

## JURNAL METAMORFOSA

## Journal of Biological Sciences

ISSN: 2302-5697

<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>POTENSI *Salmonella typhi* YANG DILEMAHKAN DENGAN SINAR ULTRAVIOLET  
SEBAGAI VAKSIN ALTERNATIFPOTENTIAL OF *Salmonella typhi* ATTENUATED WITH ULTRAVIOLET RAYS AS  
VACCINE ALTERNATIVEAndreas Putro Ragil Santoso<sup>1</sup>, Retno Kawuri<sup>1\*</sup>, I Nengah Kerta Besung<sup>2</sup><sup>1</sup>Program Studi Magister Biologi, Program Pascasarjana, Universitas Udayana, Bali<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Bali

\*Email: microbiologylaboratory@yahoo.com

## INTISARI

*Salmonella typhi* merupakan bakteri intraseluler Gramnegatif dan penyebab demam tifoid pada manusia. Tingkat keberhasilan Vaksin Ty21a Vivotif Berna di Indonesia hanya 33-66% sedangkan di negara lain keberhasilannya dapat mencapai 100%. Penelitian dilakukan untuk mengetahui potensi bakteri isolat lokal dalam merangsang respon imun dan pengaruh perbedaan frekuensi penyinaran terhadap respon imun serta perbedaan waktu terbentuknya respon imun pada pemberian vaksin oral yang dilemahkan dengan sinar ultraviolet. Hasil penelitian menunjukkan bahwa titer antibodi dari isolat lokal yang disinari dengan sinar UV 10x yaitu  $88,76 \pm 33,06$  IU/mL pada minggu ke 4 dengan nilai titer antibodi terendah yaitu  $11,15 \pm 9,18$  IU/mL pada kontrol negatif.

*Kata kunci : Salmonella typhi, Ultraviolet, Waktu terbentuknya respon imun, Titer antibodi*

## ABSTRACT

*Salmonella typhi* is a Gram-negative intracellular bacterium and causes typhoid fever in humans. The success rate of Berna Vivotif Ty21a vaccine in Indonesia is only 33-66%, while in other countries have been reached up to 100%. The research was conducted in order to determine the potency of local isolate bacteria to stimulate the immune response and the impact of different exposure frequencies on the immune response and the different immune response time when administered by UV-inactivated vaccine.. The results showed that the antibody titer of local isolates irradiated by UV light 10x was  $88.76 \pm 33.06$  IU/mL at week 4 with the lowest antibody titer values about  $11.15 \pm 9.18$  IU/mL was found in the negative control.

*Keywords: Salmonella typhi, Ultraviolet, Immune ResponseTime , antibody titers*

## PENDAHULUAN

*Salmonella typhi* merupakan bakteri intraseluler Gram-negatif yang menyebabkan demam tifoid pada manusia (Shandya *et al.*, 2012). Demam tifoid di dunia diperkirakan mencapai 22 juta kasus dengan jumlah angka

kematian sekitar 216.000 orang. Di beberapa negara demam tifoid merupakan penyakit endemik dan bersifat fatal akibat peningkatan perforasi usus (Neil *et al.*, 2012). Demam tifoid menjadi perhatian terutama pada wilayah negara berkembang khususnya pada daerah wisata,

karena dengan merebaknya kasus demam tifoid wisatawan akan takut untuk datang sehingga lambat laun akan berdampak pada penurunan jumlah wisatawan (Johnson *et al.*, 2011).

Jenis vaksin demam tifoid yang beredar di Indonesia ada tiga macam yaitu vaksin oral Ty21a Vivotif Berma (bakteri yang dilemahkan), vaksin Typa Bio Farma (bakteri yang dimatikan) dan vaksin Polisakarida. Tingkat keberhasilan ketiga vaksin tersebut berbeda yaitu vaksin Polisakarida mencapai 60 - 70%, vaksin Typa Bio Farma tingkat mencapai 79 - 89%, vaksin oral Ty21a Vivotif Berma mencapai 36 - 66% di Indonesia sedangkan di negara lain mencapai 100%). Perbedaan tingkat keberhasilan ini akibat bakteri *Salmonella typhi* yang digunakan sebagai vaksin merupakan bakteri yang tidak spesifik di daerah tersebut sehingga infeksi terus berlanjut (Keputusan Menteri Kesehatan RI, 2006).

Pembuatan vaksin dengan cara melemahkan bakteri dilakukan dengan berbagai cara diantaranya penggunaan bahan kimia yaitu penggunaan fenol, alkohol, aseton dan formalin. Selain penggunaan bahan kimia pelemahan bakteri juga dapat dilakukan dengan cara penyinaran bakteri dengan sinar gamma, dan sinar ultra violet (Kawuri, 1986). Astuti (2011) melaporkan intensitas terbaik untuk pembuatan vaksin dengan sinar ultra violet adalah 75 mW/cm<sup>2</sup>. Pembuatan vaksin dengan penyinaran ultraviolet dapat menghasilkan titer antisera terbaik pada penyinaran 320 nm selama 8 x penyinaran setiap penyinaran 5 menit (Kawuri, 1986). Namun, frekuensi penyinaran sinar ultraviolet tersebut yang dikombinasikan dengan waktu munculnya respon imun belum pernah diungkapkan. Dengan demikian diharapkan didapatkan vaksin yang berasal dari isolat lokal yang mampu memberikan kekebalan tubuh yang lebih baik.

## BAHAN DAN METODE

### Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan merupakan Rancangan Acak Kelompok dengan pola 5 perlakuan sinar UV pada tikus (*Rattus sp.*) yaitu kontrol negatif *Pepton Buffer*

*Saline* (PBS), penyinaran 6x, penyinaran 8x, penyinaran 10x dengan panjang gelombang 75 mW/cm<sup>2</sup> dan kontrol positif dengan pemberian vaksin Ty21a yang diamati pada 0 hari, minggu I, II, III dan IV. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali.

### Vaksinasi pada tikus wistar

Vaksinasi tikus dilakukan hanya sekali tanpa pengulangan. Masing-masing kelompok tikus perlakuan diberikan vaksin secara oral dengan dosis 2 mL. Selanjutnya sampel darah diambil pada minggu pertama, minggu kedua, minggu ketiga dan minggu keempat.

### Pembacaan titer antisera

Plate dicoat selama 18 jam pada suhu 4°C dengan carbonate-bicarbonate buffer pH 9,2. Setiap sumur plate *Enzyme Link Immuno Sorbant Assay* (ELISA) diblok 200 µL dengan 3 % skim milk dan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) selama 1 jam pada suhu kamar dan , plate dicuci 2x dengan PBS-T (- 0,1 % *Tween* 200) Sebanyak 100 µL serum dengan pengenceran 1:400 ditambahkan ke setiap sumuran plate mikro ELISA dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar. Selanjutnya plate dicuci 3x dengan PBS-T dan kedalam setiap sumuran ditambahkan anti-rat IgG peroxidase (KPL) dengan pengenceran 1:1000 dalam PBS-T yang mengandung 10% total bovine serum dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam, kemudian plate dicuci dengan PBS-T 3x dan ditambahkan substrat *Thiamethyl Benzidimed* (TMB) (KPL-USA) dan dibiarkan pada suhu kamar, dan ditambahkan stop solution. Nilai absorbansi setiap sumuran dibaca dengan *multiscan spectrophotometer* dengan filter 45 nm. Titer antibodi anti-salmonella dihitung menggunakan rasio ELISA yaitu: Nilai rasio

$$= \frac{\text{nilai absorbansi sampel} - \text{nilai absorbansi}}{\text{nilai absorbansi positif} - \text{nilai absorbansi negatif}} \times 100$$

### Analisis Data

Data yang diperoleh berupa titer antibodi *S. typhi* dianalisis secara deskriptif untuk melihat adanya perbedaan masing-masing frekuensi dengan waktu pengambilan dan di uji

dengan one-way ANOVA yang dilanjutkan dengan uji *post hoc*.

**HASIL**

**Identifikasi *Salmonella typhi***

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini merupakan bakteri yang didapatkan dari biakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Sebelum

dilakukan penelitian, bakteri diidentifikasi ulang untuk memastikan species yang akan digunakan yaitu *Salmonella typhi*. Identifikasi ulang dilakukan dengan menggunakan pemeriksaan mikrogen TM. GnA +B-ID.

Hasil identifikasi pada Tabel 1 menunjukkan bakteri uji mempunyai kesamaan 94% dengan *S. typhi* sehingga dapat dipastikan bakteri yang dipakai adalah *S. typhi*.

**Tabel 1. Hasil Identifikasi ulang bakteri uji**

No	Uji	Hasil	No	Uji	Hasil
1	Lysin	Positif	14	Malonate	Positif
2	Ornithine	Negatif	15	Inositol	Positif
3	H <sub>2</sub> S	Negatif	16	Sarbitol	Positif
4	Glukosa	Positif	17	Rhamnosa	Positif
5	Mannitol	Positif	18	Sukrosa	Positif
6	Xylose	Positif	19	Laktosa	Negatif
7	O.N.P.G	Positif	20	Arabinosa	Positif
8	Indol	Negatif	21	Adonitol	Positif
9	Urease	Positif	22	Raffinosa	Positif
10	V.P.	Negatif	23	Salicin	Positif
11	Sitrat	Negatif	24	Arginin	Positif
12	T.D.A	Negatif			
13	Gelatin	Negatif			

**Hasil pengukuran antibodi dengan metode ELISA**

Pengukuran antibodi dilakukan dengan menggunakan uji ELISA dengan hasil tertera yaitu:

**Tabel 2. Hasil Analisis Varian Titer Antibodi Terhadap *Salmonella typhi* Frekuensi Penyinaran Dengan Waktu Terbentuknya Respon Imun**

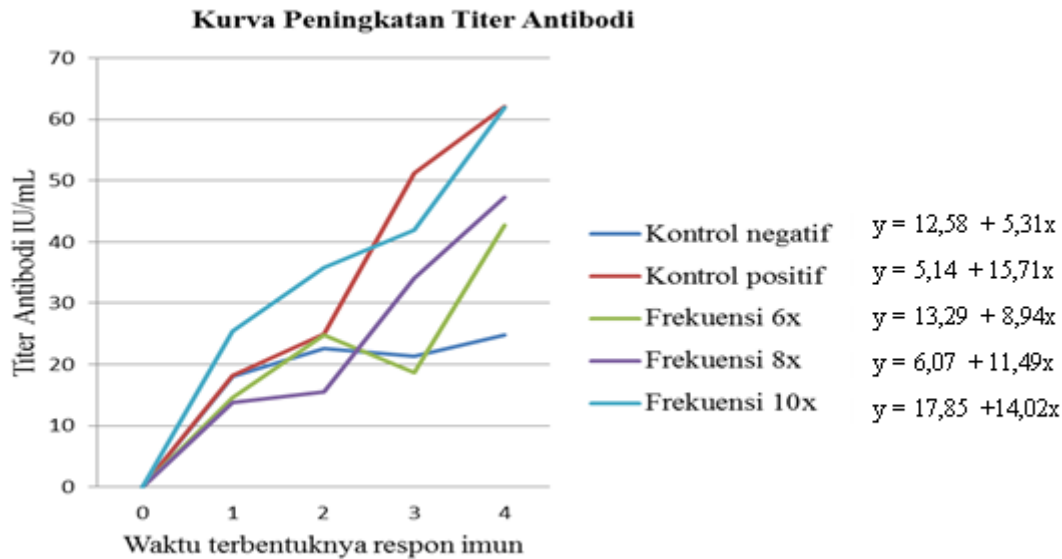
No	Frekuensi	Rerata Titer Antibodi (IU/mL)				
		Hari 0	Minggu 1	Minggu 2	Minggu 3	Minggu 4
1	Frekuensi 10x	26,88±7,14 <sup>a</sup>	52,39±18,86 <sup>cd</sup>	62,69±18,30 <sup>d</sup>	68,83±28,33 <sup>d</sup>	26,88±7,14 <sup>a</sup>
2	Kontrol positif	21,00±7,49 <sup>a</sup>	39,35±13,91 <sup>ac</sup>	46,01±11,12 <sup>c</sup>	72,19±16,47 <sup>d</sup>	21,00±7,49 <sup>a</sup>
3	Frekuensi 6x	19,94±6,80 <sup>a</sup>	34,58±6,86 <sup>b</sup>	44,76±5,24 <sup>c</sup>	38,67±12,14 <sup>c</sup>	19,94±6,80 <sup>a</sup>
4	Frekuensi 8x	18,38±6,06 <sup>a</sup>	32,23±9,00 <sup>b</sup>	33,93±4,58 <sup>a</sup>	52,44±10,76 <sup>d</sup>	18,38±6,06 <sup>a</sup>
5	Kontrol negatif	11,15±9,18 <sup>b</sup>	29,15±11,09 <sup>b</sup>	33,75±6,05 <sup>a</sup>	32,52±4,42 <sup>ac</sup>	11,15±9,18 <sup>b</sup>
	Total	19,47±8,51	37,49±14,22	44,23±14,40	52,93±22,07	19,47±8,51

Keterangan:

Nilai-nilai pada tabel ± standar eror merupakan rata-rata dari lima kali ulangan. Nilai-nilai yang diikuti notasi huruf yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata berdasarkan uji *post hoc* LSD (P>0,05), setelah dilakukan analisis sidik ragam (Anova).

Hasil pemeriksaan menunjukkan peningkatan titer antibodi tertinggi pada minggu ke 4 dengan frekuensi penyinaran sinar UV 10x yaitu  $88,76 \pm 33,06$  IU/mL dan nilai titer antibodi terendah pada kontrol negative  $11,15 \pm 9,18$  IU/mL. Berdasar titer antibodi tersebut menunjukkan bahwa

terjadi peningkatan disetiap minggunya, namun peningkatan yang terbaik dalam penelitian ini diperoleh pada frekuensi 10x, sedangkan yang terendah pada frekuensi 6x dengan pembanding kontrol positif dan kontrol negatif.



Gambar 1. Hasil regresi linier peningkatan titer antibodi

Gambar 1 diatas menunjukkan bahwa hasil regresi linier peningkatan titer antibodi tertinggi dalam penelitian ini diperoleh pada frekuensi 10x dengan persamaan  $y = 17,85 + 14,02x$  dan nilai  $r = 69\%$ , sedangkan pada kontrol positif diperoleh persamaan  $y = 5,14 + 15,71x$  dengan nilai  $r = 83\%$  dan pada kontrol negatif  $y = 12,58 + 5,31x$  dengan nilai  $r = 66\%$ .

**PEMBAHASAN**

**Pengukuran Antibodi dengan metoda ELISA**

Penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan titer antibodi tertinggi diperoleh pada tikus yang disinari UV dengan frekuensi penyinaran 10x pada minggu ke 4. Penelitian sebelumnya oleh Besung *et al.*, (2013) menunjukkan bahwa pemberian pegagan (*Centella asiatica*) pada mencit dapat meningkatkan titer antibodi pada minggu ke 4 sebesar  $94,0370 \pm 1,69$  IU Hal tersebut

menunjukkan bahwa perlakuan penyinaran terhadap titer antibodi pada minggu ke 4 lebih rendah dibandingkan dengan pemberian pegagan (*Centella asiatica*). Radji (2010) menyatakan bahwa antibodi dibentuk oleh sel plasma yang berasal dari proliferasi sel B akibat rangsangan antigen. Antibodi yang terbentuk secara spesifik akan mengikat antigen sejenis yang masuk ke dalam tubuh. Sifat pengikat antibodi dengan antigen dapat berubah sesuai waktu karena afinitas antibodi terhadap antigen makin lama makin besar sehingga kompleks antigen antibodi yang terjadi akan semakin stabil.

Titer antibodi tertinggi dalam penelitian ini didapatkan pada frekuensi penyinaran sinar UV 10x. Hal ini berbeda dengan penelitian Kawuri (1986) yang menunjukkan bahwa frekuensi penyinaran UV 8x merupakan frekuensi terbaik untuk meningkatkan titer antiserum dari itik yang di vasinasi dengan

vaksin hidup *S. typhimurium* Z<sub>12</sub>. Penggunaan sinar UV untuk meningkatkan titer antibodi juga ditunjukkan oleh Priyanti (2010) yang menyebutkan bahwa penyinaran UV dengan penambahan bahan-bahan kimia (Dragendoff, vanillin H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub> dan Liberman Burchard) dapat mempercepat mutasi gen pada DNA bakteri.

Penggunaan sinar UV dapat mendorong terbentuknya antibodi. seperti yang diungkapkan Lorenz *et al.*, (2009) yang menyatakan bahwa penggunaan UV-C dapat mendorong perubahan monoklonal antibodi difluensi rendah dan dapat digunakan untuk inaktivasi virus dalam aplikasi bioteknologi. Pelemahan *S. typhi* dengan sinar UV mendorong terbentuknya respon imun. Hal ini di dukung penelitian yang dilakukan oleh Kang dan Curtis, (2003) bahwa *Salmonella* yang dilemahkan dan direkombinan dengan *Staphylococcus* dapat meningkatkan sistem imun.

Peningkatan titer antibodi pada kontrol negatif terjadi karena penggunaan tikus yang tidak *Spesific Pathogen Free* (SPF). Menurut Wahyu, (2011) *Salmonella* yang keluar bersama kotoran dapat mengkontaminasi dan jika dikonsumsi dapat bersifat antigenik. ontrol positif, menunjukkan bahwa pemberian Ty21a yang biasa digunakan sebagai vaksinasi deman tifoid, mampu meningkatkan titer antibodi setiap minggunya hingga minggu ke 4., Hasil penyinaran sinar UV dengan frekuensi 10x yang setara dengan kontrol positif menunjukkan bahwa penyinaran frekuensi 10x dapat digunakan sebagai vaksin alternatif.

Peningkatan titer berdasar waktu terbentuknya respon imun ini didukung oleh penelitian pada bakteri *Escherichia coli* dalam proses pembentukan antibodi yang menunjukkan peningkatan titer hingga pemeriksaan minggu ke 7 (Supar *et al.*,1998). Penelitian Kang dan Roy (2003) juga menunjukkan peningkatan titer yang optimal dalam pembuatan vaksin *S. typhimurium* pada minggu ke 6. Selanjutnya penelitian Wang *et al.*, (2014) menunjukkan peningkatan IgG

mencapai puncak pada minggu ke 8. Sedangkan pada penelitian Hui *et al.*, (2007) menunjukkan titer antibodi meningkat pada minggu ke 4 hingga minggu ke 8 dan tidak ditemukan peningkatan setelah minggu ke 8. Hal yang sama didapatkan juga oleh Aidan *et al.*, (2009) yang menyebutkan bahwa konsentrasi IgA meningkat pada minggu ke 4 dan menurun pada minggu ke 8.

## KESIMPULAN

Vaksin yang berasal dari bakteri *Salmonella typhi* menunjukkan peningkatan titer antibodi tertinggi pada minggu ke 4 dengan frekuensi penyinaran sinar UV 10x yaitu 88,76 ± 33,06 IU/mL dan nilai titer antibodi terendah pada kontrol negatif 11,15 ± 9,18 IU/mL. *S. typhi* yang disinari dengan frekuensi penyinaran 10x menghasilkan titer antibodi terbaik dibandingkan frekuensi penyinaran 8x dan 6x.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aidan, S., Kazuhito, O., Yukata, N., Yosunori, T. 2009. IgA response of BALB/c mice to orally administered *Salmonella typhimurium* flagellin-displaying T2 bacteriophages. *Biotechnology Progress*. Mar2009, Vol. 25 Issue 2, p552-558. 7p
- Besung, I N. K., Astawa, I N. M., Suatha, I K., Hartaningsih., 2013. Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) Meningkatkan Titer Antibodi Mencit Setelah Diinfeksi *Salmonella typhi*. *Jurnal Veteriner*. Vol 14, No 2 (2013).
- Hui, Y.L., S.A. C., In, S. L., Jong, H. P., Seung, H. S., Min, W. B., Dong, ae K., Seok, H. L., Sook, J. H., Sang, J. B., Yoo, K. L., Yang, K. H., Young, K. C., Jae, H. P. 2007. Evaluation of *phoP* and *rpoS* mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhi as attenuated typhoid vaccine candidates: virulence and protective immune responses in intranasally immunized mice. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00307.x> 310-318
- Johnson, M.P.H., Katherine J., Nancy M., Gallagher B.A., Eric D., Mintz M.D., Anna



- E., Newton M.P.H., Gary W., Brunette M.D., Phyllis E., Kozarsky M.D., 2011. From the CDC: new country-specific recommendations for pre-travel typhoid vaccination. *Journal Of Travel Medicine* [cited on : 2014 Feb 4] Available : URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc>
- Kang, H. Y., Curtis, R. 2003. Immune responses dependent on antigen location in recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccines following oral immunization. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00063-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00063-4) 99-104
- Kawuri, Retno, 1986. Pengukuran Titer Antiserum dari itik yang divaksinasi dengan vaksin hidup *Salmonella typhimurium* Z<sub>12</sub> yang disinari dengan ultra violet (*Skripsi*). Universitas Padjadjaran
- Keputusan Menteri Kesehatan RI, 2006. Nomor 364/MENKES/SK/ V/2006. Tentang Pengendalian Demam Tifoid. [cited on : 2014 Feb 3] Available : URL : <https://www.google.co.id/url>
- Lorenz, C., Wolk, B., Quan, C. P., Alcalá, Emily W., Eng, M., McDonald, Daniel J., Matthews, Timothy C., 2009. The effect of low intensity ultra violet-C light on monoclonal antibodies. BAYER Technology Services GmbH
- Neil, K.P., Sodha S.V., Lukwago L., O-Tipo S., Mikoleit M., Simington S.D., Mukobi P., Balinandi S., Majalija S., Ayers J., Kagirita A., Wefula E., Asiimwe F., Kweyamba V., Talkington D., Shieh W.J., Adem P., Batten B.C., Zaki S.R., Mintz E. 2012. A large outbreak of typhoid fever associated with a high rate of intestinal perforation in Kasese District, Uganda, 2008-2009. *Clinical Infectious Diseases: Publication Of The Infectious Diseases Society Of America* [Clin Infect Dis].54(8) :1091-1099 [cited on: 2014 Feb 3] Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Priyanti, Tanti. 2010. Uji Mutagenisitas Fraksi Ekstrak Kloroform Daun Ambre (*Geranium radula* Cavan.) Terhadap Bakteri *Salmonella typhimurium* Serta Profil Kandungan Kimia Fraksi Teraktif
- Radji, Makksun. (2010). *Imunology & virology*. Jakarta : PT. ISFI Penerbitan.
- Shandya, et al. 2012. Typhoid fever & vaccine development: a partially answered Question, Artikel Rievew. Department of Microbiology & Cell Biology, Indian Institute of Science, Bangalore, India
- Supar, Poerwadikarta, Kurniasih, Nina., Djaenuri. 1998. Pengembangan Vaksin *Escherichia coli* Alfa Hemolitik Verotoksigenik: Respon Antiverotoksik Antibodi Pada Hewan Percobaan Mencit, Kelinci Dan Sapi Perah
- Wang, Q., Melody, T., Brian, Keegen, Meagan, B., Michael, H. 2014. Time course study of the antigen-specific immune response to a PLGA microparticle vaccine formulation. *Biomaterials*. Sep2014, Vol. 35 Issue 29, p8385-8393. 9p.