

# ANALISIS IMUNOGENISITAS PROTEIN 58 kDa *Salmonella typhi*

Sri Darmawati<sup>1</sup>, Syaiful Anwar<sup>2</sup>

1. Laboratorium Mikrobiologi Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang Jl. Kedungmundu Raya No. 18 Semarang. E-mail: ciciekdarma@yahoo.com, Phone: 08122503552
2. Fakultas Peternakan, Universitas Diponegoro, Kompleks Drh. R. Soejono Koesoemowardojo Tembalang, Semarang 50275

## ABSTRAK

Tujuan penelitian untuk mengetahui imunogenisitas protein 58 kDa dari Strain *Salmonella typhi* BA 07.4 dan spesifisitas antibodi yang ditimbulkannya terhadap protein sel bakteri bentuk batang Gram negatif anggota familia *Enterobacteriaceae* dari kultur darah pasien Widal positif (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*). Metode yang digunakan adalah isolasi total protein bakteri, separasi total protein dengan metode SDS-PAGE, isolasi protein 58kDa untuk imunisasi ayam, imunisasi ayam Loghman secara subkutan dilakukan 3 kali, isolasi antibodi poliklonal dari kuning telur ayam, dan immunoblotting. Hasilnya menunjukkan bahwa protein 58kDa dari *Salmonella typhi* BA 07.4 bersifat immunogenik, karena dapat menimbulkan terbentuknya antibodi, tetapi tidak spesifik karena selain mengenali protein 58kDa yang dimiliki oleh *Salmonella typhi* BA07.4, juga bereaksi dengan protein yang dimiliki oleh bakteri anggota familia *Enterobacteriaceae* yang lain (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*)

Kata Kunci: *Salmonella typhi*, protein 58 kDa.

## PENDAHULUAN

*Salmonella typhi* (*S. typhi*) adalah bakteri penyebab demam tifoid. Demam tifoid adalah infeksi sistemik, dengan gejala klinis yang tidak spesifik, sehingga untuk diagnosis nya perlu didukung dengan pemeriksaan laboratorium (Koharo *et al.*, 2010; Ley *et al.*, 2010; Fadeel *et al.*, 2011; Darmawati *et al.*, 2013). Pemeriksaan laboratorium untuk membantu menegakkan diagnosis pasti demam tifoid yaitu kultur darah, tetapi kultur darah membutuhkan waktu cukup lama (tujuh hari), biayanya mahal, tidak banyak tersedia fasilitas untuk kultur, sehingga yang banyak digunakan adalah pemeriksaan serologi seperti Widal, selain itu typhidot M, typhidot, ELISA, Tubex® TF dan Dipstick test. Pemeriksaan serologi membutuhkan waktu singkat, sederhana dan biayanya lebih murah, sehingga banyak digunakan untuk mendukung diagnosis pasti demam tifoid. Pemeriksaan serologi tersebut adalah mendeteksi antibodi IgM ataupun IgG terhadap antigen O9 LPS, antigen 50 kDa, dan antigen LPS, tetapi sensitifitas dan spesifisitas hasil pemeriksaannya sangat bervariasi (Novianti, 2006; Narayanappa *et al.*, 2010). Oleh karena itu perlu dicari alternatif lain antigen yang immunogenik dan antibodi yang ditimbulkannya spesifik hanya bereaksi dengan protein yang dimiliki oleh *S. typhi*.

Darmawati *et al.* (2008) menyampaikan bahwa protein 36 kDa, 45 kDa dari *S. typhi* bersifat immunogenik, tetapi antibodi yang ditimbulkan tidak spesifik, karena dapat mengenali sub unit protein lain yang dimiliki oleh *S. typhi*. Total protein sel bakteri *S. typhi* terdiri dari banyak sub unit protein baik sub unit protein dominan seperti protein 58kDa dan protein minor (Darmawati *et al.*, 2013). Oleh karena itu tujuan penelitian ini untuk menganalisis imunogenisitas dan spesifisitas protein 58 kDa yang dimiliki oleh *S. typhi* BA 07.4 serta menganalisis apakah antibodi yang ditimbulkan oleh protein 58kDa dapat mengenal pula protein sel bakteri bentuk batang Gram negatif yang lain yang termasuk anggota familia *Enterobacteriaceae*.

## METODE

### Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah bakteri *S. typhi* BA 07.4, *S. typhi* KD 30.3, *S. typhi* SA 02.2, *S. typhi* KD 30.4, *S. typhi* NCTC 786, *Escherichia coli* BA 30.5, *Escherichia coli* BA 30.1, *Escherichia coli* BA 30.2, *Serratia marcescens* KD 08.4, *Serratia marcescens* KD 08.5, *Enterobacter cloacae* BA 45.4.1, *Enterobacter cloacae* TG 03.5, *Enterobacter cloacae* KT 16, *Enterobacter cloacae* SA 02.1, *Klebsiella pneumoniae* KD 58.4, yang diisolasi dari darah pasien Widal positif di Kota Semarang pada tahun 2011 (Darmawati *et al.*, 2012) dan *S. typhi* NCTC 786 sebagai strain acuan.

### Isolasi Total Protein *S. typhi* BA 07.4 dan SDS-PAGE

Total protein sel bakteri diperoleh dengan cara: satu koloni bakteri pada media *MacConkey* diinokulasikan pada 100 mL media BHI cair, diinkubasikan 37 °C selama 18 jam. Kultur bakteri selanjutnya disentrifus pada suhu 4 °C dengan kecepatan 3000rpm selama 20 menit, peletnya dicuci dengan 0,1M PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7,4 sebanyak 3 kali. Pelet sel bakteri kemudian ditambah 1,5mL 0,1M PBS pH 7,4, disuspensikan dan disonikasi. Suspensi tersebut kemudian disentrifus pada suhu 4 °C pada kecepatan 12.000rpm selama 20 menit, supernatant yang diperoleh adalah total protein sel bakteri yang siap dipisahkan dengan metode SDS-PAGE (Darmawati *et al.*, 2013).

### Imunisasi dan Isolasi Antibodi dari telur ayam

1). **Imunisasi ayam.** Produksi antibodi poliklonal terhadap protein spesifik dilakukan pada tubuh ayam sesuai metode Gasman *et al.*, 1990 *cit* Darmawati *et al.*, 2008. Imunisasi ayam dilakukan dengan menyuntikkan 1000µl suspensi protein (50µg) dalam PBS secara sub kutan yang dicampur dengan 1000µl adjuvan Freund komplet. Imunisasi diulang pada hari ke 12, kemudian pada hari ke 21 imunisasi diulang dengan 1000µl suspensi protein (50µg) dalam PBS yang dicampur dengan 1000µ adjuvan Freund tidak komplet. Kemudian telur ayam dikumpulkan sampai dengan hari ke 40 setelah imunisasi pertama. Setelah itu dari telur ayam dipanen antibodi poliklonal anti protein hemaglutinin.

2). **Isolasi antibodi poliklonal dari telur ayam.** Kuning telur dipisahkan hati-hati dari putih telurnya, kemudian dicuci dengan akuades dan dihilangkan kulit kuning telurnya. Selanjutnya kuning telur disuspensikan dalam larutan bufer A pH 7,2 (10,0 mM K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, 10,0 mM NaCl) kemudian ditambah larutan 7% PEG 6000 dalam bufer A hingga konsentrasi akhir 3,5 %.

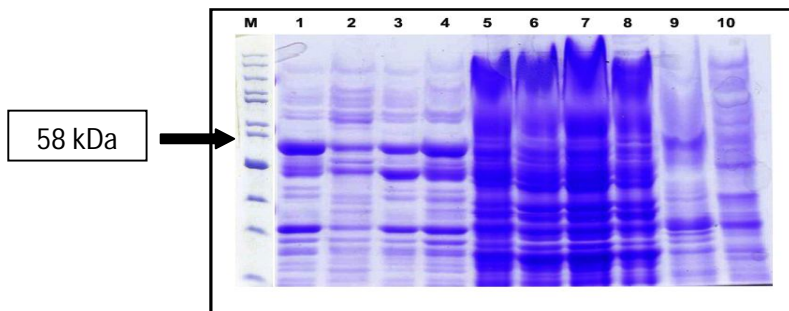
Suspensi tersebut disentrifus 7800 g selama 10 menit pada suhu 4° C, pelet yang mengandung Ig Y ( antibodi ) disuspensikan dalam 10 ml bufer A ( 1:1 ) sehingga konsentrasi akhir PEG adalah 12%. Kemudian larutan disentrifus 7800 g selama 10 menit pada suhu 4° C, pelet selanjutnya disuspensikan dalam 5 ml bufer A (setiap 2 butir telur ayam) dan dilakukan dialisa terhadap bufer A selama 24 jam, larutan dialisa diganti 2 kali. Setelah antibodi didialisa kemudian ditentukan konsentrasi protein dengan metode Bradford (1970) *cit* Darmawati *et al.*, 2008. Selanjutnya keberadaan antibodi anti protein setiap band dari total protein *S. typhi* dideteksi dengan immunoblotting.

### Imunoblotting

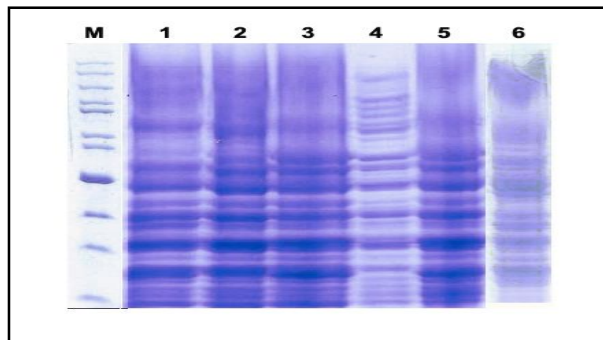
Total protein sel bakteri dipisahkan dengan metode SDS-PAGE (12%), kemudian dilakukan *semi-dry blotting* pada membran PVDF menggunakan BioRad blotter (ATTO version). Deteksi Western menggunakan ECL (Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent)

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil separasi protein sel bakteri bentuk batang Gram negatif (anggota familia *Enterobacteriaceae*) dengan metode SDS-PAGE ditunjukkan pada Gambar 1 dan Gambar 2 yang telah dipublikasikan oleh Darmawati *et al.* (2013)

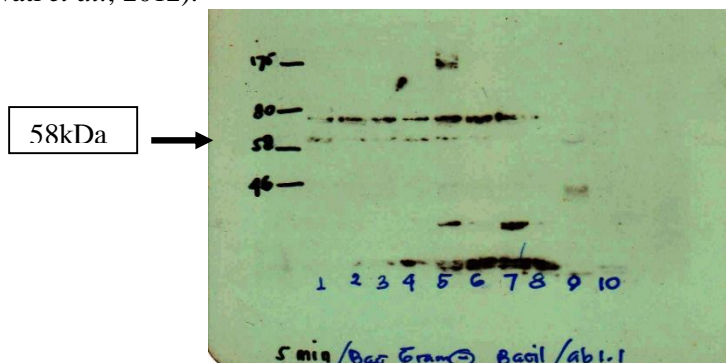


Gambar 1. Visualisasi profil total protein terlarut pada SDS-PAGE 9 strain bakteri anggota familia *Enterobacteriaceae* dan strain acuan *S. typhi* NCTC 786 M) Marker protein, 1) *S. typhi* BA 07.4, 2) *S. typhi* KD 30.3, 3) *S. typhi* SA 02.2, 4) *S. typhi* KD 30.4, 5) *S. typhi* NCTC 786, 6) *Escherichia coli* BA 30.5, 7) *Escherichia coli* BA 30.1, 8) *Escherichia coli* BA 30.2, 9) *Serratia marcescens* KD 08.4, 10) *Serratia marcescens* KD 08.5 (Darmawati *et al.*, 2013)

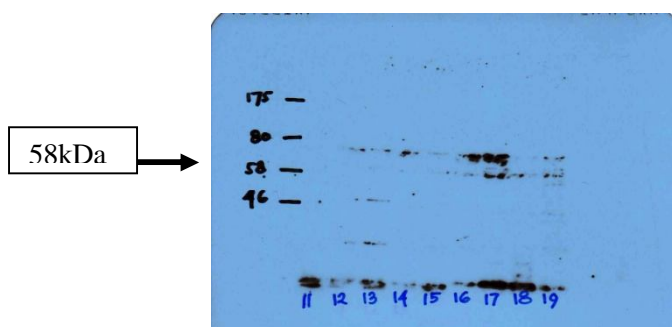


Gambar 2. Total protein sel bakteri anggota familia *Enterobacteriaceae* (M) Marker 1). *Enterobacter cloacae* BA 45.4.1; 2). *Enterobacter cloacae* TG 03.5, 3). *Enterobacter cloacae* KT 16, 4). *Enterobacter cloacae* SA 02.1, 5). *Klebsiella pneumoniae* KD 58.4, 6). *S. typhi* NCTC 786 (Darmawati *et al.*, 2013)

Protein 58kDa yang dimiliki oleh *S. typhi* BA 07.4 bersifat imunogenik, yang ditunjukkan terjadinya reaksi antara antibodi anti protein 58kDa dengan protein 58kDa ditunjukkan pada Gambar 3 dan 4, tetapi reaksi tidak spesifik karena antibodi bereaksi pula dengan protein yang lain yang dimiliki oleh bakteri bentuk batang Gram negatif anggota familia *Enterobacteriaceae* selain *S. typhi* (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*) yang diisolasi dari darah pasien dengan uji Widal positif (Darmawati *et al.*, 2012).



Gambar 3. Immunoblotting antibodi anti protein 58kDa terhadap total protein sel bakteri bentuk batang Gram negatif anggota familia *Enterobacteriaceae* 1) *S. typhi* BA 07.4, 2) *S. typhi* KD 30.3, 3) *S. typhi* SA 02.2, 4) *S. typhi* KD 30.4, 5) *S. typhi* NCTC 786, 6) *Salmonella* sp. BA 30.5, 7) *Escherichia coli* BA 30.1, 8) *Escherichia coli* BA 30.2, 9) *Serratia marcescens* KD 08.4, 10) *Serratia marcescens* KD 08.5



Gambar 4. Immunoblotting antibodi anti protein 58kDa terhadap total protein sel bakteri bentuk batang Gram negatif anggota familia *Enterobacteriaceae* 11) *Ent. cloacae* BA 45.4.1, 12) *Ent. cloacae* Ent. *cloacae* TG 03.5, 13) *Ent. cloacae* KT 16, 4) *Ent. cloacae* SA 02.1, 15) *Kleb. pneumoniae* KD 58.4, 16) *S. typhi* SLT 1, 17) *S. typhi* SRJ, 18) *S. typhi* MG-1, 19) *S. typhi* B

Kejadian ini menunjukkan adanya kesamaan epitop antara protein satu dengan protein yang lain (*sharing epitope*), hal ini senada dengan yang disampaikan oleh Darmawati *et al.* 2008 bahwa antibodi anti protein hemaglutinin sub unit pili 36 kD yang dimiliki oleh *S. typhi* dapat mengenal protein yang lain yang dimiliki oleh *S. typhi*.

### SIMPULAN

Hasil analisis imunogenisitas protein 58kDa *Salmonella typhi* BA07.4 menunjukkan bahwa protein 58kDa bersifat imunogenik, karena dapat menimbulkan terjadinya antibodi, tetapi tidak spesifik karena dapat bereaksi dengan sub unit protein lain yang dimiliki oleh strain bakteri anggota familia *Enterobacteriaceae* selain *S. typhi*, yaitu strain *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* hasil isolasi dari darah pasien Widal positif.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang telah memberikan dana untuk penelitian Hibah Bersaing tahun anggaran 2013 melalui DIPA Kopertis VI Jawa Tengah.

### DAFTAR PUSTAKA

- Darmawati, S. dan Anwar, S. 2008. Karakterisasi Protein Hemaglutinin Sub Unit Pili *Salmonella typhi* Isolat Jawa. Pertemuan Ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia 2008. Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia Cabang Purwokerto
- Darmawati, S. 2012. Keanekaragaman Spesies Bakteri pada Kultur Darah Widal Positif Asal Kota Semarang Berdasarkan Sistematika Polifasik (Desertasi, *in Progress*).
- Darmawati, S. L. Sembiring, W. Asmara, W. T. Artama, S. Anwar., 2013. Chemosystematic of *Enterobacteriaceae* Familia Obtained from Blood Cultures based on Total Protein Profiles. Indonesian Journal of Biotechnology. 18 (1): 58-63
- Fadeel, M. A., B. L. House, M. M. Wasfy, J. D. Klena, E. E. Habashy, M. M. Said, M. A. Maksoud, B. A. Rahman & G. Pimentel. 2011. Evaluation of a newly developed ELISA against Widal, TUBEX-TF and Typhidot for typhoid fever surveillance. *Journal of Infection in Developing Countries*. 5(3): 169-175
- Khoharo, H. K., S. Ansari, F. Qureshi. 2010. Evaluating Single Acute-phase Widal test for the Diagnosis of Typhoid Fever. *Medical Channel*. 16 (1): 42-44
- Ley, B., G. Mtove, K. Thriemer, B. Amos, L. Seidlein, I. Hendriksen. A. Mwambuli, A. Shoo, R. malahiyo, S. M. Ame, D. R. Kim, L. R. Ochial, J. D. Clemens, H. Reyburn, H. Wilfing, S. Magesa & J. L. Deen. 2010. Evaluation of the Widal tube agglutination test for the diagnosis of typhoid fever among children admitted to a rural hospital in Tanzania and a comparison with previous studies. *BioMedCentral Infectious Diseases*. 10:180
- Narayanappa, D., Rachana, Sripathi, K. J. Kumar & H. S. Rajanti. 2010. Comparative Study of Dot Enzyme Immunoassay (Typhidot-M) and Widal Test in the Diagnosis of Typhoid Fever. Short Communication. *Indian pediatrics*. 47: 331-333

Novianti, T. 2006. *Pemeriksaan Anti Salmonella typhi IgM Untuk Diagnosis Demam Tifoid*.  
Informasi Laboratorium. ISSN 0854-7165. No. 5/2006