker. Biakan tersebut kemudian dipindahkan pada medium agar miring TCG, inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam sedangkan untuk perlakuan pH dikondisikan dengan konsentrasi pH 4,5; 5,0; 5,5; dan 6,0 (Payne *et al.*, 2007).

Isolasi/Pemisahan *Fimbriae* dari Sel *Salmonella typhi*

Sebanyak 200 ml biakan *Salmonella typhi* yang telah diberi perlakuan dengan perubahan konsentrasi osmolaritas dan pH pada medium *biphasic* yang terdiri

atas medium cair BHI, medium agar miring TCG, dan telah diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam (Hernandez-Lucas *et al.*, 2008). Biakan ini ditambahkan 6 g *trichloro acetic acid* (TCA) sehingga konsentrasinya 3%. Sentrifus dingin pada suhu 4° C dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Bagian endapan disuspensi dengan PBS pH 7,4 (secukupnya). Melakukan pemotongan *fimbriae* menggunakan alat *omni-mixer* modifikasi pada kecepatan 6000 rpm, pada suhu 4° C selama 30 detik (Sumarno, 2000). Hasil potongan *fimbriae* disentrifus dingin 4° C, pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Filtrat dipisahkan (mengandung fraksi *fimbriae*) dan endapan disuspensi lagi dengan PBS pH 7,4 secukupnya. Proses pemotongan *fimbriae* diulangi beberapa kali guna mendapatkan perbedaan fraksi *fimbriae* dengan sel bakteri.

Gel Elektroforesis (SDS-PAGE), *Western Blot* dan *Dot Blot*

Proses elektroforesis (SDS-PAGE) ekspresi protein AdhF36 *Salmonella Typhi* menggunakan metoda standar oleh Laemmli (1970). Selanjutnya berat molekul ditentukan dengan bantuan protein standar sebagai marker dengan menghitung *Retardation factor* (*Rf*). Untuk konfirmasi keberadaan protein AdhF36 ini dilakukan uji *Western blot* melalui reaksi silang dengan antibodi poliklonal AdhO36. Selanjutnya untuk menguatkan hasil deteksi protein AdhF36 ini dilakukan uji *Dot Blot* dengan menggunakan antibodi poliklonal yang sama.

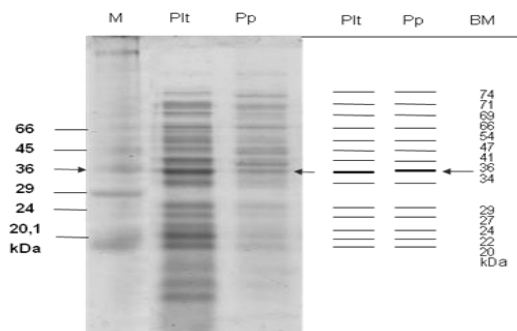
Pengamatan Morfologi Bakteri dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM)

Pengamatan perubahan morfologi sel *Salmonella Typhi* setelah perlakuan osmolaritas, pH, dan pasca pemotongan pili maka dilakukan pemeriksaan SEM.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi Protein AdhF36 *Salmonella typhi*-8873

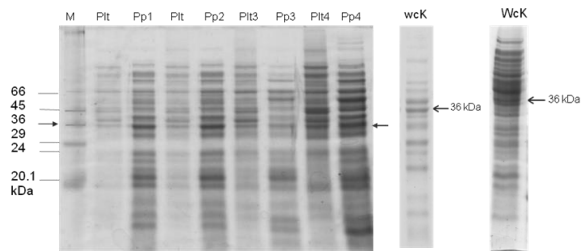
Hasil isolasi dan SDS-PAGE protein pili *Salmonella Typhi*-8873 yang digunakan sebagai sampel penelitian dapat dilihat pita proteinnya pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil SDS-PAGE protein AdhF36 *Salmonella typhi*-8873 (M = marker, P1t= protein pellet bakteri dan Pp = protein pili dan BM = berat molekul)

Gambar 1 menunjukkan adanya pita protein AdhF36 *Salmonella typhi*-8873 isolat Malang. Oleh karena itu isolat *Salmonella typhi*-8873 kemudian ditetapkan sebagai sampel penelitian. Selanjutnya diberi perlakuan konsentrasi osmolaritas dan pH, terkait dengan pengujian stabilitas ekspresi protein AdhF36 pada *Salmonella typhi*.

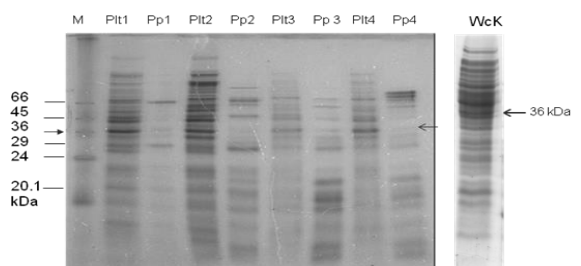
Hasil SDS-PAGE Protein AdhF36 *Salmonella typhi* pada Perlakuan Osmolaritas



Gambar 2. Hasil SDS-PAGE ekspresi pita protein AdhF36 *Salmonella typhi* pada perlakuan osmolaritas (M = marker, Plt.1 = protein pelet perlakuan osmolaritas 50 mM, Pp.1 = protein pili perlakuan osmolaritas 50mM, Plt.2 = protein pelet perlakuan osmolaritas 150 mM, Pp.2 = protein pili perlakuan osmolaritas 150 mM, Plt.3 = protein pelet perlakuan osmolaritas 250 mM, Pp.3 = protein pili perlakuan osmolaritas 250 mM, Plt.4= protein pelet perlakuan osmolaritas 350 mM dan Pp .4 = protein pili perlakuan osmolaritas 350 mM)

Hasil isolasi dan perhitungan berat molekul protein adhesin *fimbriae* (Gambar 2) pada perubahan konsentrasi osmolaritas diperoleh pita protein semakin tebal dari konsentrasi osmolaritas 50-350 mM. Berat molekul yang diperoleh dari protein pelet bakteri sekitar 81; 74; 68; 66; 50; 46; 40; 36,3; 18; dan 14,8 kDa sedangkan protein *fimbriae* dengan berat molekul 81; 74; 68; 66; 50; 46; 40; 36,3; 32; 27; 23; 20,1; 18; dan 14,8 kDa. Sesuai hasil SDS-PAGE pada Gambar 2 di atas menunjukkan bahwa protein AdhF36 stabil diekspresi oleh *Salmonella Typhi* pada perlakuan osmolaritas 50-350 mM.

Hasil SDS-PAGE Protein AdhF36 *Salmonella typhi* pada Perlakuan pH

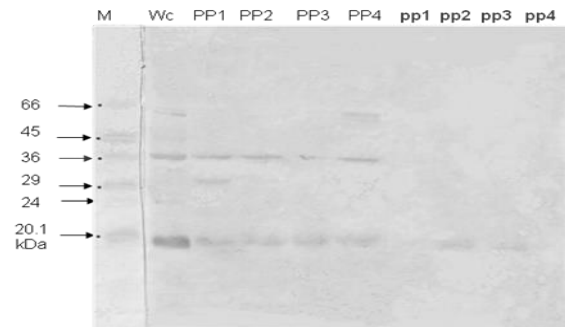


Gambar 3. Hasil SDS-PAGE protein AdhF36 *Salmonella typhi* pada perlakuan pH (M = protein marker, Plt1 = protein pelet perlakuan pH 4,5; Pp1 = protein pili perlakuan pH 4,5; Plt2= protein pelet perlakuan pH5,0; Pp2 = protein pili perlakuan pH5,0; Plt3 = protein pelet perlakuan pH5,5; Pp4 = protein pili perlakuan pH 5,5; Plt4 = protein pelet perlakuan pH 6,0; dan Pp4 = protein pili perlakuan pH 6,0)

Berdasarkan hasil perhitungan berat molekul protein adhesin *fimbriae* pada Gambar 3, dengan perlakuan konsentrasi pH 4,5-6,0 diperoleh beberapa pita protein yang tidak terekspresi. Hasil perhitungan berat molekul protein pelet bakteri diperoleh beberapa subunit protein dengan berat molekul 85; 74; 66; 59; 52; 46; 40; 36,3; 34; 32; 21, dan 17 kDa sedangkan protein pili dengan berat molekul 74; 66; 52; 42; 36; 3,34; 27; 23; 21; dan 17 kDa. Pada perlakuan pH protein *fimbriae* dengan berat molekul 36 kDa terekspresi hanya pada konsentrasi pH 5,5. Sebaliknya, ekspresi protein AdhF36 stabil ditemukan pada protein pelet bakteri walaupun terjadi perubahan konsentrasi pH. Hal ini membuktikan terdapat pengaruh perlakuan pH terhadap stabilitas ekspresi protein AdhF36 *Salmonella typhi*.

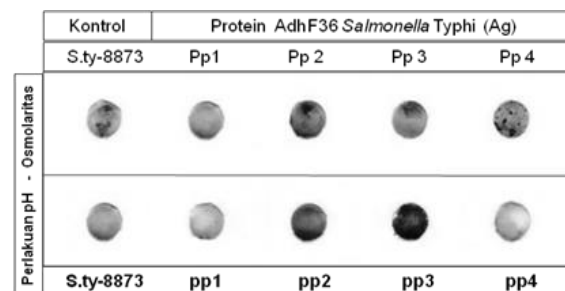
Hasil Uji Western Blot untuk Deteksi Protein AdhF36

Hasil uji *Western blot* pada Gambar 4 menunjukkan adanya pita protein yang berwarna biru keunguan dengan berat molekul 36 kDa.



Gambar 4. Hasil uji *Western Blot* protein AdhF36 pada perlakuan osmolaritas dan pH dengan Ab poliklonal AdhO36kDa (M = protein marker, Wc. = protein *whole cells* PP1 = protein pili hasil perlakuan osmolaritas 50 mM, PP2 = protein pili hasil perlakuan osmolaritas 150 mM, PP3 = protein pili hasil perlakuan osmolaritas 250 mM, PP4 = protein pili hasil perlakuan osmolaritas 350 mM. pp1 = protein pili hasil perlakuan pH 4,5; pp2 = protein pili hasil perlakuan pH5,0; pp3 = protein pili hasil perlakuan pH 5,5; serta pp4 = protein pili hasil perlakuan pH 6,0)

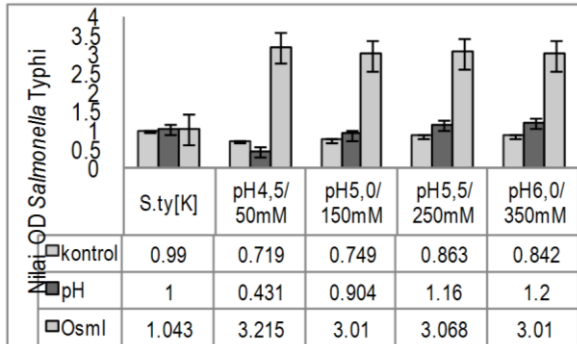
Hasil Uji Dot Blot Protein AdhF36 *Salmonella Typhi*



Gambar 5. Hasil uji *Dot Blot* protein AdhF36 dengan Ab primer AdhO36kDa (Pp.1 = perlakuan osmolaritas 50mM; Pp.2 = perlakuan osmolaritas 150mM; Pp.3 = perlakuan osmolaritas 250 mM, Pp.4 = perlakuan osmolaritas 350 mM. pp1 = perlakuan pH 4,5; pp2 = perlakuan pH 5,0; pp3 = perlakuan pH 5,5; dan pp4 = perlakuan pH 6,0)

Hasil *Dot blot* bertujuan untuk deteksi protein AdhF36 *Salmonella typhi* dengan antibodi poliklonal AdhO36 yang menunjukkan respons positif pada perlakuan osmolaritas 50-350 mM. Demikian juga respon positif ditemukan pada perlakuan pH 4,5-5,5 tetapi pada perlakuan pH 4,5 dan pH 6,0 responsnya menurun.

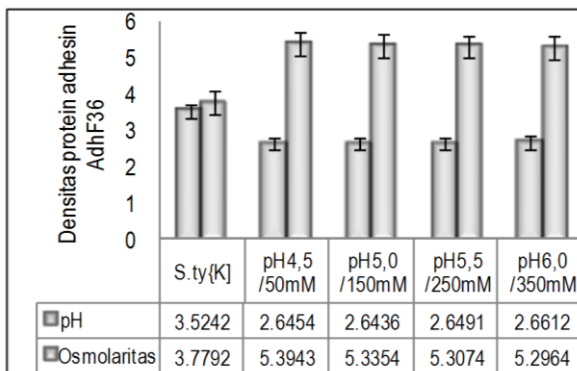
Hasil Pengukuran OD *Salmonella typhi* pada Perlakuan Osmolaritas dan pH



Gambar 6. Charta hasil pengukuran OD *Salmonella typhi* sebelum pemotongan pili dengan $\lambda = 540$ nm pada perlakuan osmolaritas dan pH, inkubasi 1 x 24 jam

Data pada Gambar 6 menunjukkan perbedaan nilai OD antara kontrol, perlakuan osmolaritas dengan pH setelah diinkubasi selama 1x24 jam. Peningkatan nilai OD mungkin disebabkan pertambahan masa sel bakteri dan disertai oleh sintesis protein *fimbriae*.

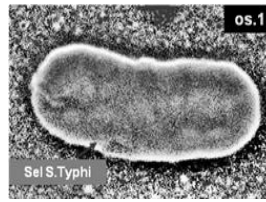
Hasil Rerata Pengukuran Densitas Pita Protein AdhF36 *Salmonella typhi*



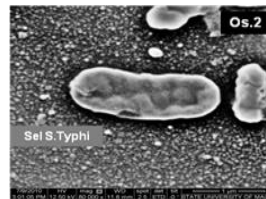
Gambar 7. Hasil rerata densitas SDS-PAGE pita protein AdhF36 *Salmonella typhi* pada perlakuan osmolaritas dan pH

Pada Gambar 7 menunjukkan terjadi perbedaan nilai densitas hasil SDS-PAGE protein AdhF36 *Salmonella typhi* antara perlakuan osmolaritas dengan pH. Perlakuan osmolaritas ternyata mampu menginduksi peningkatan sintesis protein AdhF36 dibandingkan dengan kontrol. Sebaliknya perlakuan pH 4,5-6,0 tidak menunjukkan peningkatan sintesis protein AdhF36 *Salmonella typhi* dibandingkan dengan kontrol.

Hasil Pengamatan SEM Morfologi *Salmonella typhi* Pasca Perlakuan dan Pemisahan *Fimbriae*

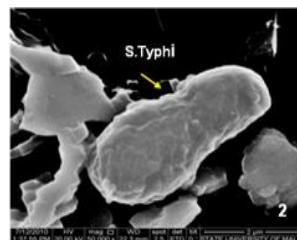


Gambar 8. Sel *Salmonella typhi* [Os-1] = perlakuan osmolaritas 50 mM pembesaran 80.000x pada SEM

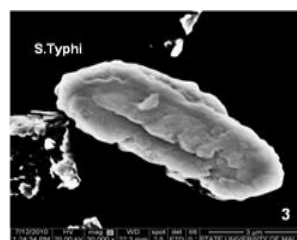


Gambar 9. Sel *Salmonella typhi* [Os-2] = perlakuan osmolaritas 150 mM (pembesaran 80.000x) pada SEM

Pada Gambar 8 menunjukkan perlakuan osmolaritas 50 mM, setelah proses pemisahan pili, nampak sel *Salmonella Typhi* tanpa memiliki pili maupun bagian flagel, ini membuktikan bagian pili bakteri telah terpisah dari bagian selnya sedangkan Gambar 9 memperlihatkan ada perubahan morfologi sel bakteri yang menjadi tidak utuh akibat mengalami lisis sel.



Gambar 10. Morfologi sel *Salmonella Typhi* [2] = [perlakuan pH 4,5] pembesaran 50.000x) pada scanning microscope electron (SEM)



Gambar 11. Morfologi sel *Salmonella Typhi* [3] = [perlakuan pH 5,0] pembesaran 30.000x pada scanning microscope electron SEM

Pada Gambar 10 dan 11 menunjukkan terjadi perubahan warna lebih pucat dibandingkan pada perlakuan osmolaritas. Pada gambar ini juga nampak sel telah mengalami lisis, sehingga bagian permukaan selnya tidak normal, atau keriput.

Salmonella typhi dikenal memiliki kemampuan adaptasi untuk bertahan pada hospes manusia, karena memiliki beberapa faktor virulensi. Protein adhesin diketahui sebagai salah satu faktor virulensi yang berperan penting pada proses infeksi *Salmonella typhi*. Hasil SDS-PAGE pada Gambar 1 diperoleh pita protein pada potongan pili 74; 71; 69; 54; 47; 41; 36,4; 34; 29; 27; 24; 22; dan 20,5 kDa pada *Salmonella typhi*-8873. Hal ini membuktikan bahwa *Salmonella typhi*, terbukti memiliki protein AdhF36 sehingga ditetapkan sebagai sampel penelitian dan diberi perlakuan osmolaritas dan pH.

Hasil SDS-Page Protein AdhF36 pada Perlakuan Osmolaritas

Sesuai hasil SDS-PAGE pada Gambar 2, di atas menunjukkan bahwa protein AdhF36 stabil diekspresi pada perlakuan osmolaritas, karena tetap terekspresi pada perlakuan osmolaritas 50, 150, 250, dan 350 mM. Berat molekul yang diperoleh dari protein adhesin *fimbriae* 36,3 kDa, demikian juga pada pelet bakteri diperoleh berat molekul yang sama. Oleh karena itu *Salmonella typhi* terbukti toleran terhadap perlakuan osmolaritas terkait dengan kemampuan adaptasi dan sifat virulensinya. Hasil ekspresi protein ini juga membuktikan bahwa kondisi sinyal osmolaritas mampu menginduksi bakteri mensintesis protein *fimbriae*, yang berkaitan dengan kemampuan adhesi bakteri. Menurut Huang *et al.* (2007) bahwa osmolaritas lingkungan sekitar patogen *Salmonella typhi* pada lumen usus halus kira-kira 50-300 mM NaCl. Oleh karena itu hasil perlakuan osmolaritas secara *in vitro* pada penelitian ini bisa menjadi perbandingan kondisi lingkungan hidup *Salmonella typhi* secara *in vivo* dalam lumen usus. Data hasil penelitian ini didukung juga oleh data analisis kadar protein AdhF36 *Salmonella typhi* dengan metode Biuret (data tidak ditampilkan), yang membuktikan terjadi peningkatan konsentrasi protein AdhF36 pada perlakuan osmolaritas 50-350 mM (8,1012 µg/ml) dibandingkan dengan kontrol K = 2,0126 µg/ml. Data lain yang mendukung adalah hasil pengukuran OD *Salmonella typhi* pada panjang gelombang 540 nm sebelum dan setelah perlakuan osmolaritas diperoleh rerata nilai OD = 3,07 dibandingkan dengan kontrol dengan OD = 1,043 (data tidak ditampilkan). Peningkatan kekeruhan biakan ini dapat terjadi karena adanya penambahan pertumbuhan sel bakteri dan peningkatan produksi protein *fimbriae* oleh *Salmonella typhi*. Oleh sebab itu perubahan lingkungan osmolaritas bakteri ternyata mampu menginduksi ekspresi faktor virulensi *Salmonella typhi*, khususnya protein *fimbriae* yang berperan pada proses adhesi dan kolonisasi. Dengan demikian penelitian ini memberi jawaban alasan *Salmonella typhi* nyaman hidup pada usus halus bagian bawah yakni karena bakteri ini menemukan kondisi lingkungan hidup yang cocok di tempat ini.

Hasil SDS-PAGE Protein AdhF36 pada Perlakuan pH

Hasil isolasi protein adhesin *fimbriae* Gambar 3 dengan perlakuan konsentrasi pH 4,5-6,0 diperoleh pita protein yang berbeda. Hasil perhitungan berat molekul pada pelet bakteri ditemukan protein adhesin dengan berat molekul 36,3 kDa, sedangkan pada protein *fimbriae* tidak terdeteksi pita protein dengan berat molekul 36 kDa. Sebaliknya ekspresi protein AdhF36 stabil ditemukan pada protein pelet bakteri walaupun terjadi perubahan konsentrasi pH 4,5-6,0. Hal ini membuktikan ada pengaruh perlakuan pH terhadap ketidakstabilan ekspresi protein AdhF36 *Salmonella typhi*. Pada prinsipnya ikatan protein *fimbriae* cukup stabil, dan disosiasi protein *fimbriae* bisa terjadi karena paparan HCl serta pH < 1,8. *Fimbriae* juga resisten

terhadap proteolisis oleh tripsin dan resisten terhadap pemisahan oleh agen denaturasi misalnya SDS dan urea 6 M. Ikatan komponen protein *fimbriae* bersifat non kovalen, tetapi berikatan bersama melalui ikatan hidrofilik dan hidrofobik yang kuat dan stabil. Hal ini sesuai dengan pendapat Klem (1994), bahwa kerusakan protein *fimbriae* ini mungkin terjadi akibat adanya depolimerisasi oleh faktor perlakuan pH. Hasil pengukuran OD *Salmonella typhi* pada panjang gelombang 540 nm, juga tidak berpengaruh pada peningkatan pertumbuhan sel bakteri seperti halnya pada perlakuan osmolaritas. Hasil rerata pengukuran OD = 0,923 dan nilai ini lebih kecil dengan kontrol dengan OD = 1,041. Penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan pH tidak menginduksi ekspresi protein AdhF36 *Salmonella typhi*, dan bakteri cenderung lebih aktif pada upaya pertahanan seluler oleh karena perbedaan gradien konsentrasi ion H⁺ di dalam dan luar sel yang dapat mengganggu kestabilan kehidupan sel. Oleh sebab itu pada kondisi pH rendah *Salmonella typhi* diduga belum saatnya mengekspresi protein adhesin sebagai salah satu faktor virulensinya.

Uji Western Blot

Respons antibodi terhadap protein AdhF36 pada Gambar 4 ditemukan pada perlakuan osmolaritas 50-350 mM. Demikian juga antibodi poliklonal AdhO36 merespon antigen protein pada berat molekul sekitar 66; 29; 24; dan 20,1 kDa pada perlakuan osmolaritas 50-350 mM. Sebaliknya antibodi poliklonal AdhO36 mengenali protein antigen hasil perlakuan pH pada berat molekul 20,1 kDa, pada perlakuan pH 5,0 dan 5,5. Hasil ini membuktikan bahwa perlakuan pH memberi pengaruh negatif terhadap ekspresi protein AdhF36 *Salmonella typhi*. Dengan demikian dapat diasumsikan bahwa tidak semua sinyal lingkungan memberi pengaruh positif terhadap peningkatan virulensi bakteri.

Hasil uji *Dot Blot* Protein AdhF36 *Salmonella typhi* dengan antibodi poliklonal AdhO36 pada Gambar 5 menunjukkan respons positif pada perlakuan osmolaritas 50-350 mM. Respons positif ditemukan juga pada perlakuan pH 5,0 dan 5,5 tetapi pada perlakuan pH 4,5 dan 6,0 responsnya terlihat berkurang. Hasil uji positif *Dot blot* antara protein AdhF36 *Salmonella typhi* dengan antibodi poliklonal AdhO36, pada perlakuan osmolaritas 50-350 mM ditandai dengan warna biru keunguan. Hal ini membuktikan bahwa protein yang diisolasi dari perlakuan osmolaritas dan pH pada *Salmonella typhi* benar adalah protein AdhF36.

Hasil pengamatan morfologi sel bakteri *Salmonella typhi* dengan bantuan SEM membuktikan terjadi perubahan morfologi sel bakteri setelah perlakuan osmolaritas dan pH, serta pematangan pili. Pada Gambar 8 menunjukkan perlakuan osmolaritas 50 mM, setelah proses pemisahan pili, tampak sel *Salmonella typhi* tanpa memiliki pili maupun bagian flagel, ini membuktikan bahwa bagian pili bakteri telah terpisah dari selnya sedangkan Gambar 9 memperlihatkan ada

perubahan morfologi sel bakteri yang menjadi tidak utuh akibat lisis sel. Pada Gambar 10 dan 11 menunjukkan terjadi perubahan warna lebih pucat dibandingkan pada perlakuan osmolaritas. Pada gambar ini juga tampak sel bakteri telah mengalami lisis sehingga bagian permukaan selnya keriput. Perubahan morfologi sel bakteri terkait dengan paparan pH rendah (4,5) di bawah kondisi normal syarat pertumbuhan *Salmonella typhi* (pH 6-8). Kondisi pH rendah di luar sel mengakibatkan ketidakseimbangan ion H⁺ di dalam sel sehingga terjadi difusi cairan ke luar sel secara berlebihan yang berakibat gangguan pada membran sel bakteri.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa protein AdhF36 lebih stabil diekspresikan pada perubahan osmolaritas lingkungan hidup *Salmonella typhi*, sebaliknya protein ini tidak stabil diekspresikan pada perubahan pH secara *in vitro*. Terdapat perbedaan stabilitas ekspresi protein AdhF36 *Salmonella typhi* pada perlakuan osmolaritas dengan konsentrasi NaCl 50, 150, 250, dan 350 mM dengan konsentrasi pH (4,5; 5,0; 5,5; dan 6,0) secara *in vitro*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Dirjen Dikti yang telah memberi bantuan dana penelitian melalui Hibah Program Doktor tahun 2009, sehingga terlaksananya penelitian ini. Juga kepada seluruh staf Laboratorium Biokimia FMIPA Unibraw, Laboratorium Biomedik FK-UB, Laboratorium Mikrobiologi FK-UB, Laboratorium Biomolekuler FMIPA-UB serta semua pihak yang turut membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bader, M. W., W.W. Navarre, W. Shiau, H. Nikaido, J.G. Frye, M. McClelland, F.C. Fang, and S.I. Miller. 2003. Regulation of *Salmonella* Typhimurium virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. **Mol. Microbiol.** 50:219-230.
- Barnhart, M.M., F.G. Sauer, J.S. Pinkner, and S.J. Hultgren. 2003. Chaperone-subunit-usher interactions required for donor strand exchange during bacterial pilus assembly. **J. Bacteriol.** 185(9): 2723-2730.
- Baxter, M.A., and Jones B.D. 2005. The *fimYZ* genes regulate *Salmonella enterica serovar* Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility. **Infect. Immun.** 73(3):1377-1385.
- Bishop, A., D. House, T. Perkins, S. Baker, R.A. Kingsley, and G. Dougan. 2008. Interaction of *Salmonella enterica serovar* Typhi with cultured epithelial cells: Roles of surface structures in adhesion and invasion. **J. Microbiol.** 154:1914-1926.
- Bucarey, S. A., N.A. Villagra, M.P. Martinic, A. N. Trombert, C.A. Santiviago, N. P. Maule'n, P. Youderian, and G.C. Mora. 2005. The *Salmonella enterica* Serovar Typhi *tsx* gene, encoding a nucleoside-specific porin, is essential for prototrophic growth in the absence of nucleosides. **Infect. Immun.** 73(10):6210-6219.
- Burrows, L.L. 2005. Weapons of mass retraction. **Mol. Microbiol.** 57: 878-888.
- Cheminay, C., A. Mohlenbrink, and M. Hansel. 2005. Intracellular *Salmonella* inhibit antigen presentation by dendritic cells. **J. Immunol.** 174 :2892-2899.
- Hernandez-Lucas, I., A.L. Gallego-Hernandez, S. Encarnacion, M. Fernandez-Mora, A. G. Mart'nez-Batallar, H. Salgado, R. Oropeza, and E. Calva. 2008. The LysR-type transcriptional regulator LeuO controls expression of several genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. **J. Bacteriol.** 190(5):1658-1670.
- Huang, H., H. Xu, X. Sun, K. Ohkusu, Y. Kawamura, and T. Ezaki. 2007. Genome-wide scan of the gene expression kinetics of *Salmonella enterica* serovar Typhi during hyperosmotic stress. **Int. J. Mol. Sci.** 8:116-135.
- Klem, P. 1994. **Fimbriae, Adhesion, Genetics, Biogenesis and Vaccines.** CRC Press, Inc, USA.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature (London).** 227:680-685.
- Martinez, J. L., and F. Baquero. 2002. Interactions among strategies associated with bacterial infection: Pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. **Clin. Microbiol. Rev.** 15(4):647- 679.
- Nymu, T. 2008. What to Use attach to the Small Intestine, Back To-Kidney, Taiwan. <http://www.igem.org>.
- Payne, J. B., J. A. Osborne, P. K. Jenkins, and B.W. Sheldon. 2007. Modeling the growth and death kinetics of salmonella in poultry litter as a function of pH and water activity. **J. Poultry Science** 86:191-201.
- Rhen, M., and C.J. Dorman. 2005. Hierarchical gene regulators adapt *Salmonella enterica* to its host milieu. **Int. J. Med. Microbiol.** 294:487-502.
- Rosen, D.A., J.S. Pinkner, J.N. Walker, J.S. Elam, J.M. Jones, and S.J. Hultgren. 2008. Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract. **Infect. Immun.** 76(7):3346-3356.
- Santoso, S. 2002. Protein Adhesin *Salmonella* Typhi sebagai Faktor Virulensi Berpotensi Imunogenik pada Produksi S-IgA Protektif. **Disertasi.** Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Starks, A.M., B.J. Froehlich, T.N. Jones, and J.R. Scott. 2006. Assembly of CS1 pili: The role of specific residues of the major pilin, CooA. **J. Bacteriol.** 188(1): 231-239.
- Sumarno. 2000. Karakterisasi Molekuler Protein Adhesi *Vibrio cholerae* O1 M094V dan Protein Reseptornya pada Sel Epitel Usus Halus Tikus Putih (Wistar): Studi Patogenesis *Vibrio cholerae* O1 M094V. **Disertasi.** Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.