

Reaksi Silang Antara Antibodi AdhO36 *Salmonella typhi* dengan Outer Membrane Protein *Vibrio cholerae* Menggunakan Metode Western Blotting

Nyoman Artha Megayasa*, Sri Winarsih**, Sanarto Santoso**

ABSTRAK

Pada penelitian terdahulu dilaporkan bahwa *Salmonella typhi* memiliki antibodi AdhO36 yang memberikan protektivitas yang bermakna dalam menghambat perlekatan *Salmonella typhi* pada usus mencit. *Vibrio cholerae* adalah agen penyebab infeksi usus akut yang dikenal sebagai kolera. *Vibrio cholerae* dilaporkan memiliki outer membrane protein (OMP) dengan berat molekul yang mirip dengan protein AdhO36. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya reaksi silang antara antibodi AdhO36 *Salmonella typhi* dengan OMP *Vibrio cholerae*. Penelitian ini menggunakan studi eksploratif laboratorium dengan cara western blotting. Hasil yang diperoleh menunjukkan terdapat 3 pita protein dengan berat molekul sekitar 107 kDa, 74 kDa dan 38 kDa dari OMP *Vibrio cholerae* yang bereaksi dengan antibodi AdhO36. Penelitian ini menyimpulkan bahwa OMP *Vibrio cholerae* telah terbukti merespon antibodi AdhO36 *Salmonella typhi*. Berdasarkan hasil penelitian ini, disarankan agar dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek imunisasi protein AdhO36 *Salmonella typhi* terhadap perlekatan bakteri *Vibrio cholerae* di organ intestinal mencit.

Kata kunci: AdhO36, Outer membrane protein (OMP), *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, Western blotting.

Cross Reaction between AdhO36 Antibody of *Salmonella typhi* with Outer Membrane Protein of *Vibrio cholerae* Using Western Blotting Method

ABSTRACT

In previous studies, it is reported that *Salmonella typhi* has AdhO36 antibody that provide significant protectivity in preventing the adherence of *Salmonella typhi* in mice intestine. *Vibrio cholerae* is the causative agent of acute intestinal infection known as cholera. *Vibrio cholerae* is reported to have outer membrane protein (OMP) with a molecular weight similar to AdhO36 protein. This study aimed to determine the presence or absence of cross reaction between AdhO36 antibody *Salmonella typhi* with *Vibrio cholerae*'s OMP. Explorative laboratory study is used with western blotting method. The results showed that there are three bands of protein with a molecular weight around 107 kDa, 74 kDa and 38 kDa of *Vibrio cholerae*'s OMP that reacts with AdhO36 antibody. The conclusion of this study is that *Vibrio cholerae*'s OMP has shown to respond towards AdhO36 antibody of *Salmonella typhi*. Based on these results, it is suggested that further research should be done to determine the immunization effects of AdhO36 protein against the adherence of bacterium *Vibrio cholerae* in mice intestine.

Keywords: AdhO36, Outer membrane protein (OMP), *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, Western-blotting.

* Program Studi Pendidikan Dokter, FKUB

** Lab Mikrobiologi, FKUB

PENDAHULUAN

Salmonella typhi merupakan bakteri Gram-negatif yang terdapat di dalam saluran pencernaan manusia dan termasuk dalam keluarga Enterobacteriaceae. Bakteri ini bersifat motil dan juga anaerob fakultatif, hal ini menyebabkan bakteri tersebut mudah terpengaruhi oleh antibiotik. Sampai saat ini, 107 strain bakteri ini telah di isolasi, banyak diantaranya yang memiliki karakter metabolis yang berbeda-beda, tingkat virulensinya, dan juga resistensi terhadap banyak obat yang menyebabkan penelitian terus berkembang. Cara identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media *bismuth sulfite agar* (BSA).¹

Selain itu, *Salmonella typhi* merupakan patogen yang memiliki sifat fakultatif intraseluler serta memiliki mekanisme adaptif sehingga dapat hidup di dalam makrofag. Hal ini dapat menyebabkan bakteri menyebar dan kemudian menyebabkan infeksi sistemik yang dikenal dengan nama demam tifoid.²

Demam tifoid merupakan salah satu penyakit infeksi endemik di Asia, Afrika, Amerika Latin, Karibia, dan Oceania, termasuk negara-negara yang sedang berkembang seperti Indonesia. Penyakit infeksi yang ditularkan melalui makanan dan minuman ini, disebabkan oleh kuman *S. typhi*. Insiden demam tifoid di seluruh dunia menurut data *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2003 sekitar 17 juta per tahun, dengan insidensi 600.000 kasus kematian tiap tahun.¹ Pada tahun 2000, diperkirakan terdapat lebih dari 2,16 juta kasus demam tifoid terjadi di seluruh dunia, yang mengakibatkan 216.000 kematian, dimana lebih dari 90 % dari morbiditas dan kematian terjadi di Asia.² Profil kesehatan Indonesia tahun 2008 menunjukkan angka 600 ribu sampai 1,5 juta kasus demam tifoid setiap tahun. Penyakit ini menempati urutan ke-15 dari penyakit mematikan di Indonesia.

Dalam usaha melakukan pencegahan terhadap demam tifoid, maka dibuatlah vaksin untuk pencegahan penyakit ini. Saat ini terdapat 3 jenis vaksin yang telah disediakan yaitu Ty21a, ViCPS (*Vi capsular polysaccharide*) dan *inactivated typhoid vaccine*, yang telah diuji secara luas dan masing-masing menunjukkan keuntungan

dan kerugian.³ Pengembangan vaksin saat ini telah maju dengan pesat, kemungkinan permukaan bakteri yang disebut dengan adhesin sebagai target dalam pengembangan vaksin tengah diteliti. Sebagai contoh vaksin adhesin yang sudah digunakan di klinik adalah vaksin terhadap penyakit pertusis.⁴ Keuntungan yang didapat dari vaksin mukosal berbasis protein adhesin, yaitu pemberiannya mudah (oral), dan imunogenik tetapi tidak toksik karena imunogennya bukan toksin atau materi toksik dari bakteri.⁵

Pada penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa *Salmonella typhi* memiliki protein adhesin yang berasal dari OMP dengan berat molekul sekitar 36 kDa dan diberi nama AdhO36. Pada penelitian tersebut dilaporkan juga bahwa imunisasi protein AdhO36 melalui oral memberikan protektivitas yang bermakna dalam menghambat perlekatan *Salmonella typhi* pada usus mencit.⁶ Dari hasil penelitian tersebut, protein AdhO36 dikatakan potensial untuk diteliti lebih lanjut untuk pengembangan vaksin demam tifoid.

Mekanisme vaksin oral berbasis adhesin ini adalah ketika antigen masuk ke dalam tubuh maka tubuh akan membentuk *mucosal immunity*. *Mucosal immunity* yaitu suatu bentuk imunitas yang bekerja di permukaan mukosa untuk mencegah terbentuknya koloni bakteri dengan melibatkan antibody IgA sebagai komponen utama. IgA akan mengikat patogen sehingga patogen tidak bisa menempel pada reseptor yang ada di permukaan sel epitel pada mukosa usus.⁷

Vibrio cholerae adalah bakteri Gram-negatif yang berbentuk batang, berasal dari keluarga gammaproteobacteria dan agen penyebab infeksi usus akut yang dikenal sebagai kolera.⁸ *Vibrio cholerae* menyebabkan kolera pada manusia melalui kolonisasi usus dan elaborasi dari enterotoksin yang kuat dikenal sebagai toksin kolera. Meskipun imunitas antitoksin memainkan peranan penting dalam perlindungan terhadap kolera, imunitas antibakteri tampaknya lebih penting. Kelas IgA sekretori antibodi dipercaya untuk bertindak melalui penghambatan lampiran usus dan kolonisasi *Vibrio cholerae*. Namun,

identifikasi gugus permukaan sel dari *Vibrio cholerae* yang bertanggung jawab atas perlekatan organisme terhadap epitel usus tetap sukar dipahami sejauh ini.⁹

Metode *western blotting* adalah metode yang mereaksikan antibodi spesifik dengan antigen, dan metode ini telah rutin digunakan untuk analisis protein. *Blotting* berarti memindahkan sampel dari gel elektroforesis ke membran nitroselulosa dan dilakukan dengan antibodi pada permukaan membran. Pada penelitian ini juga ingin diketahui apakah ada reaksi silang antara OMP *Vibrio cholerae* dengan protein AdhO36 *Salmonella typhi*, yang berarti ingin mendeteksi reaksi antigen antibodi.

Pada bakteri patogen Gram-negatif, lapisan luar membran memainkan sebuah peran penting pada infeksi dan tingkat patogenisitasnya kepada inang. Lapisan membran luar bakteri pada dasarnya tersusun atas protein, lemak, dan gula yang dapat dengan mudah dikenali sebagai unsur zat asing pada sistem pertahanan tubuh inang. Diantara komponen ini, protein membran memiliki peranan rumit pada banyak proses sel dan fisiologi, dimana sangat menarik digunakan untuk dikembangkan sebagai kandidat vaksin.¹⁰

Berdasarkan laporan sebelumnya, *Vibrio cholerae* memiliki *outer membrane protein* (OMP) dengan massa molekul subunit dari 48 ke 50, 40-43, 35-36, 27 hingga 28, dan 20 kDa.⁹ Hal ini menyimpulkan bahwa terdapat sedikitnya 3 persamaan antara bakteri *Salmonella typhi* dengan *Vibrio cholerae* yaitu merupakan bakteri Gram-negatif, berbentuk batang dan juga memiliki protein adhesin yang berasal dari OMP dengan berat molekul sekitar 36 kDa. Oleh karena itu ingin diteliti apakah ada reaksi silang antara antibodi AdhO36 *Salmonella typhi* dengan OMP *Vibrio cholerae*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya reaksi silang antara antibodi AdhO36 *Salmonella typhi* dengan OMP *Vibrio cholerae*.

BAHAN DAN METODE

Desain penelitian yang digunakan adalah eksploratif laboratorium. Reaksi silang dilakukan secara *in vitro* dengan

menggunakan metode *western blotting*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Desember 2010 hingga September 2011.

Antibodi AdhO36 *Salmonella typhi* diperoleh dari penelitian terdahulu yang telah dilakukan oleh Winarsih (2010).⁶ Bakteri *Vibrio cholerae* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Brawijaya, Malang.

Prosedur penelitian yang pertama kali dilakukan adalah isolasi *Vibrio cholerae*, yaitu dengan menambahkan bahan ke air dengan pH 8,5 dalam larutan NaOH 3N, kemudian didistribusikan dan diautoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media disimpan pada suhu 4 °C selama 6 jam dalam keadaan tertutup rapat untuk mencegah terjadinya penguapan atau penurunan pH. Ketika diinokulasikan ke dalam APW, *Vibrio cholerae* akan menunjukkan pertumbuhan yang baik pada 6 sampai 8 jam.

Kultur *Vibrio cholerae* dibuat dengan cara media harus dihangatkan sampai suhu kamar sebelum diinokulasi, lalu spesimen diinokulasi langsung ke agar TCBS sehingga dapat diperoleh koloni yang terisolasi. Bakteri diinkubasi aerobik pada suhu 35 °C selama 18-24 jam. *Vibrio cholerae* akan menunjukkan pertumbuhan yang baik dengan koloni berwarna kekuningan. Setelah itu dilakukan pengecatan Gram untuk identifikasi ulang bakteri Gram negatif.

Tahap selanjutnya adalah isolasi Omp *Vibrio cholerae*, dengan cara biakan cair dari tempat perkembangbiakan *Vibrio cholerae*, ditambahkan TCA dengan konsentrasi 3 % untuk mengendapkan suspensi bakteri. Lalu dirotator selama 1 jam, dengan diberi kocokan setiap 10 menit. Media cair tersebut lalu dituang pada tabung *mini mixer* lalu disentrifugasi pada 4 °C 6.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang, diambil pelet saja lalu cuci dengan larutan PBS dan dihomogenkan dengan cara diaduk dan dipipet. Kemudian disentrifugasi dan diulang hingga supernatan menjadi bening. Cairan supernatan kemudian ditambahkan deterjen CHAPS dengan konsentrasi 5 % perbandingan 1:1. Campuran divorteks

selama 5 menit untuk mereaksikan CHAPS dengan pelet. Kemudian dilakukan sentrifugasi pada suhu 4 °C 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang merupakan OMP dipindahkan ke dalam tabung sentrifus, lalu disimpan di -20 °C. Berikutnya adalah tahap SDS-PAGE yang diawali dengan pembuatan gel. *Separating gel* 12,5 %. dibuat dengan cara mencampurkan:

Acrylamida 30%	2063 µL
Tris-CL 1,5M pH 8,8	1250 µL
dd H2O	1635 µL
SDS 10%	50 µL
APS 10%	50 µL
TEMED	10 µL

Campuran segera dituang kedalam *plate* pembentuk gel menggunakan mikro pipet 1 ml (dijaga jangan sampai terbentuk gelembung udara) sampai batas yang terdapat pada *plate*. Perlahan tambahkan aquades diatas larutan gel dalam *plate* agar permukaan gel tidak bergelombang. Biarkan gel memadat selama kurang lebih 30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan diantara batas air dan gel yang terbentuk) setelah itu, air yang menutup *separating gel* dibuang. Setelah *separating gel* memadat, *stacking gel* 3 % disiapkan dengan cara yang sama pada prosedur diatas dengan volume larutan:

Acrylamida 30%	257,5 µL
Tris-CL 1,5M pH 6,8	312,5 µL
dd H2O	662,5 µL
SDS 10%	12,5 µL
APS 10%	3,75 µL
TEMED	2,5 µL

Kemudian tuang *stacking gel*. Pasang sisir tempat penyuntikan sampel, kemudian biarkan beberapa lama hingga gel memadat, setelah itu lepas sisir. Gel dalam *plate* dipasang pada alat elektroporesis. Tuang *running buffer*.

Tahap kedua adalah injeksi sampel dan *running*, yaitu sampel diambil dengan pipet sebanyak 15 µl kemudian dimasukan kedalam eppendorf, kemudian ditambahkan dengan 15 µl RSB dan dipanaskan pada suhu 100 °C selama 5 menit. Lalu

didinginkan pada suhu kamar. Sampel disuntikan sebanyak 10-20 µl kedalam sumuran secara hati-hati dengan menggunakan pipet. Untuk memulai *running*, hubungkan perangkat elektroforesis dengan power supply dengan arus pada 20 mA tegangan 120 V selama 90 menit.

Tahap ketiga yaitu pewarnaan gel. Untuk tahap ini diperlukan larutan pewarna untuk mewarnai protein pada gel dan larutan *destaining* untuk pencucian atau menghilangkan warna pada gel dan memperjelas pita protein. Gel direndam di dalam 20 ml larutan *comassie blue* sambil digoyang selama 20 menit. Kemudian gel direndam dalam larutan *destaining* sambil digoyang selama 20 menit.

Tahap terakhir adalah *western blotting*, dengan cara merendam membran nitrocellulose dan gel elektroforesis SDS-PAGE masing-masing dalam transfer buffer selama 30 menit dengan digojog pelan. Alat Trans – Blot Semi Dry “Bio Rad” diset, lalu kertas saring, membran nitrocellulose, Gel SDS-PAGE, kertas saring disusun sandwich (urutan dari bawah ke atas). Proses transfer dilakukan pada 300 mA, 20 Volt selama 120 menit. Setelah itu NC dicuci dengan aquades, direndam dalam ponceau kurang lebih 1 menit dan dibilas aquades untuk konfirmasi keberhasilan transfer. Lalu membran *diblocking* dengan TBS – skim milk 5 %, diinkubasi semalam pada suhu 4 °C. Keesokan harinya, membran dibiarkan pada suhu ruang dengan digojog. Membran dicuci dengan TBS - Tween 0,05 %, 3x5 menit, digojog pelan. Inkubasi dengan Ab primer (AdhO36) yang dilarutkan dalam TBS – skim milk 0,5 % selama 120 menit pada suhu ruang. Membran dicuci kembali dengan TBS – tween 0,05 % selama 3x5 menit, digojog pelan. Membran diinkubasi dengan Ab sekunder yang dilarutkan dalam TBS selama 60 menit pada suhu ruang. Cuci NC dengan TBS – tween 0,05 % selama 3x5 menit, digojog pelan. Inkubasi dengan SAHRP – tween selama 40 menit pada suhu ruang. Membran dicuci kembali dengan TBS – tween 0,05 % selama 3x5 menit, digojog pelan. Membran diinkubasi dengan substrat TMB sampai muncul pita protein lalu distop

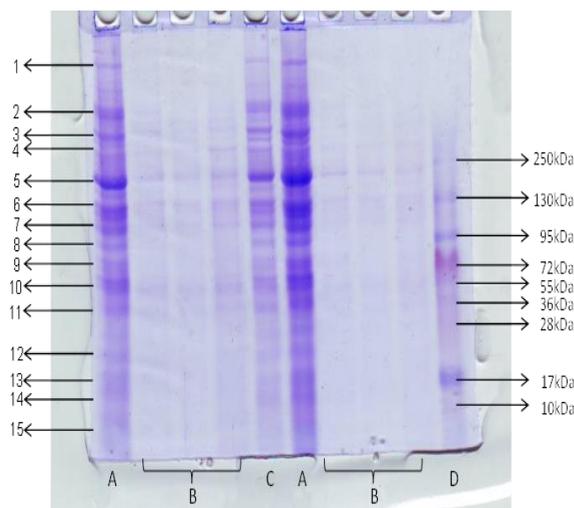
dengan penambahan ddH₂O. Membran dikering anginkan, kemudian dipindai.

HASIL

Bakteri *Vibrio cholerae* ditumbuhkan secara konvensional menggunakan media TCBS yang ditunjukkan dengan munculnya koloni yang datar berwarna kuning sebagai *Vibrio cholerae*. Sampel bakteri telah dikonfirmasi sebagai bakteri *Vibrio cholerae* dengan memperlihatkan koloni yang berwarna kuning (sukrosa positif) dan memperlihatkan morfologi sebagai bakteri gram negatif, berbentuk batang.

Elektroforesis dan perhitungan BM dilakukan dengan tujuan untuk mengidentifikasi berat molekul bakteri *Vibrio cholerae* dengan menggunakan metode elektroforesis. Berdasarkan hasil elektroforesis dengan pewarnaan *commassie blue*, diperoleh gambaran *band* (pita) dalam satuan berat molekul kDa (Gambar 1). Berat molekul (BM) pita rotein sampel ditentukan dengan membandingkan antara BM marker dengan Rf. Selanjutnya dibuat kurva standar

dengan nilai Rf sebagai sumbu Y dan nilai logaritma berat molekul sebagai sumbu X. Berdasarkan perhitungan antara BM dan Rf dengan menggunakan regresi linear, diperoleh persamaan : $Y = -0,4199x + 1,3217$, yang digunakan untuk menentukan nilai BM sampel. Penghitungan berat molekul masing-masing sampel didapat dari anti-log X yang sebelumnya nilai Rf sampel dikonversikan ke dalam persamaan regresi linear. Hasil analisis di atas dapat disimpulkan setiap perubahan x sebesar satuan, maka y akan mengalami kenaikan satu satuan. Misal $x = 1$, akan mempengaruhi perubahan y sebesar $1,3217 - 0,4199$. Koefisien determinasi (R^2) untuk melihat apakah suatu model regresi yang dicocokkan sudah memadai dan dapat mengukur proporsi dari jumlah variasi yang dapat diterangkan dengan model regresi. R^2 bernilai 99,3 % menunjukkan bahwa 99,3 % proporsi keragaman nilai peubah Y (Rf) dapat dijelaskan oleh nilai peubah X (Log BM) melalui hubungan linier sedangkan sisanya 0,7 % dijelaskan oleh hal yang lain.



Gambar 1. Hasil elektroforesis *Vibrio cholerae*

Keterangan: sumur A = *whole cell*, sumur B = OMP, sumur C = *Pellet*, sumur D = Marker

Analisis korelasi adalah analisis terhadap kekuatan hubungan antara variabel X dengan variabel Y. Analisis korelasi akan menunjukkan apakah peningkatan X akan menyebabkan turunnya Y, atau peningkatan X tidak mempengaruhi besarnya Y. Kekuatan hubungan antara X dan Y untuk selanjutnya akan ditunjukkan dengan satu bilangan yang disebut dengan koefisien korelasi (R). R merupakan suatu ukuran hubungan antara

dua variabel dimana bila R mendekati 1, hubungan antara kedua variabel kuat, dan dikatakan terdapat korelasi yang tinggi antara keduanya. Bila R mendekati nol, hubungan linier antara X dan Y sangat lemah. Pada hasil penelitian, didapatkan $R = 0,996$ dengan menggunakan rumus akar kuadrat dari R^2 . Sehingga dapat disimpulkan bahwa hubungan linier antara Log BM dan Rf sangat kuat.

Pada hasil penelitian berdasarkan penghitungan persamaan regresi dari marker protein untuk menentukan berat molekul protein *Vibrio cholerae* diketahui 15 fraksi protein yaitu: BM 847, 469-510, 335, 283, 185, 132, 103, 87, 73, 48-52, 34-37, 23, 16, 12-13, 8-9 (kDa)

Pada hasil penelitian berdasarkan penghitungan persamaan regresi dari marker protein untuk menentukan berat molekul OMP *Vibrio cholerae* diketahui 9 fraksi protein yaitu: BM 469-510, 364-396, 283, 185-202, 132-144, 102-112, 73, 48-52, 34-37 (kDa).

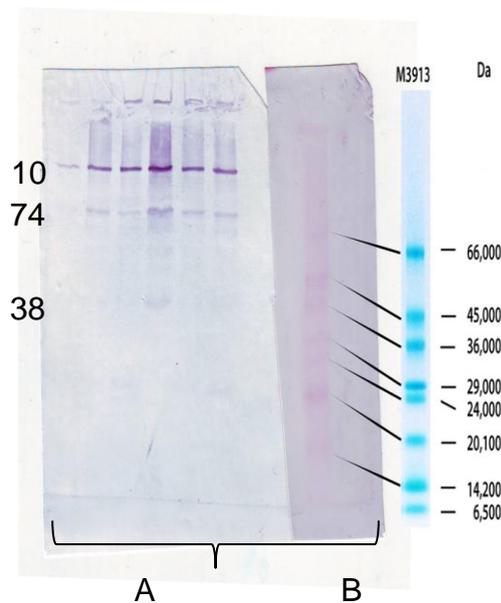
Western blotting dan perhitungan BM dilakukan dengan tujuan untuk mengidentifikasi ada atau tidaknya reaksi

silang antara protein AdhO36 *Salmonella typhi* dengan OMP *Vibrio cholerae*. Berdasarkan hasil *western blotting*, diperoleh gambaran band (pita) dalam satuan berat molekul kDa (Gambar 2).

Penentuan molekul relatif dilakukan dengan bantuan protein marker. Menentukan molekul relatif protein dilakukan dengan menghitung nilai *retardation factor* (Rf) dari masing-masing pita dengan rumus :

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan pelarut dari tempat awal}}$$

Penentuan BM pita protein hasil *western blotting* sama dengan penentuan BM hasil SDS-PAGE.



Gambar 2. Deteksi reaksi silang antara protein AdhO36 *Salmonella typhi* dengan OMP *Vibrio cholerae* dengan *western blotting*. Keterangan: Sumur A = OMP *Vibrio cholerae* yang bereaksi dengan antibodi AdhO36 *Salmonella typhi*, Sumur B = Protein Marker.

Berdasarkan perhitungan antara BM dan Rf dengan menggunakan regresi linear diperoleh persamaan : $Y = -0,6279x + 1,4847$. Hasil analisis di atas dapat disimpulkan setiap perubahan x sebesar satu, maka y akan mengalami kenaikan perubahan y sebesar 1,4847-0,6279. R² bernilai 99,6% menunjukkan bahwa 99,6% proporsi keragaman nilai peubah Y (Rf) dapat dijelaskan oleh nilai peubah X (Log BM) melalui hubungan linier sedangkan sisanya 0,4% dijelaskan oleh hal-hal yang

lain. Pada hasil penelitian, didapatkan R= 0,998 dengan menggunakan rumus akar kuadrat dari R². Sehingga dapat disimpulkan bahwa hubungan linier antara Log BM dan Rf sangat kuat.

Pada hasil penelitian berdasarkan penghitungan persamaan regresi dari marker protein untuk menentukan berat molekul protein *Vibrio cholerae* yang bereaksi dengan antigen AdhO36 *Salmonella typhi* diketahui 3 fraksi protein yaitu: 100 kDa, 74 kDa dan 38 kDa.

PEMBAHASAN

Bakteri *Vibrio cholerae* mempunyai *outer membrane protein* dengan reseptor yang mempunyai fungsi dalam mekanisme pertahanan hidup. Dengan metode *western blotting* didapatkan tiga OMP pada bakteri *Vibrio cholerae* yang terbukti merespon antibodi AdhO36. Setelah dihitung menggunakan persamaan regresi dari marker protein, didapatkan berat molekul yang berbeda; 100 kDa, 74 kDa, dan 38 kDa.

Protein dengan berat molekul 100 kDa atau disebut juga protein subunit translokase SecA adalah bagian dari kompleks protein translokase Sec yang berinteraksi dengan saluran preprotein SecYEG. Protein ini memiliki peran sentral dalam kopling hidrolisis ATP untuk transfer protein ke dalam dan melintasi membran sel, baik sebagai reseptor untuk kompleks preprotein-SecB dan sebagai motor molekul ATP-driven translokasi bertahap dari rantai polipeptida di membran.

Protein subunit translokase SecA memiliki peran sentral dalam kopling hidrolisis ATP untuk transfer protein ke dalam dan melintasi membran sel yang berguna bagi asupan nutrisi *Vibrio cholerae*. Ini berarti bahwa apabila protein ini berikatan dengan antibodi AdhO36, maka bakteri *Vibrio cholerae* akan kehilangan kemampuan untuk menghidrolisis ATP dan mentransfer protein ke dalam dan melintasi membran sel. Tanpa adanya protein untuk nutrisi, maka *Vibrio cholerae* tidak akan dapat bertahan hidup.

Vibrio cholerae mempunyai mekanisme untuk memperoleh zat besi pada lingkungan rendah zat besi. Mekanisme tersebut adalah memproduksi vibriobactin yang berguna dalam mengikat zat besi secara ekstraseluler dan mentransportasikannya ke dalam sel melalui reseptor yang spesifik. Protein dengan berat 74 kDa merupakan reseptor vibriobactin yang diperlukan untuk transportasi vibriobactin dan berfungsi sebagai reseptor *ferric vibriobactin complexes*.¹¹

Untuk menunjang kehidupan *Vibrio cholerae* dalam lingkungan rendah zat besi, vibriobactin perlu bereaksi dengan reseptor vibriobactin. Namun, antibodi AdhO36

menghambat proses tersebut dengan cara berikatan dengan reseptor vibriobactin. Tanpa adanya reseptor vibriobactin yang diperlukan oleh vibriobactin sebagai alat transportasi, maka *Vibrio cholerae* akan kehilangan kemampuannya untuk hidup dalam lingkungan rendah zat besi.

Protein dengan berat molekul 38 kDa atau dapat disebut juga Porin OmpU, mempunyai peran dalam pengangkutan zat terlarut hidrofilik dalam tes pembengkakan liposom dan dianggap *general diffusion porins* yang memungkinkan hanya setiap zat terlarut dengan ukuran tertentu untuk menyeberangi membran. Karena porin adalah protein membran luar yang utama, mereka juga berfungsi sebagai situs reseptor untuk mengikat fages dan bakteriosin.¹²

Porin OmpU memiliki peran sebagai situs reseptor untuk mengikat fages dan bakteriosin. Hal ini berarti apabila antibodi AdhO36 bereaksi dengan OmpU, maka fages dan bakteriosin yang berfungsi sebagai pembunuh bakteri akan kehilangan target reseptor untuk diserang. Mengakibatkan *Vibrio cholerae* kebal terhadap serangan fages dan bakteriosin. Namun, porin OmpU memiliki peran dalam asupan nutrisi *Vibrio cholerae*. Dengan berikatannya antibodi AdhO36 pada porin OmpU maka *Vibrio cholerae* akan kehilangan asupan nutrisinya yang berguna bagi kelangsungan hidup *Vibrio cholerae*. Ini berarti, walaupun *Vibrio cholerae* tidak dapat diserang oleh fages dan bakteriosin, *Vibrio cholerae* tetap tidak akan dapat bertahan hidup tanpa adanya nutrisi yang berguna untuk kelangsungan hidupnya.

Dari beberapa pita protein OMP *Vibrio cholerae*, yang jelas menunjukkan reaksi silang dengan antibodi AdhO36 adalah pita protein dengan berat molekul sekitar 100 kDa, 74 kDa, dan 38 kDa. Protein dengan berat molekul 100 kDa dan 74 kDa tampak sebagai gabungan dari protein dengan berat molekul 38 kDa. Sehingga ada kemungkinan OMP dengan berat molekul 100 kDa dan 74 kDa memiliki antigen yang sama dengan OMP dengan berat molekul 38 kDa.

Antibodi AdhO36 *Salmonella typhi* merespon tiga OMP dari bakteri *Vibrio cholerae* yang mempunyai berat molekul sekitar 100 kDa, 74 kDa, dan 38 kDa. Namun

penelitian ini belum memberikan informasi mengenai hambatan perlekatan bakteri di mukosa mengingat bahwa antibodi AdhO36 *Salmonella typhi* ini memicu terbentuknya imunitas mukosa. Sehingga belum diketahui efek antibodi AdhO36 sebagai vaksin demam tifoid dan vaksin kolera.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dengan metode *western blotting* menggunakan antibodi AdhO36 *Salmonella typhi* dengan OMP *Vibrio cholerae*, diperoleh kesimpulan yaitu ada reaksi silang antara antibodi AdhO36 *Salmonella typhi* dengan OMP *Vibrio cholerae*, dan berat molekul OMP *Vibrio cholerae* yang merespon antibodi AdhO36 yaitu sekitar: 100 kDa, 74 kDa, dan 38 kDa.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek imunisasi Protein AdhO36 *Salmonella typhi* terhadap perlekatan bakteri *Vibrio cholerae* di organ intestinal mencit.

DAFTAR PUSTAKA

1. [WHO] World Health Organization. Background Document: the Diagnosis, Treatment and Prevention Of Typhoid Fever. Geneva: World Health Organization. 2003.
2. Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The Global Burden of Typhoid Fever. *Bulletin of World Health Organization*. 2004; 82(5).
3. Wirahardja RS. Vaccination as a Public Health Tool of Typhoid Fever Prevention and Control. *Jurnal Kedokteran YARSI*. 2003; 11(1):67-76.
4. Wizemann TM, Adamou JE, Langermann S. Adhesins as Targets for Vaccine Development. *Emerging Infectious Diseases*. 1999; 5(3):395-403.
5. Santoso S. Protein Adhesin *Salmonella typhi* sebagai Faktor Virulensi Berpotensi Imunogenik pada Produksi S-IgA Protektif : Penelitian Eksperimental Laboratoris. ADLN Digital Collections. 2008.
6. Winarsih S, Santoso S, Sumarno. Adhesin AdhO36 *Salmonella typhi* as a Potential Candidate Oral Vaccine for Typhoid Fever. Bandung: Pertemuan Ilmiah Tahunan PAMKI. 2010.
7. Noor R. Mukosa Imun System. 2010. (online). <http://id.shvoong.com/medicine-and-health/imunology/2066419-mukosa-imun-sistem/>. Diakses 3 April 2011
8. Lowden MJ, Skorupski K, Pellegrini M, Chiorazzo MG, Taylor RK, Kull FJ. Structure of *Vibrio cholerae* ToxT Reveals a Mechanism for Fatty Acid Regulation of Virulence Genes. *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, Early Edition. 2010; 107(7): 2860-2865.
9. Sengupta DK, Sengupta TK, Ghose AC. Major Outer Membrane Proteins of *Vibrio cholerae* and Their Role in Induction of Protective Immunity Through Inhibition of Intestinal Colonization. *Infection and Immunity*. 1992; 60(11):4848-4855.
10. Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Arico B, Comanducci M, Giuliani MM. Identification of Vaccine Candidates Against Serogroup B Meningococcus by Whole-Genome Sequencing. *Science Magazine*. 2004; 287:1816-1820.
11. Stoebner JA, Butterson JR, Calderwood SB, Payne SM. Identification of the Vibriobactin Receptor of *Vibrio cholerae*. *J. of bacteriol.* 1992; 174(10):3270-3274.
12. Simonet V, Basle A, Klose K, Delcour A. The *Vibrio cholerae* Porins OmpU and OmpT Have Distinct Channel. *J of Biol Chem*. 2003; 278:17539-17545.

