

ISOLASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN HEMAGLUTININ SUB UNIT PILI *Salmonella typhi* *Isolation and Characterization of Hemagglutinin Protein Sub Unit Pili Salmonella typhi*

Tri Murini¹ dan A. Yuswanto²

Program Studi Farmasi
Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

The aim of the research was to isolate and characterize hemagglutinin protein sub unit pili as a virulence factor of *Salmonella typhi*.

The characterization was done in two steps. The first step was a hemagglutination test to find out the molecular weight of hemagglutinin protein sub unit pili. The second step was to analyze antibodies against protein hemagglutinin sub unit pili by *Western blot* method and the inhibitory activities of the antibodies on the adherent test. The test was carried out in two ways, by blocking the enterocytes with hemagglutinin protein and blocking pili of *S. typhi* with antibodies against hemagglutinin protein sub unit pili. The adherence test between *S. typhi* and rat intestinal enterocytes was done as a control.

The molecular weight of hemagglutinin protein sub unit pili was 20 kDa. Antibodies against hemagglutinin protein sub unit pili 20 kDa showed a cross reaction with 38, 30, and 16 kDa sub unit pili. Both pretreatment of the enterocytes with hemagglutinin protein pili and pretreatment of the bacteria *S. typhi* with antibodies against hemagglutinin protein sub unit pili could inhibit the adherence of the *S. typhi* on rat intestinal enterocytes.

It can be concluded that *S. typhi* hemagglutinin protein sub unit pili has the molecular weight of 20 kDa and plays an important role in the adherence mechanism of *S. typhi* on rat intestinal enterocyte.

Keywords : *S. typhi*; hemagglutinin; pili, adherence.

PENGANTAR

Di negara yang sedang berkembang, insidensi demam tifoid cukup tinggi, demikian juga di Indonesia. Berdasarkan penelitian epidemiologi yang dilakukan oleh Achmadi (1997) terungkap bahwa insidensi demam tifoid pada masyarakat di daerah semi urban ialah 810 kasus per 100.000

1) Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

2) Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

penduduk per tahun. Penderita demam tifoid terbanyak pada usia 3-19 tahun sekitar 77% dengan puncak tertinggi pada usia 10-15 tahun.

Organisme penyebab demam tifoid adalah *Salmonella typhi* yang merupakan bakteri enteropatogen intraselular fakultatif, dan mempunyai kemampuan untuk menembus, hidup, dan memperbanyak diri di dalam sel eukaryotik. Proses itu penting pada patogenesis demam tifoid (Finlay dan Falkow, 1989).

Tahap pertama infeksi pada beberapa bakteri enteropatogen ditandai oleh terbentuknya koloni pada permukaan mukosa intestinal dan terinfeksi jaringan hospes. Kolonisasi itu memerantarai perlekatan bakteri pada permukaan mukosa intestinal. Komponen bakterial merupakan salah satu alat untuk melekat pada permukaan mukosa. Hal itu penting dalam proses invasi bakteri menembus dinding sel epitel yang merupakan awal mekanisme patogenesis (Finlay dan Falkow, 1989).

Salah satu komponen bakterial yang berperan dalam perlekatan adalah pili. Pada beberapa bakteri enteropatogen, misalnya *Escherichia coli* (Bloch dan Orndorff, 1980), dan *Vibrio parahaemolyticus* non 01 dan non 0139 (Yamashiro dan Iwanaga, 1996) telah dibuktikan bahwa pili setelah menempel pada permukaan mukosa intestinal, bakteri itu kemudian memperbanyak diri (koloni), sehingga dapat dikatakan bahwa pili merupakan faktor kolonisasi.

Hubungan antara sifat hemaglutinasi bakterial dan perlekatannya pada beberapa bakteri enteropatogen telah banyak dilaporkan. Sebagai contoh *V. parahaemolyticus* pili yang berperan sebagai faktor kolonisasi merupakan protein hemaglutinin yang berbobot molekul 17 kDa (Nakasone dan Iwanaga, 1993). Selain bakteri enteropatogen, *Porphyromonas gingivalis*, bakteri pada rongga mulut, mempunyai protein hemaglutinin (41 kDa) yang berasal dari pili yang dapat mempengaruhi virulensinya (Hamada dkk. 1996).

S. typhi adalah salah satu bakteri enteropatogen yang mempunyai pili. Satta dkk. (1993) melaporkan bahwa pili pada *S. typhi* berperan dalam patogenesis demam tifoid. Oleh karena itu, timbul suatu masalah apakah pili pada *S. typhi* mempunyai protein hemaglutinin dan apa peran protein itu pada patogenesis demam tifoid ?

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan dan karakterisasi protein hemaglutinin sub unit pili *S. typhi* dalam hal perlekatan pada sel enterosit intestinal tikus.

CARA PENELITIAN

Pembiakan pili bakteri *S.typhi*

Bakteri ditumbuhkan pada media cair Luria Bertani (LB) 5 mL lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Media cair yang berisi kuman disemprotkan pada media Mac Conkey dan diratakan, kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Hasil panen dikerok dan dimasukkan ke media LB cair 500 ml, diinkubasi selama 3 jam. Hasil inkubasi kemudian dituang ke dalam botol-botol yang bervolume 200 mL yang telah berisi media LB padat, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C.

Isolasi pili dan pengendapan bertingkat dengan amonium sulfat

Isolasi pili dikerjakan menurut metode Ehara dkk. (1989). Hasil isolasi pili disentrifus dengan 4000 rpm 30 menit. Supernatan merupakan fraksi pili, sedangkan pelet adalah *cells wash*. Supernatan diendapkan dengan amonium sulfat secara bertingkat (Scopes, 1987). Fraksi pengendapan dilarutkan dengan bufer TBS pH 8 dan ditetapkan kadarnya secara spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm.

Uji hemaglutinasi dan perkiraan bobot molekul protein hemaglutinin

Uji hemaglutinasi dilakukan dari fraksi pengendapan dengan metode Jones dkk. (1976) dengan menggunakan eritrosit mencit BalB/C yang berkadar 0,5% dalam larutan penyangga TBS pH 8. Hasil uji hemaglutinasi dipantau dengan SDS PAGE (Laemmli, 1970), dan ditentukan bobot molekulnya.

Imunisasi

Imunisasi ayam diberikan secara intramuskular, pada hari ke 1, 12, dan 20. Antigen yang disuntikkan berasal dari potongan gel poli-akrilamid yang mengandung protein dengan bobot molekul tertentu yang diduga sebagai protein hemaglutinin sub unit pili. Potongan gel itu dihaluskan dengan *homogenizer* dengan larutan suspensi, larutan penyangga PBS steril pH 7,4.

Analisis Western blot

Antibodi anti-protein hemaglutinin sub unit pili diperoleh dari isolasi kuning telur ayam (Gasmann dkk. 1990). Pengumpulan telur dilakukan pada hari ke 25-35 dari imunisasi pertama dan imunoglobulin yang terbentuk adalah IgY. Hasil isolasi itu dianalisis dengan metode *Western blot* (Hudson dan Hay, 1989).

Uji perlekatan dan hambatan perlekatan

Uji perlekatan antara bakteri *S. typhi* dengan sel enterosit (berasal dari isolasi sel epitel intestinal tikus putih galur Wistar menurut metode Weisser dkk. 1973) dilakukan menurut metode Nagayama dkk.

Adapun uji hambatan perlekatan dilakukan dengan 2 cara : (a) menyekat sel enterosit dengan protein hemaglutinin pili; (b) menyekat pili *S. typhi* dengan antibodi anti-protein hemaglutinin sub unit pili.

Pelet yang ditetaskan pada obyek glas dicat dengan pewarna Gram, dan hasilnya dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x200, lalu dihitung jumlah bakteri yang menempel pada *brush border* setiap 100 enterosit. Indeks perlekatan (IP) ditentukan dengan cara menghitung rata-rata jumlah bakteri yang melekat pada setiap enterosit dan dilakukan dalam tiga kali pengujian.

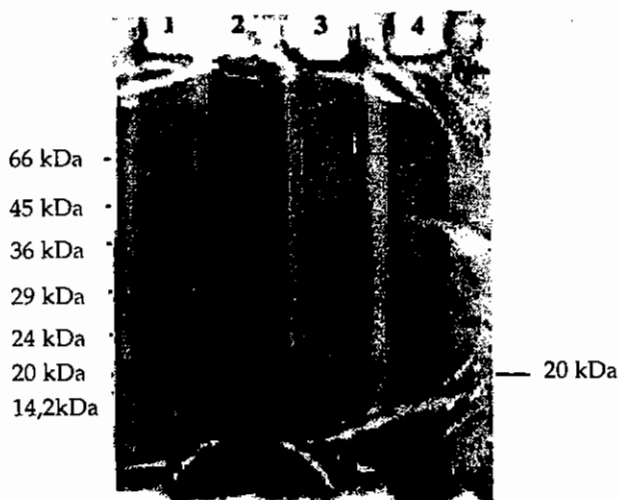
HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji aglutinasi dilakukan dengan menggunakan eritrosit mencit Balb/C dan fraksi-fraksi yang telah diendapkan secara bertingkat dengan amonium sulfat (Tabel 1). Hasil uji aglutinasi itu menunjukkan bahwa titer aglutinasi tertinggi terdapat pada fraksi pengendapan (FP) 40%. Hasil temuan ini menunjukkan bahwa protein pili banyak diendapkan oleh amonium sulfat dengan fraksi pengendapan 40%. Hasil itu dikuatkan dengan menentukan kadar masing-masing fraksi pengendapan. Konsentrasi fraksi pengendapan dari 10-90% berkisar antara 12,98-13,42 ug/mL. Pada fraksi pengendapan 40%, diperoleh kadar tertinggi, yaitu 13,42ug/mL dan dielektroforesis pada gel poliakrilamid SDS untuk memperkirakan bobot molekul protein yang mengikat eritrosit (Gambar 1).

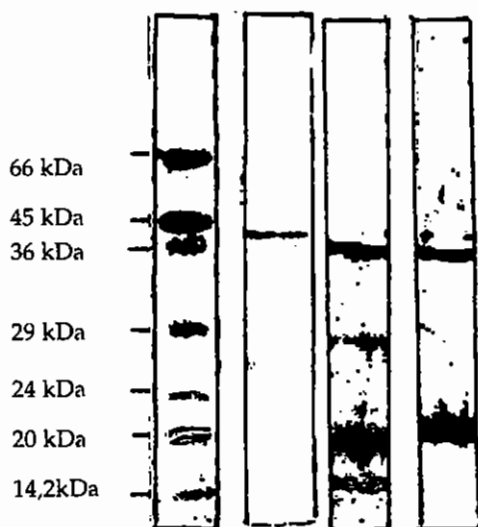
Tabel 1. Hasil Uji Hemaglutinasi Eritrosit Fraksi Pengendapan (FP) Supernatan Pili *Salmonella typhi*

No	FP	Titer hemaglutinin*
1	10%	8
2	20%	8
3	30%	8
4	40%	128
5	50%	64
6	60%	64
7	70%	32
8	80%	32
9	90%	32

*). Berbanding terbalik dari nilai titer pengenceran tertinggi yang menyebabkan hemaglutinasi eritrosit.



Gambar 1. Elektrofogram gel poliakrilamida-SDS hasil uji hemaglutinasi pili *S.typhi* dengan eritrosit (1) petanda bobot molekul protein; (2) eritrosit mencit Balb/C; (3) pili *S.typhi*; (4) ikatan pili *S.typhi* dan eritrosit mencit Balb/C



Gambar 2. Hasil analisis Western blot dari isolat kuning telur ayam yang mengandung antibodi anti protein hemaglutinin sub unit pili 20 kDa (IgY). (1) penanda bobot molekul protein; (2) IgY kontrol (tanpa perlakuan) pengenceran 1:1000; (3) IgY pengenceran 1:500; (4) IgY pengenceran 1:1000

Pada elektroforegram (Gambar 1) terlihat adanya pita polipeptida yang agak tebal pada lajur 4. Pita itu adalah ikatan antara pili dengan eritrosit mencit Balb/C. Apabila dibandingkan dengan eritrosit sendiri (lajur 2) dan pili (lajur 3) kemungkinan pita yang agak tebal itu adalah protein hemagglutinin, dan bobot molekulnya adalah 20 kDa (penanda bobot molekul pada lajur 1). Hasil penelitian itu sama seperti yang dilakukan Mucas dkk. (1993); fimbriae (pili) tipe 1 dari *S. typhi* pada analisis SDS PAGE menunjukkan adanya polipeptida utama dengan bobot molekul 20 kDa yang merupakan komponen fimbrillin, sedangkan yang berbobot molekul lebih besar konsentrasinya sangat kecil.

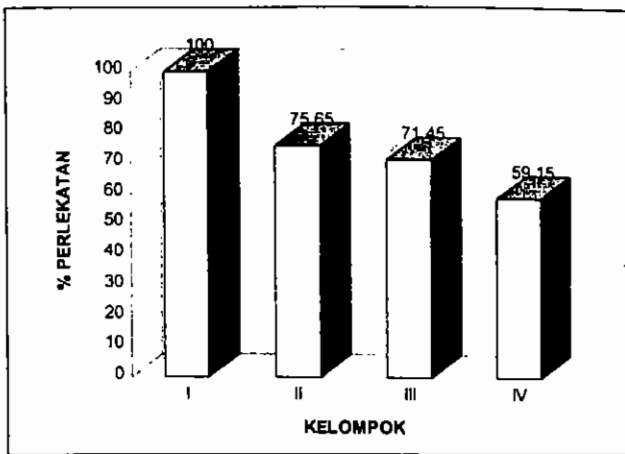
Hasil analisis *Western blot* (Gambar 2), lajur 2 menunjukkan adanya pita polipeptida yang berbobot molekul 38 kDa pada kontrol (pra imunisasi). Temuan ini menunjukkan bahwa ayam yang digunakan untuk percobaan, sudah mempunyai antibodi antiprotein hemagglutinin 38 kDa, karena kemungkinan bahwa ayam telah terinfeksi salmonellosis. Antibodi yang terdeteksi itu diperkirakan mengenal epitop protein hemagglutinin yang berbobot molekul 20 kDa.

Antibodi antiprotein hemagglutinin (IgY) yang diperoleh adalah antibodi poliklonal yang mengenal bermacam-macam epitop, sehingga dapat mengenali protein sub unit pili dengan bobot molekul yang berbeda. Pada pengenceran 500 kali ditemukan 4 macam polipeptida yang dapat dikenali oleh antibodi antiprotein hemagglutinin 20 kDa, yaitu 38, 30, 20, dan 16 kDa, sedangkan pada pengenceran 1000 kalinya yang terlihat hanya 2 pita polipeptida, yaitu yang berbobot molekul 38 dan 20 kDa. Pita polipeptida yang berbobot molekul 30 dan 16 kDa tidak tampak, sebab kemungkinan konsentrasinya kecil atau dengan pengenceran dua kalinya protein itu rusak.

Kolonisasi adalah suatu fenomena pada bakteri enteropatogen, melekat pada sel epitel intestinal, berkembang biak dan menetap di daerah itu. Perlekatan bakteri pada sel enterosit diperantarai oleh beberapa faktor, salah satu di antaranya adalah pili (Yamashiro dan Iwanaga, 1996). Pembuktian bahwa pili berperan dalam perlekatan dapat diuji dengan hambatan perlekatan. Ada 2 cara : (1) penyekatan sel enterosit dengan protein hemagglutinin pili (menyekat reseptor), (2) penyekatan pili bakteri *S. typhi* dengan antibodi antiprotein hemagglutinin sub unit pili 20 kDa (menyekat pili).

Pada uji hambatan perlekatan dengan menyekat reseptor, sel enterosit diberi perlakuan dengan satu seri jumlah protein hemagglutinin pili dengan kadar 6,87 ug/mL sebanyak 100; 200; dan 400 mL. Hasil uji data indeks perlekatan (IP) di antara kelompok perlakuan berturutan

lebih kurang 26,933; 21,057, dan 21,057 dengan prosen bakteri yang melekat pada setiap sel menurun berturutan, yaitu 75,65, 71,45, dan 59,15% (Gambar 3). Apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol (I) penurunan itu secara statistik dengan uji ANAVA berbeda bermakna ($p < 0,05$), sedangkan antara kelompok praperlakuan tidak bermakna ($p > 0,05$). Temuan ini menunjukkan bahwa menyekat sel enterosit dengan protein hemaglutinin pili ternyata dapat menghambat jumlah bakteri yang melekat pada sel enterosit. Meskipun hambatan itu tidak sempurna. Nilai tiap-tiap IP secara statistik ada perbedaan yang bermakna dengan dengan kontrol, tetapi antarindeks perlakuan tidak bermakna.



Keterangan:

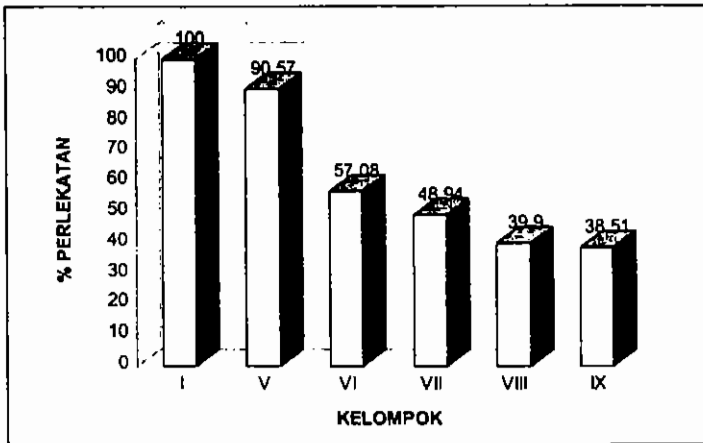
- I : Kontrol positif (enterosit + *S.typhi*)
- II : Praperlakuan enterosit + pili 100 ml, + *S.typhi*
- III : Praperlakuan enterosit + pili 200 ml, + *S.typhi*
- IV : Praperlakuan enterosit + pili 400 ml, + *S.typhi*

Gambar 3. Histogram perbandingan persen perlekatan akibat menyekat sel enterosit dengan protein hemaglutinin pili.

Keadaan ini kemungkinan terkait dengan konsentrasi atau dosis protein hemaglutinin pili yang kurang tinggi, sehingga tidak mampu menyekat reseptor yang ada pada sel enterosit. Hasil yang kurang memuaskan itu juga dijumpai oleh Yamashiro dan Iwanaga (1996), yang melakukan penelitian pada bakteri *V. cholerae* non 01 dan non 0139 galur NAGV14. Penyekatan reseptor epitel intestinal kelinci dengan pili yang telah dimurnikan gagal menghambat perlekatan. Kegagalan itu disebabkan oleh pili selain melekat pada reseptor epitel intestinal secara bersamaan juga melekat pada permukaan bakteri. Di samping itu ternyata faktor kolonisasi pada pili NAGV14 berperan penting dalam

agregasi bakteri.

Uji hambatan perlekatan dengan cara menyekat pili bakteri *S. typhi* dengan antibodi antiprotein hemaglutinin sub unit pili 20 kDa dilakukan pada dosis 1:1000; 1:500; 1:100, dan 1:50. Nilai IP berturutan lebih kurang 20,32; 17,423; 14,203, dan 13,710 dengan persentase perlekatan adalah 57,08 ; 48,94; 39,90, dan 38,51%. Nilai IP kontrol positif (perlekatan sel enterosit dengan bakteri *S.typhi*) dan kontrol negatif (antibodi praimunisasi + bakteri *S.typhi* , kemudian + sel enterosit) berturutan adalah 35,600 dan 32,243, dan persentase perlekatannya 100 dan 90,57% (Gambar 4). Hasil uji ANAVA ada perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan praperlakuan ($p < 0,05$), sedangkan diantara kelompok praperlakuan tidak bermakna ($p > 0,05$). Temuan ini menunjukkan bahwa cara menyekat pili bakteri *S. typhi* dengan antibodi antiprotein hemaglutinin sub unit pili 20 kDa dapat menghambat perlekatan pada enterosit intestinal tikus. Peningkatan dosis antibodi antiprotein hemaglutinin sub unit pili 20 kDa dalam menyekat pili bakteri tidak menunjukkan adanya penurunan jumlah bakteri yang melekat pada permukaan enterosit secara nyata. Penghambatan dengan menyekat pili bakteri *S. typhi* dengan antibodi antiprotein hemaglutinin sub unit pili 20 kDa, meskipun secara statistik, baik dengan kelompok kontrol positif maupun negatif, menunjukkan perbedaan bermakna namun penghambatan itu kurang sempurna. Hal ini kemungkinan terkait dengan dosis antibodi antiprotein hemaglutinin sub unit pili 20 kDa yang kurang besar atau faktor perlekatan lainnya.. Hal yang sama juga dijumpai pada bakteri *V. cholerae* non 01 dan non 0139 galur NAGV14. Mekanisme terjadinya hambatan perlekatan itu mungkin karena antibodi antiprotein hemaglutinin melapisi protein hemaglutinin pili dari bakteri *S. typhi*, sehingga kekuatan perlekatan berkurang. Faktor perlekatan lain, kemungkinan berasal dari lipopolisakarida (LPS). Osek dkk. (1996) membuktikan bahwa antibodi anti pili, apabila ditambahkan pada antibodi anti LPS akan memberikan efek perlindungan sinergis terhadap mencit yang diinfeksi *V. cholerae*.



Keterangan:

- I : Kontrol positif (enterosit + *S.typhi*)
- V : Kontrol negatif (enterosit + *S. typhi* + IgY praimunisasi 1:1000)
- VI : Praperlakuan enterosit + IgY 1:1000 + *S.typhi*
- VII: Praperlakuan enterosit + IgY 1:500 + *S.typhi*
- VIII: Praperlakuan enterosit + IgY 1:100 + *S.typhi*
- IX : Praperlakuan enterosit + IgY 1:50 + *S.typhi*

Gambar 4. Histogram perbandingan persen penghambatan akibat menyekat pili *S.typhi* dengan antibodi antiprotein hemaglutinin sub unit pili 20 kDa (IgY).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis data pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa *S. typhi* mempunyai protein sub unit pili 20 kDa yang bersifat hemaglutinin dan berperan dalam perlekatan pada enterosit intestinal tikus.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Lembaga Biologi Molekular Eijkman melalui proyek RISBIN IPTEKDOK atas bantuan dana penelitian yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, 1997. Typhoid Fever dan Salmonellosis in Indonesia. *Third Asia-Pacific Symposium on Thyphoid Fever and Other Salmonellosis*
- Bloch, C.A., and Orndorff, P.E. 1990. Impaired Colonization by and Full Invasiveness of *Escherichia coli* K1 Bearing a Site-Directed Mutation in Type 1 Pilin Gene. *Infect. Immun.* 58:275-278.

- Ehara, M., Ishibashi, M., Watanabe, S., Iwanaga, M., Shimotori, S., and Naito, T. 1986. Fimbriae of *V. cholerae* 01: Observation of fimbriae on the Organism Adherent to the Intestinal Epithelium and Development of New Medium to Enhance Fimbriae Production. *Trop. Med.* 28:21-23.
- Finlay, B.B. and Falkow, S. 1989. *Salmonella* as an Intracellular Parasite. *Mol. Microbiol.* 3(12) 1833-1841.
- Gassman, M., Thommes, P., Weiser, T., and Hubscher, U. 1990. Efficient Production of Chicken Egg Yolk Antibodies Against a Conserved Mammalian Protein. *Faseb* 4:2528-2532
- Hamada, N., Sojar, H.T., Cho, M.I. and Genco, R.J. 1996. Isolation and Characterization of a Minor Fimbriae from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 64:4788-4794.
- Hudson, L. and Hay, F.C. 1989. *Practical Immunology* 3 th. ed. Blackwell Scientific Publication, London.
- Jones, G., Abrahams, G.D. and Freter, R. 1976. Adhesive Properties of *V. cholerae*: Adhesion to isolated Rabbit Brush Border membranes and Hemagglutinating Activity. *Infect. Immun.* 14:232-239.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Protein during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 *Nature* 227:680-685
- Muscas, P., Rossolini, G.M., Chiesurin, A., Santucci, A., and Satta, G. 1994. Purification and Characterization of Type 1 Fimbriae of *Salmonella typhi*. *Microbiol. Immunol.* 38 (5): 353-358.
- Nakasone, N., and Iwanaga, M. 1993. Pili of *Vibrio parahaemolyticus* Strains as a possibly Colonization Factor. *Infect. Immun.* 58: 61-69.
- Osek, J., Jonson, G., Svennerholm, A.M., and Holmgren, J. 1994. Role of Antibodies Against Biotype-Specific *Vibrio cholerae* Pili in Protection Against Experimental Classical and El Tor Cholera. *Infect. Immun.* 62(7): 2901-2907.
- Satta, G., Ingianni, A., Muscas, P.; Rossolini, G.M. and Pompei, R. 1993. The Pathogenicity Determinants of *Salmonella typhi* : Potentiale Role of Fimbrial Structures. In Cabello, F. et al. (ed). *Biology of Salmonella*. Plenum Press. New York.
- Scopes, R.K., 1987. *Protein Purification. Principle and Practice* . 2nd. Springer-Verlag, New York.
- Weiser, M.M. 1973. Intestinal Epithelial Cell Surface Membrane Glycoprotein Synthesis. *J. Biol. Chem.* 248:2536-2541
- Yamashiro, T. and Iwanaga, M. 1996. Purification and Characterization of a Pilus of a *Vibrio cholerae* Strain : A Possible Colonization Factor. *Infect. Immun* 64: 5233-5238.