

KARAKTERISASI MOLEKULER PROTEIN FLAGELLIN *Salmonella typhi* ISOLAT JAWA TENGAH DAN YOGYAKARTA

Sri Darmawati¹, Budi Santosa², Ragil Saptaningtyas³

^{1,2,3} Nursing and Health Faculty, Muhammadiyah University of Semarang
ciciekdarma@yahoo.com, budi_unimus@yahoo.co.id, ragiltyastyus@yahoo.com

Abstract

The purpose of this study is to molecularly characterize 7 strains of flagellin proteins of *Salmonella typhi* isolates taken from Central Java (5 strains from Semarang, 1 strain from Salatiga, 1 strain from Magelang) and 2 isolate strains from Yogyakarta (1 strain from Doctor Sarjito Hospital, and 1 strain from Bethesda Hospital). Flagellin gene (*fliC*) amplification is conducted using PCR (primer LPW 1856 and LPW 1857). Flagellin proteins resulted from Alexan method (2009) is then modified while flagellin protein profiles are obtained with SDS-PAGE method. The results show that the size of flagellin gene (*fliC*) of *S. typhi* Isolates from Salatiga and the 8 other strains is respectively 1262bp and 1500bp. Flagellin proteins which are composed of 2-6 protein sub-units consist of 1-2 major proteins and 1-4 minor proteins with the sizes of 16-116 kDa.

Keywords: *Salmonella typhi*, flagellin, Molecular Characterizations

1. PENDAHULUAN

Salmonella typhi (*S. typhi*) adalah bakteri penyebab penyakit infeksi sistemik pada manusia yaitu demam tifoid. Patogenitasnya sangat tergantung pada sejumlah faktor virulensi, seperti kemampuan untuk adhesi (melekat) pada sel *host*, flagella, enzim, toksin, faktor bioaktif, yang akan memfasilitasi bakteri untuk melekat pada mukosa usus halus, invasi, multiplikasi dan menyebar masuk ke jaringan limfoid sampai ke aliran darah dan beredar ke seluruh tubuh sampai pada hati, sumsum tulang, limfa, kandung empedu dan *Peyer's patch* (Jindal et al. 2012; Alexan et al. 2009).

Flagella tersusun dari sub unit protein flagellin, pada beberapa bakteri berperan penting pada kehidupannya, berfungsi sebagai alat gerak dan dapat membantu bakteri untuk masuk ke dalam sel *host* (Hatta et al. 2011). Sub unit flagellin merupakan target yang dapat dikenali oleh sistem imun alamiah tubuh melalui Toll-like Receptor (TLR) 5 (Baker et al. 2007). Selain itu flagellin mampu menstimulasi sistem imun adaptif (Alexan et al. 2009). Sebagian besar *S. typhi* hanya memiliki gen antigen flagellin yaitu *fliC* yang mengkode antigen flagel fase 1 (H-d antigen),

namun *S. typhi* isolat Indonesia mengekspresikan H-j antigen yang dikenal dengan antigen flagel $z66$ (antigen flagel fase 2) yang dikode oleh gen *fljB^{z66}* yaitu gen *fliC* yang mengalami delesi pada *hypervariable core region* yang berada pada linear plasmid (Hatta et al. 2011). Berdasarkan gen flagellin yang dimiliki *S. typhi* di Indonesia, tampak adanya keanekaragaman genetik yang berakibat pada keanekaragaman protein yang diekspresikan.

Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk melakukan karakterisasi molekuler protein flagellin *S. typhi* Isolat Jawa Tengah dan Yogyakarta. Karakterisasi molekuler meliputi ukuran gen flagellin dan profil sub unit protein flagellin dengan metode SDS-PAGE.

2. METODE PENELITIAN

Sampel penelitian

Sampel penelitian adalah 7 strain *S. typhi* isolat Jawa Tengah (5 strain dari kota Semarang, 1 strain Salatiga, 1 strain Magelang), 2 strain *S. typhi* dari Yogyakarta (1 strain dari RS Dokter Sarjito, dan 1 strain RS Bethesda). Sembilan strain *S. typhi* adalah hasil isolasi dari kultur darah pasien Widal positif, yang kemudian diidentifikasi

menggunakan media API 20E dan API 50CHBE (Darmawati et al. 2011).

PCR dan sekuensing gen *fliC* *S. typhi*

Isolasi DNA genom bakteri digunakan *DNeasy Blood dan Tissue Kits* (Qiagen katalog nomor 69504). Primer LPW 1856(5'ATGGCACAAGTCATTAATACAAAC-3') dan LPW 1857 (5'-TTAACGCAGTAAAGAGAGGACGTT-3') yang digunakan untuk amplifikasi gen *fliC* (Lau et al. 2005). Reagen yang digunakan untuk amplifikasi gen *fliC* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah *Maxima Hot Start Green PCR Master Mix* (2X) (Thermo Scientific, K1061) dan ukuran yang digunakan adalah 12,5 µl master Mix, primer LPW 1856 dan LPW 1857 masing-masing 1 µl, DNA cetakan 1µl, dH₂O steril 7,5µl, volume setiap tabung adalah 25µl, digunakan alat *Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400*.

Amplifikasi gen *fliC* dilakukan sebanyak 30 siklus pada kondisi: suhu 95°C selama 30 detik untuk melakukan denaturasi DNA, 46°C selama 30 detik untuk melakukan proses penempelan primer pada DNA cetakan (primer LPW 1856 dan LPW 1857), untuk ekstensi pada suhu 72°C selama 2 menit dengan *final extention* pada suhu 72°C selama 10 menit untuk melakukan proses polimerisasi DNA. Hasil amplifikasi fragmen DNA dipisahkan dengan 1% *Agarose Gel Electrophoresis* berdasarkan kenampakan pita tunggal pada 1500bp. Visualisasi ampikon menggunakan *Major Science UV transluminator*.

Isolasi dan SDS-PAGE Protein Flagellin

Isolasi protein flagellin menggunakan metode Alexan et al. (2009) yang dimodifikasi. Protein flagellin diperoleh dengan cara menumbuhkan satu koloni bakteri dari media Mac Conkey pada 50mL medium BHI cair, diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dengan agitasi yang digunakan sebagai starter. Starter kemudian dimasukkan pada 500 mL media BHI, diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dengan agitasi. Selanjutnya kultur bakteri disentrifus pada suhu 4°C, dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Pellet disuspensikan dengan 5mL larutan fisiologis sampai menjadi suspensi yang kental, kemudian keasaman suspensi dibuat sampai

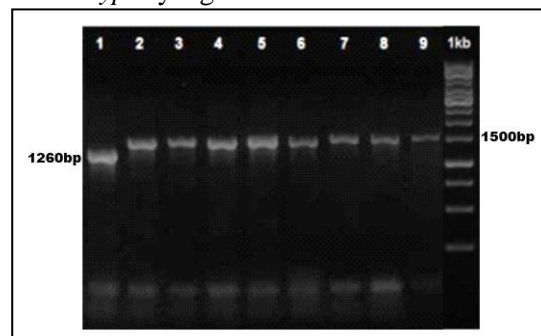
pH 2 dengan cara ditambah 1M HCl, distirer selama 30 menit pada suhu ruang, disentrifus 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang mengandung protein flagellin kemudian ditambahkan 1M NaOH agar pH menjadi 7,2.

Protein flagellin isolat Jawa Tengah dan Yogyakarta kemudian diseparasi menggunakan metode SDS-PAGE (12%) untuk melihat profil proteinnnya, dengan pewarnaan 0,1% *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Gen *fliC* *S. typhi*

Hasil PCR gen flagellin *fliC* menggunakan primer LPW 1856 dan LPW 1857, kemudian dielektroforesis menggunakan 1% agarose ditunjukkan pada Gambar 1, sedangkan ukuran gen berdasarkan hasil sekuensing ditunjukkan pada Tabel 1. Hasilnya menunjukkan bahwa ukuran pita pada hasil PCR gen *fliC* pada strain *S. typhi* SLT.1 isolat Salatiga setara dengan 1260 bp, tampak berbeda dengan pita dari 8 strain *S. typhi* yang lainnya dengan ukuran setara dengan 1500bp. Kejadian ini senada dengan hasil penelitian (Frankel et al. 1989; Lau et al. 2005; Baker et al. 2007), demikian pula bahwa gen flagellin *fliC* yang berukuran setara dengan 1267 bp menyandi protein flagellin H1-J dari *S. typhi* serovar H1-j (1 strain: 11,1%), sedangkan gen flagellin yang berukuran 1500bp menyandi protein flagellin H1-d yang dimiliki *S. typhi* serovar H1-d (8 strain: 88,9%). Penelitian (Lau et al. 2005) senada dengan kejadian ini, bahwa *S. typhi* serovar H1-j meskipun hanya ada di Indonesia tetapi prosentasenya 10-50% dari *S. typhi* yang ada.



Gambar 1. Hasil PCR gen *fliC* 9 strain *S. typhi*, berturut-turut : 1) SLT-1, 2) BA07.4, 3) MG-1, 4) SA02.2, 5) EM-3, 6) KD30.3, 7) KD 27.2, 8) BET, 9) SRJ, Marker

Tabel 1. Ukuran gen flagellin *fliC* dari 9 isolat *S. typhi* asal Jawa Tengah dan Yogyakarta berdasarkan hasil sekuensing

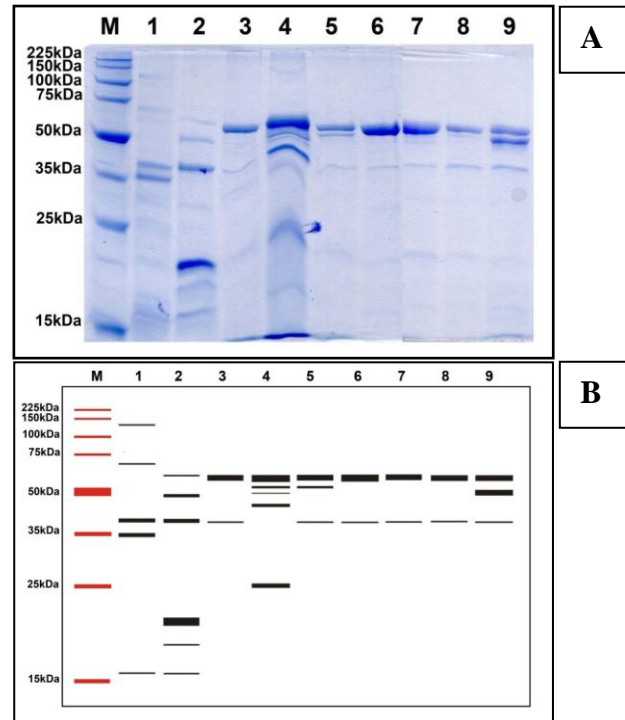
Strain	Asal	gen <i>fliC</i>
<i>S. typhi</i> SLT-1	Salatiga	1267 bp
<i>S. typhi</i> BA07.4	Semarang	1458 bp
<i>S. typhi</i> MG-1	Semarang	1454 bp
<i>S. typhi</i> SA02.2	Semarang	1464 bp
<i>S. typhi</i> EM3	Semarang	1456 bp
<i>S. typhi</i> KD30.3	Semarang	1452 bp
<i>S. typhi</i> KD27.2	Semarang	1456 bp
<i>S. typhi</i> BET	Yogyakarta	1454 bp
<i>S. typhi</i> SRJ	Yogyakarta	1488 bp

Hasilnya menunjukkan bahwa ukuran pita pada hasil PCR gen *fliC* pada strain *S. typhi* SLT.1 isolat Salatiga setara dengan 1260 bp, tampak berbeda dengan pita dari 8 strain *S. typhi* yang lainnya dengan ukuran setara dengan 1500bp. Kejadian ini senada dengan hasil penelitian (Frankel et al. 1989; Lau et al. 2005; Baker et al. 2007), demikian pula bahwa gen flagellin *fliC* yang berukuran setara dengan 1267 bp menyandi protein flagellin H1-J dari *S. typhi* serovar H1-j (1 strain: 11,1%), sedangkan gen flagellin yang berukuran 1500bp menyandi protein flagellin H1-d yang dimiliki *S. typhi* serovar H1-d (8 strain: 88,9%). Penelitian (Lau et al. 2005) senada dengan kejadian ini, bahwa *S. typhi* serovar H1-j meskipun hanya ada di Indonesia tetapi prosentasenya 10-50% dari *S. typhi* yang ada.

Protein flagellin *S. typhi* serovar H1-j diekspresikan oleh gen *fliC* yang mengalami delesi sebanyak 260 bp, sehingga hanya berukuran kira-kira 1267 bp (Tabel 1). *Salmonella typhi* serovar H1-j hanya dijumpai di Indonesia, jadi dari 9 strain bakteri *S. typhi* terdapat 1 strain H1-J isolat Salatiga dan 8 strain H1-d.

Profil Protein Flagellin

Protein flagellin dari 9 strain *S. typhi* setelah dipisahkan menggunakan SDS-PAGE 12% menunjukkan adanya 2-6 sub unit protein, terdiri dari 1-2 protein mayor dan 1-4 protein minor (Gambar 2). Berat molekul sub unit protein yang menyusun flagellin mulai dari 16-116kDa.



Gambar 2. Profil SDS-PAGE protein flagellin pada (A) dan (B) dari 9 strain bakteri *S. typhi* 7 isolat Jawa Tengah dan 2 isolat Yogyakarta. Berturut-turut M) Marker protein, 1) *S. typhi* BA07.4, 2) SLT-1, 3) MG-1, 4) SA02.2, 5) EM-3, 6) KD30.3, 7) KD 27.2, 8) BET, 9) SRJ

Pita protein mayor yang berat molekulnya 60kDa dimiliki oleh 7 strain isolat Jawa Tengah dan Yogyakarta, kecuali flagellin *S. typhi* BA07.4 dan SLT-1, hal ini berbeda dengan penelitian Alexan et al.(2009) yang menyampaikan bahwa protein flagellin *S. typhi* yang diisolasi dari anak ayam yang mengalami diare, terdiri dari satu pita protein mayor (54,11kDa), 3 pita protein minor (41kDa; 36,6kDa dan 25,7kDa). Perbedaan profil protein flagellin dari strain yang berbeda menunjukkan adanya variasi genetik pada gen flagellin yang dimiliki oleh masing-masing strain. Perbedaan profil protein flagellin kemungkinan akan berakibat pada perbedaan virulensinya ketika berperan dalam menimbulkan terjadinya patogenitas.

4. SIMPULAN

Karakterisasi molekuler protein flagellin 7 strain *S. typhi* Isolat Jawa Tengah (5 strain isolat kota Semarang, 1 strain Salatiga, 1 strain Magelang) dan 2 strain isolat Yogyakarta (1 strain RS Dokter Sarjito, dan 1 strain RS Bethesda). Hasilnya berturut-turut

menunjukkan ukuran gen flagellin *S. typhi* Isolat Salatiga 1262bp dan 8 strain yang lainnya 1500bp. Protein flagellin tersusun dari 2-6 sub unit protein yang terdiri dari 1-2 protein mayor dan 1-4 protein minor yang berukuran 16-116kDa

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terika kasih disampaikan kepada Dirjen Dikti melalui Kopertis 6 Jawa Tengah yang telah memberikan dana Hibah Fundamental tahun anggaran 2015 untuk melakukan penelitian ini.

6. REFERENSI

- Alexan, A.F., Mohamed, S.H. & Ibrahim, A.M., 2009. Immune Response Elicited in Mice after Immunization with Flagellin from *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *Global Veterinaria*, 3(6), pp.465–471.
- Baker, S. Hardy, J., Sanderson, KE., Quail, M., Googhead, I., Kingsley, RA., Parkhill, J., Stocker, B., 2007. A Novel Linear Plasmid Mediates Flagellar Variation in *Salmonella Typhi*. *PLoS Pathogens*, 3(5), pp.0605–0610.
- Darmawati, S., Sembiring, L. & Asmara, W., 2011. Klasifikasi Numerik-fenetik *Salmonella typhi* Asal Jawa Tengah dan Daerah Istimewa Yogyakarta Berdasarkan Hasil Karakterisasi Fenotipik Pendahuluan Metode Penelitian. *BIOTA Atmadjaya Yogyakarta*, 16(1), pp.128–132
- Frankel, G., Newton, S M C., Schoolnik, G K., Stockerl, B A D., 1989. characterization of the H1-j gene of *Salmonella typhi*. *EMBO Journal*, 8(1), pp.3149–3152.
- Hatta, M., Sultan, AR., Pastoor, R., Smits, H., et al., 2011. New Flagellin Gene for *Salmonella enterica* serovar Typhi from the East Indonesian Archipelago. *AM. J. Trop. Med. Hyg*, 84(3), pp.429–434.
- Jindal, G. Tewari, R., Gautam, A., Pandey, S., Rishi, P., 2012. Immunological characterization of recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhi FliC protein expressed in *Escherichia coli*. *AMB Express a SpringerOpen Journal*, 2(55), pp.1–9.
- Lau, S.K.P., Woo, PCY., Chan, CY F., Woo, W., Woo, G K S., Yuen, K., 2005. Typhoid Fever Associated with Acute Appendicitis Caused by an H1-j Strain of *Salmonella enterica* Serotype Typhi. Typhoid Fever Associated with Acute Appendicitis Caused by an H1-j Strain of *Salmonella enterica* Serotype Typhi. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), pp.1470–1472.