

## MOLECULAR WEIGHT OF RESEPTOR *SALMONELLA TYPHOSA* AT CULTURE OF HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS (HUVEC)

### BOBOT MOLEKUL RESEPTOR *SALMONELLA TYPHOSA* PADA KULTUR SEL ENDOTEL VENA UMBILICALIS MANUSIA

Soemamo<sup>\*</sup>, Uun Yanuhar<sup>\*\*</sup>, Widodo MA<sup>\*\*\*</sup>, dan Sumitra BS<sup>\*\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Unibraw Malang

<sup>\*\*</sup>Mahasiswa Program Pascasarjana Biomedis Unibraw Malang

<sup>\*\*\*</sup>Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Unibraw Malang

<sup>\*\*\*\*</sup>Fakultas MIPA Unibraw Malang

#### ABSTRACT

Typhoid fever represent disease of infection which is caused by bacterium of *Salmonella (S.) typhosa* still generates the problem at developing countries including Indonesia. Attributed to pathogenesis bacteriae attachment of bacteria at cell of endothel is unclear. Intention of this research is to know the existense of ability. *S. typhosa* M223 attachment at cell of endhotel and of reseptor bacterium *S. typhosa* M223 at cell of endhotel. This research was done using Human Umbilical Vein Endothelial Cell Culture (HUVEC) as model of endothelial cells. Ability of bacterium to adherence at HUVEC expressed with adhesion index. Adhesion index known by HUVEC cultivation with *S. typhosa*. Extracelluler matrix of HUVEC extracted by solubilisation with solution of NOG concentration counted 0,05%. Detection of molecular weight of extracelluler matrix attempt with SDS-PAGE showed a low molecul weight protein 66 kDa. Purification proses of protein of extracelluler matrix conducted by electroelusion. Verification of molecule of reseptor done by correlation evaluation between adhesion index of bacterium with dose of protein molecule reseptor by serial fold two dilution which coated to HUVEC. Conclusion of evaluation test correlation in the reality of extracelluler matrix of HUVEC moleculer weight 66 kDa. to represent molecule of reseptor of *S. typhosa* M223 ( $p < 0,05$ )

**Keywords:** *Salmonella typhosa*, HUVECs, NOG, Protein reseptor

#### Abstraksi

Penyakit demam tifoid yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella (S) typhosa* masih merupakan problema kesehatan terutama di negara yang sedang berkembang termasuk Indonesia. Pada patogenesis terjadinya bakteriemia dan mengenai pelekatan bakteri tersebut terhadap sel endotel masih belum ada kejelasan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kemampuan pelekatan *S. typhosa* dan bobot molekul reseptomya pada sel endotel. Penelitian ini dikerjakan dengan memakai Human Umbilical Vein Endothelial Culture (HUVEC), sedangkan sebagai model sel pelekat bakteri yang digunakan adalah model indeks adhesi. Untuk mengetahui indeks adhesi dilakukan pemaparan *S. typhosa* terhadap HUVEC. Matriks ekstraseluler diekstraksi dengan cara solubiliasi HUVEC dengan larutan N-Octyl- $\beta$ -D Glucopyranoside (NOG) 0,05%. Penentuan bobot molekul matriks ekstraseluler yang dikerjakan dengan SDS-PAGE ternyata memiliki bobot 66 kDa, Pemurnian protein matriks ekstrak seluler dipakai cara elektroelusi. Ketentuan bobot molekul reseptor ditentukan dengan evaluasi korelasi antara indeks adhesi bakteri dengan dosis protein molekul reseptor yang diencerkan setengahnya secara seri yang dilekatkan pada HUVEC. Kesimpulan dari evaluasi tersebut dengan menggunakan tes korelasi menunjukkan bobot molekul matriks ekstrak seluler 66 kDa HUVEC merupakan molekul respptomya *S. typhosa* M223 ( $P < 0,05$ ).

**Kata kunci:** *Salmonella typhosa*, HUVECs, NOG, Protein reseptor

## PENDAHULUAN

Beberapa bakteri golongan *Salmonella* dapat menyebabkan penyakit infeksi pada manusia. Infeksi yang disebabkan oleh *Salmonella* masih menjadi permasalahan terutama untuk golongan negara berkembang. Adapun bentuk klinis penyakit infeksi oleh *Salmonella* dapat berupa: gastroenteritis, demam enteris, dan bakteriemis *Salmonella* (*S. typhosa*) adalah bakteri penyebab demam tifoid, dan masih merupakan penyakit endemis di golongan negara yang berkembang termasuk Indonesia. Kisaran angka kesakitan demam tifoid di Indonesia 360-900 kasus per 100.000 penduduk per tahun. Rerata angka kematian secara nasional antara 2-3,5% (1,2).

Patogenesis demam tifoid dimulai dari masuknya bakteri *S. typhosa* melalui mulut bersama dengan makanan atau minuman, yang terkontaminasi oleh bakteri tersebut. Setelah masuk lewat rongga mulut kemudian menuju ileum dengan melewati hambatan asam lambung. Sampai di ileum bakteri mengalami *transcytosis* oleh sel M I yang kemudian ditangkap oleh sel fagosit yang banyak ditemukan dibawah sel M tersebut. Bakteri yang terdapat dalam sel fagosit selanjutnya menuju getah bening mesenterium kemudian ikut peredaran darah dengan melewati *ductus thoracicus* sehingga menimbulkan bakteriemis pertama. Bakteri yang berada pada peredaran darah tersebut kemudian masuk ke dalam organ *reticuloendothelial system* (RES), yang akhirnya masuk peredaran darah lagi terjadi bakteriemis yang ke dua (2).

Patogenesis bakteri untuk menyebabkan penyakit secara umum terdapat dua tahap. Tahap pertama bakteri memiliki kemampuan melekat pada sel inang, yang selanjutnya diikuti oleh tahap ke dua yaitu terjadinya pengembangbiakan. Pada waktu terjadinya tahap ke dua akan disertai dengan produksi beberapa bahan hasil metabolisme bakteri yang dapat merugikan inang misalnya beberapa jenis toksin (3).

Kemampuan melekat bakteri pada sel inang diperantarai oleh molekul adhesi yang terdapat pada bakteri dan molekul reseptor yang terdapat pada sel inang. Protein molekul bakteri, pada *Vibrio cholerae* didapatkan pada bagian tip pili dengan bobot 38 kDa dan bagian tubuh sel dengan bobot 76 kDa. Penelitian Sumarno menemukan protein bobot molekul 10 kDa merupakan protein reseptor *V. cholerae* yang diisolasi dari MES (matriks ekstra seluler) enterosit tikus putih. Molekul reseptor tersebut diisolasi dengan memakai larutan *N-Octyl-B-glucopyranoside* (NOG) 0,05% dan merupakan protein yang menonjol pada evaluasi elektroforesis SDS-PAGE (3). Penelitian pendahuluan bobot molekul 36 kDa pili *S. typhi* M223 merupakan molekul adhesi pada enterosit tikus (4).

Terjadinya pelekatan bakteri pada sel inang merupakan kejadian yang penting pada patogenesis infeksi. Patogenesis ini pada demam tifoid yang disebabkan oleh *S. typhosa* pada tahap pertama masih belum ada kejelasan baik mengenai reseptor maupun molekul adhesinya pada proses pelekatan bakteri pada sel endotel saat terjadinya bakteriemis. Keberhasilan melakukan kultur HUVEC maka akan memberikan peluang untuk melakukan studi *in vitro* mencari molekul reseptor bakteri pada HUVECs.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa protein bobot molekul 66 kDa yang diisolasi dari MES HUVECs menggunakan NOG 0,05% merupakan protein reseptor dari bakteri *S. typhosa* M223.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### 1. Penelitian Eksploratif

#### Pembuatan Kultur Sel Endotel Umbilikus

Kultur *Human Umbilicus Vein Endothelial Cells* (HUVEC) dikerjakan seperti penelitian kami yang merujuk penelitian Morgan (5). Jaringan umbilikus dipilih berasal dari bayi yang dilahirkan oleh ibu yang sehat. Masing-masing ujung umbilikus dipotong transversal sehingga terlihat dua arteri dan vena. Vena mempunyai dinding yang lebih tebal, lebih besar dan lentur. Kanul dimasukkan pada satu ujung vena (1cm) kemudian diikat benang dengan erat. Vena dibersihkan dengan PBS pH 7,4 melalui kanul yang telah terpasang dengan menggunakan semprit ukuran 20 cm. Kolagenase dimasukkan ke dalam vena dan dibiarkan selama 8 menit. Isi cairan vena yang mengandung kolagenase dan sel endotel dikeluarkan dengan cara menyedot dengan semprit yang masih terpasang selanjutnya dimasukkan pada tabung sentrifus steril. Isolasi isi vena yang mengandung sel endotel diulangi lagi dengan menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 8 ml, hasilnya dikumpulkan. Kumpulan isi vena tersebut disentrifus dengan kecepatan 1300 rpm selama 8 menit, supernatan dibuang. Pada endapan ditambahkan media kultur sebanyak 2 ml dalam tabung sentrifus kemudian sentrifus diulangi dengan cara yang sama. Supernatan dibuang, pellet yang ada diresuspensi dengan medium kultur sebanyak 4 ml, kocok dengan mikro pipet hingga kelompok sel menyebar. Larutan tersebut dipindahkan pada tabung kultur ukuran 25 cm<sup>2</sup> yang telah dilapisi dengan gelatin 2% kemudian dimasukkan ke dalam inkubator (5 % CO<sub>2</sub>) pada suhu 37°C. Pada hari berikutnya medium diambil dan dicuci dengan menggunakan *serum free medium* (medium 199, penisilin 100 µl/ml, streptomisin 100 µl/ml, larutan *natribicarbonat-phenol red* 21 mM/ml, dan glutamine 2 mM/ml), kemudian kembali diisi medium kultur yang mengandung (*Fetal Bovine Serum*/FBS dan *New Born Serum*/NBS 20%) sebanyak 4 ml. Setiap 2 hari sekali setengah dari medium diambil dan diganti dengan yang baru. Satu lapis sel endotel yang tumbuh akan terbentuk pada hari ke 3 dan siap dilakukan subkultur.

#### Pembuatan sub kultur sel endotel umbilikus

Tabung kultur yang berisi sel selapis endotel diambil, kemudian dicuci dengan *serum free medium*. Masukkan larutan yang mengandung EDTA (0,02%) kurang lebih 1 ml melewati filter kedalam tabung secara merata dibiarkan selama 1 menit, kemudian dibuang. Masukkan 1 ml larutan trypsin (0,1%), EDTA (0,02%) ke dalam tabung melalui filter sampai cairannya rata. Selanjutnya dimasukkan kedalam incubator selama 5 menit kemudian diperiksa dibawah *inverted microscope*. Tabung ditepuk dengan tangan supaya sel endotel yang telah lepas melayang, dan segera ditambahkan media yang mengandung FBS dan NBS sebanyak 4ml melalui filter. Cairan dalam tabung diambil dengan *disposable pipet* 5 ml, kemudian masukkan

kedalam tabung sentrifuse 1300 rpm selama 8 menit. Buang supernatan, kemudian di tambahkan media kultur kedalam tabung sebanyak 4 ml melalui filter dan dilakukan resuspensi agar sel endotel terpisah. Teteskan suspensi endotel yang terbagi secara merata pada cawan kultur jaringan dengan sumuran 6, yang telah diberi cover slip (gelas penutup). Pada persiapan tersebut sebelumnya terlebih dahulu ditetesi dengan gelatin 0,2% sebanyak 1 ml dan kemudian dicuci dengan *serum free medium* sebanyak 2 kali melalui filter. Masukkan cawan perbenihan kedalam inkubator CO<sub>2</sub> dan setiap 2 hari medium diganti dengan medium kultur, setelah sel satu lapis siap untuk perlakuan.

#### Isolasi matriks ekstra seluler (MES) HUVEC

Metode isolasi protein MES HUVEC seperti pada isolasi MES enterosit tikus putih menggunakan NOG konsentrasi 0,05% (3). Hasil kultur HUVEC isolasi primer yang menunjukkan gambaran merata yang tumbuh pada tabung untuk kultur jaringan dituangi dengan larutan yang mengandung NOG konsentrasi 0,05% sebanyak 2ml. Selanjutnya tabung kultur diletakkan dalam penangas air penggoyang menggunakan kecepatan goyangan maksimal, selama 30 menit pada suhu 37°C. Kemudian bagian cairan yang terdapat pada tabung kultur diambil dimasukkan kedalam membran dialisis untuk dilakukan dialisa menggunakan cairan H<sub>2</sub>O sebanyak 2 liter untuk waktu 24 jam pertama. Kurun waktu 24 jam yang ke dua, cairan dialisis diganti dengan PBS pH 7,4 volume yang sama. Hasil dialisis dimasukkan kedalam tabung *ependorf* yang kemudian disimpan dalam almari es suhu -20° C.

#### Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Monitoring bobot molekul dikerjakan menggunakan SDS-PAGE metode Laemmli (6). Sampel protein MES HUVEC dipanaskan 100° C selama 5 menit dalam larutan penyangga yang mengandung 5 mM Tris HCl pH 6,8, 5% 2- *mercapto ethanol*, 2,5% w/v *sodium dodecyl sulfate*, 10% v/v *glyserol* dengan warna pelacak *bromophenol blue*. Dipilih 12,5% *mini slab gel* dengan *tracking gel* 4%. Voltase yang digunakan 125 mV. Sebagai bahan warna adalah *coomassie brilliant blue* dan molekul standar *sigma low range marker*.

#### Elektroelusi

Metode yang dipakai seperti penelitian untuk isolasi protein hemagglutinin *H.pylori* (7). Dari sampel protein yang telah dilakukan SDS-PAGE sebanyak 4 lembar gel, dilakukan pemotongan pita protein yang diinginkan. Hasil potongan tersebut dipotong lagi secara vertikal sehingga tiap potong mengandung tiga pita protein yang sama. Potongan pita protein dimasukkan kedalam membrane dialisis yang berisi cairan *running buffer electrophoresis*. Perlakuan elusi protein yang terdapat pada pita protein dalam membran dialisa tersebut dikerjakan secara horisontal menggunakan aliran listik 125 V selama 20 menit. Hasil elusi didialisis selama 48 jam, dengan cara seperti yang telah disebutkan diatas.

## 2. Penelitian Eksperimental

#### Uji eksperimen reseptor adesi *S.typhi*.

Modifikasi rujukan yang digunakan adalah cara Favre-Bonte (1995). *S. typhosa* M223 ditumbuhkan pada media *brain heart infusio broth* (BHI) suhu 37° C sampai konsentrasi mencapai 10<sup>6</sup> per ml.

Eksperimen yang dilakukan adalah:

1. *Salmonella typhosa* M223 dilakukan inkubasi dengan HUVEC menggunakan 1 ml suspensi bakteri yang telah disiapkan. Persiapan suspensi bakteri dilakukan dengan sentrifugasi BHI yang mengandung bakteri kecepatan 6000 rpm suhu 4° C selama 5 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang, suspensi bakteri diambil dengan menambahkan PBS pH 7,4 dimasukkan kedalam sumur nomor 1 pada cawan perbenihan.
2. Seperti pada eksperimen nomer 1, dengan perbedaan sebelum ditambahkan pada HUVEC suspensi bakteri *S. typhosa* M223 yang telah dipersiapkan disalut dengan protein MES HUVEC hasil elektroelusi.

Dosis protein penyalut MES diturunkan ½ nya secara seri, diperlakukan pada sumur nomer 2, 3, 4, 5, dan 6. Inkubasi bakteri dengan HUVEC dikerjakan pada penangas air yang bergoyang dengan goyangan sebanyak 50 X setiap menit selama 30 menit pada suhu 37° C. Setelah inkubasi cukup, dilakukan pencucian dengan PBS pH 7,4 sampai 2 kali. Gelas penutup diambil dari dasar cawan perbenihan untuk dilakukan pemeriksaan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 1000 kali dan pewarnaan Gram. Sel bakteri yang melekat pada satu sel HUVEC dihitung. Sel HUVEC yang diperiksa dan dihitung secara acak sig-sag sampai 3 kali.

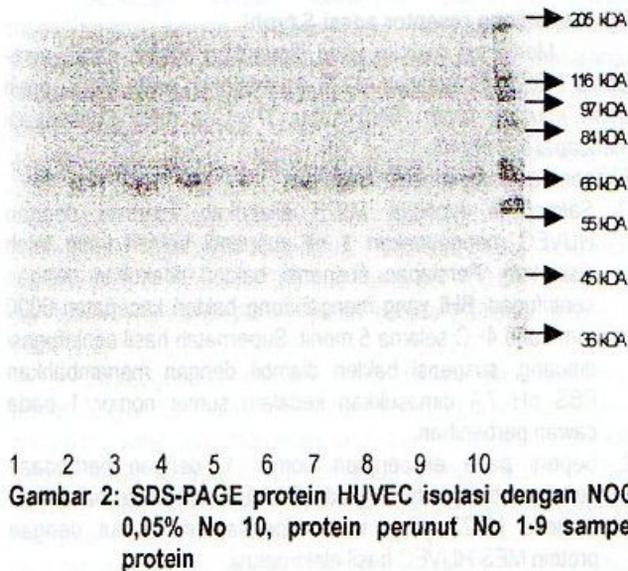
#### HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian adhesi *S. typhosa* pada HUVEC dapat dilihat pada Gambar 1.

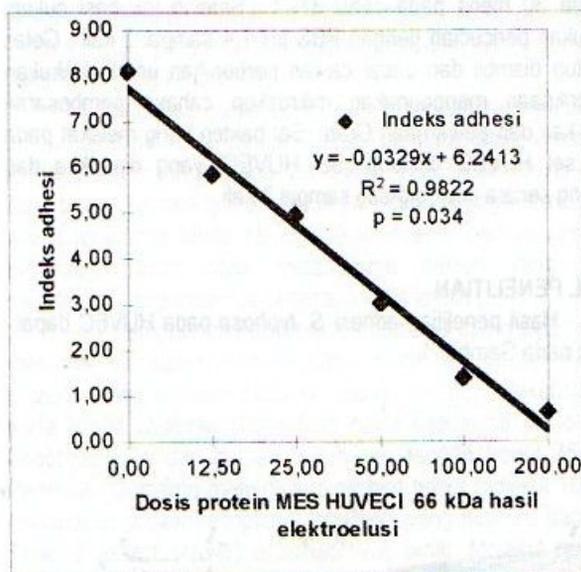


**Gambar 1: Adhesi bakteri *S. typhosa* M223 pada kultur HUVEC**

Hasil isolasi protein MES HUVEC menggunakan larutan NOG 0,05% pada SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 2.



Kecenderungan penurunan indeks adesi terhadap pemberian dosis protein MES HUVEC 66 kDa yang dinaikan dapat dilihat pada Gambar 3



**Gambar 3:** Hasil analisis regresi yang menunjukkan hubungan antara indeks adesi *S. typhi* M223 dan pemberian dosis protein endotel

Protein MES HUVEC 66 kDa. sebagai molekul adhesi ditunjukkan oleh Gambar 3 dengan pada  $p < 0,05$ .

## PEMBAHASAN

Morfologi sel endotel dapat dilihat pada Gambar 1. Sel endotel kelihatan memanjang dan MES-nya tampak transparan serta intinya kelihatan tampak gelap dan bentuknya lonjong. Sel endotel tersebut diatas dilekati oleh bakteri bentuknya batang

dan sifat pewarnaannya Gram negatif. Bentuk dan sifat pewarnaan ini dimiliki oleh bakteri *S. typhosa* M223.

Isolasi protein MES HUVEC dilakukan menurut petunjuk penelitian isolasi MES enterosit tikus putih yang menggunakan larutan NOG 0,05%.

Protein MES enterosit tikus putih tersebut diatas yang berhasil diisolasi masing-masing berbobot 62 kDa, 28,9 kDa, 13,5 kDa, 12,7 kDa dan 10 kDa. Protein bobot 10 kDa menunjukkan gambar yang paling menonjol diantara protein tersebut diatas pada MES enterosit tikus putih (3).

Hasil eksperimen yang tampak pada Gambar 2 adanya pita protein dengan bobot molekul berbobot 66 kDa. Protein bobot 66 kDa ini tampaknya merupakan protein tunggal pada hasil SDS-PAGE yang dikerjakan pada penelitian ini. Cara isolasi MES HUVEC yang menemukan protein tunggal ini yang menggunakan larutan NOG konsentrasi 0,05% ternyata sangat efektif dan sederhana. Untuk mendapatkan protein yang murni biasanya menggunakan waktu yang lebih lama dan biaya yang relatif mahal yaitu menggunakan cara kromatografi kolom (9). Cara lain yang juga dapat dilakukan untuk memperoleh protein yang murni yang relatif mudah yaitu menggunakan cara elektroelusi, meskipun pada cara ini terdapat keterbatasan yaitu protein yang dihasilkan dalam jumlah yang kecil. Meskipun demikian cara ini memiliki kelebihan yaitu jumlah protein yang diisolasi secara elektroelusi cukup untuk dipakai sebagai antigen untuk tujuan penelitian selanjutnya (3).

Protein reseptor adalah protein yang dapat menghambat pelekatan bakteri pada sel reseptor apabila protein tersebut dilekatkan pada sel bakteri. Kepastian perkiraan protein tersebut sebagai protein reseptor diperlukan penelitian lanjutan yang memerlukan isolasi pemurnian. Isolasi protein murni ini dapat dikerjakan dengan metode elektroelusi (7). Hasil elektroelusi ini dilanjutkan untuk melakukan uji adesi seperti pada eksperimen selanjutnya. Gambar 2 menunjukkan protein bobot 66 kDa. merupakan protein tunggal oleh karena itu dipilih dan dicoba apakah protein MES HUVEC yang merupakan protein reseptor dari bakteri *S. typhosa* M223. Pilihan protein merujuk pada penelitian kami sebelumnya, dimana protein bobot 10 kDa ternyata merupakan protein MES enterosit tikus yang paling menonjol, disamping protein lain yaitu yang berbobot 12,5 kDa, dan 62 kDa. Protein-protein ini pada penelitian tersebut diatas selanjutnya ternyata merupakan protein reseptor *V. cholerae* yang dihasilkan dengan cara solubilisasi menggunakan cairan NOG konsentrasi 0,05% (3).

Molekul reseptor adalah merupakan molekul permukaan sel inang yang bertanggung jawab pada interaksi antar sel. penelitian ini adalah interaksi antara sel bakteri dan MES sel inang. Klasifikasi dari molekul reseptor dapat digolongkan menjadi 4 golongan utama yaitu: *integrins*, *cadherin*, *Ig. superfamily* dan *selectins*. Golongan molekul reseptor yang telah diketahui untuk bakteri patogen misalnya: *carbohydrate residues* (MES, *integrins*) untuk bakteri negatif Gram, *RGD* (arginin-glicin-aspartic acid) binding *integrins* untuk bakteri *Bordetella pertussis*, *fibronectin-collagen* untuk bakteri *Yersinia* dan *fibronectin* dan *lamelin* untuk *Mycobacterium* (10).

Sperandio, (1994), untuk menentukan jenis protein reseptor melakukan penelitian secara tidak langsung menggunakan metode *Elisa*. Metode ini relatif lebih sukar apabila dibandingkan dengan metode yang dikembangkan dalam penelitian ini. Metode *Elisa* tersebut sebagai antigennya menggunakan molekul reseptor yang diperkirakan yaitu: *Fibronectin*, *laminin*, *collagen* dan ditambah lagi peptida yang memiliki 3 macam urutan asam amino *arginin-glicin-aspartic acid* (RGD). Hasil penelitian ini didapatkan bahwa: *fibronectin*, *laminin* dan urutan asam amino RGD mengadakan ikatan dengan protein Omp V. *cholerae* O1 bobot 38 kDa, sedangkan pada *collagen* tidak ditemukan adanya ikatan.

Untuk mengetahui reseptor bakteri pada sel epitel para peneliti melakukan penelitian menggunakan tiga jenis sel. Sel pertama adalah sel epitel manusia dan dua sel kultur jaringan yaitu *HEp-2* dan *Caco-2* (12). Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian tersebut adalah isolasi protein MES dan protein *cytosol* dari ke tiga macam epitel tersebut. Setelah didapat protein masing-masing jenis sel tersebut, dilanjutkan pemeriksaan *western blotting* untuk mengetahui reseptor. Bakteri yang digunakan adalah *E. coli* yang ditumbuhkan lebih dahulu pada media yang dilabel bahan radio aktif <sup>35</sup>S-methionin. Identifikasi protein bakteri yang melekat dilakukan dengan *autoradiografi*. Penemuan ini menunjukkan *E. coli* melekat pada ke tiga macam protein ekstra seluler matriks yang digunakan, sedangkan pada protein *cytosol*-nya tidak ditemukan adanya pelekatan. Laporan selanjutnya yang ditemukan dari penelitian ini terdapat dua macam protein reseptor masing-masing bobotnya 32 – 33 kDa. yang berasal dari protein ekstra

seluler matriks sel epitel manusia, sel *HEp-2* dan sel *Caco-2*. Karakterisasi selanjutnya mengenai kandungan reseptor tersebut apakah mengandung lemak, karbohidrat dan protein maka dilakukan percobaan hambatan pelekatan dengan menggunakan ke tiga macam bahan tersebut. Bahan lemak dihilangkan dari sel epitel tersebut dengan cara ekstraksi *chloroform metanol*. Untuk melakukan perusakan protein memakai cara digesti dengan *proteinase K*. Sedangkan pengaruh gula-gula dilakukan dengan *deglycosylation* dan *periodate sugar oxidation*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pelekatan *E. coli* hanya dipengaruhi oleh digesti dengan *proteinase K*.

Hasil eksperimen yang sama kiranya perlu dilakukan untuk mengetahui lebih jauh mengenai karakter molekul reseptor *S. typhosa* M223 66 kDa yang ditemukan pada HUVEC.

## KESIMPULAN

Berdasarkan pembahasan tersebut dapat disimpulkan, ekstraksi dengan NOG 0,05% protein MES HUVEC yang paling menonjol adalah berbobot 66 kDa. Setelah diuji dengan menghubungkan antara indeks adhesi *S. typhosa* M223 pada HUVEC yang disalut dengan berbagai dosis protein MES tersebut diatas yang berbobot 66 kDa, ternyata merupakan molekul reseptor bakteri *S. typhosa* M223.

Penelitian yang lebih mendalam perlu dilakukan untuk melakukan karakterisasi lebih jauh dari molekul reseptor *S. typhosa* M223 pada HUVEC bobot 66 kDa yang telah ditemukan pada penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Simanjuntak CH. Perkembangan Vaksin Oral Demam Tifoid. Puslit Penyakit Menular Badan Litbangkes DEPKES RI. Jakarta. 1990
2. Handoyo I. Diagnosis Laboratorium Demam Tifoid. Laboratorium Instalasi Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Unair/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya. 1996
3. Sumarno. Karakterisasi Molekul Adhesi *Vibrio cholerae* M094 dan Molekul Reseptornya Pada Enterosit Tikus Putih. Disertasi Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya. 2001
4. Sanarto S, Sri Winarsih, dan Sumarno. Protein Hemagglutinin 36 kDa OMP *Salmonella typhi*. Majalah Kedokteran Univ. Brawijaya. 1999, 15; 87-93
5. Uun Yanuar. Karakterisasi dan Identifikasi Molekul Reseptor Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC) Culture Dengan Molekul Adhesi *Salmonella typhosa* Pada Kondisi Glukosa Tinggi. Tesis. Pascasarjana Univ. Brawijaya. Malang. 2001
6. Laemli UK. Cleavage of Structural Protein During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 680-686
7. Sri Wienarsih, Sumarno, dan Roekistningsih. Fungsi dan Sifat Immunogenitas Protein Hemagglutinin 32 kD dan 20 kD pada *Helicobacter pylori*. Majalah Kedokteran Univ. Brawijaya. Malang. 1998, 13; 135-141
8. Fabre-Bonte S, Darfeuille -Michaud A, and Foriestier C. Aggregative Adherence of *Klebsiella pneumoniae* to Human Intestine-407. *Infect Immun*. 1995, 63; 1318-1328
9. Nagayama K, Oguchi T, Arita M, and Honda T. Purification and Characterization of Cell-Associated Hemagglutinin *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun*. 1995, 63; 1987-1992
10. Van Nhieu GT and Sansonetti PJ. Cell Adhesion Molecule S and Bacterial Pathogens. In: *Cellular Microbiology*. 2000
11. Sperandio V, Giron JA, Siveira WD and Kaper JB. The Omp U Membrane Protein, Potential Adherence Factor of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*. 1995, 63; 4433-4438
12. Manjerrez-Hernandez A, Gavilanes-Para S, Chaves-Berrocal ME, Molina-Lopes J and Cravioto A. Binding of Diarrheagenic *Escherichia coli* to 32-to 33 kDa. Human Interstineal Brush Boerder Protein. *Infect Immun*. 1997, 65; 4494-4501
13. Sumarno. Molekul Adhesi 37,8 kDa OMP *Vibrio cholerae* O1 M094V. Majalah Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. 1999, 15; 87-93
14. Sumarno, Noorhamdani AS, Yuswanto A, dan Eihaskoro S. Karakterisasi Persial Proterin Hemagglutinin *Vibrio cholera* M094. Majalah Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. 1996, 23; 26-29