

## Karakterisasi Immunogenesitas Protein Pili *Salmonella Typhi*: Analisis Absorban Antibodi dan Spesifisitas dengan Western Blot pada Mencit Balb/C

### *Immunogenicity Characterization Of Salmonella Typhi Pili Protein: Analysis Of Antibody Absorbance And Specificity Using Western Blot In Balb/C Mice*

Al Hidayani <sup>1\*</sup>

Sri Darmawati <sup>2</sup>

Fitria Hariati Ramdhani <sup>3</sup>

Windya Nazmatur Rahmah <sup>4</sup>

\*Universitas Muhammadiyah Palangka Raya

\*Universitas Muhammadiyah Semarang

\*email: [alhidayani@umpr.ac.id](mailto:alhidayani@umpr.ac.id)

#### Abstrak

Protein pili berperan dalam adhesi dan bersifat imunogenik, berpotensi sebagai kandidat vaksin subunit. Penelitian ini menganalisis immunogenesitas protein pili *S. typhi* isolat BA07.4 melalui pengukuran absorpsi antibodi dan karakterisasi spesifisitasnya. Protein pili diisolasi dengan metode biphasic, dimurnikan, dan digunakan untuk imunisasi 30 ekor mencit Balb/C (6 kelompok: kontrol dan dosis 2, 3, 4, 5, 6 µg) secara intraperitoneal tiga kali. Kadar antibodi diukur dengan inhouse ELISA (λ 405 nm) dan spesifisitasnya dianalisis dengan Western blot. Rerata absorpsi tertinggi pada dosis 5 µg (2,827), diikuti dosis 6 µg (2,678), 4 µg (2,456), 3 µg (2,134), 2 µg (1,856), dan kontrol (0,423). Analisis One Way ANOVA menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok (p=0,000) dengan semua kelompok perlakuan berbeda signifikan terhadap kontrol (p<0,05). Western blot menunjukkan pita spesifik pada berat molekul 87, 58, dan 42 kDa pada kelompok dosis 5 µg, sementara kontrol tidak menunjukkan pita. Protein pili *S. typhi* bersifat imunogenik dengan dosis optimum 5 µg, menghasilkan antibodi yang secara spesifik mengenali sub unit protein pili 87, 58, dan 42 kDa, mendukung potensinya sebagai kandidat vaksin subunit.

#### Abstract

Typhoid fever caused by *Salmonella Typhi* is endemic in Indonesia with limitations of current vaccines. Pili protein plays a role in bacterial adhesion and is immunogenic, holding potential as a subunit vaccine candidate. This study analyzed the immunogenicity of *S. typhi* BA07.4 isolate pili protein by measuring antibody absorbance and characterizing its specificity. Pili protein was isolated using the biphasic method, purified, and used to immunize 30 Balb/C mice (6 groups: control and doses of 2, 3, 4, 5, 6 µg) intraperitoneally three times. Antibody levels were measured by in-house ELISA (λ 405 nm) and specificity was analyzed by Western blot. The highest mean absorbance was in the 5 µg dose group (2.827), followed by 6 µg (2.678), 4 µg (2.456), 3 µg (2.134), 2 µg (1.856), and control (0.423). One Way ANOVA showed significant differences between groups (p=0.000), with all treatment groups significantly different from the control (p<0.05). Western blot analysis revealed specific bands at molecular weights of 87, 58, and 42 kDa in the 5 µg dose group, while the control group showed no bands. *S. typhi* pili protein is immunogenic with an optimum dose of 5 µg, generating antibodies that specifically recognize pili protein subunits of 87, 58, and 42 kDa, supporting its potential as a subunit vaccine candidate.

#### Kata Kunci:

Protein pili; *Salmonella typhi*; immunogenesitas; antibodi; Western blot

#### Keywords:

Pili protein; *Salmonella typhi*; immunogenicity; antibody; Western blot

## PENDAHULUAN

Demam tifoid, yang disebabkan oleh *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*), masih menjadi masalah kesehatan masyarakat global, terutama di negara berkembang dengan sanitasi yang buruk seperti Indonesia (WHO, 2023). Patogenitas bakteri ini

ditentukan oleh berbagai faktor virulensi, termasuk antigen somatik (LPS), flagel, kapsul (Vi), dan pili (fimbriae) (Dougan & Baker, 2014). Pili adalah struktur protein tipis pada permukaan bakteri yang berperan krusial dalam adhesi ke sel inang, pembentukan biofilm, dan kolonisasi, sehingga menjadikannya target yang

menarik untuk pengembangan vaksin.. Pendekatan imunoinformatika terkini telah mengidentifikasi protein pili sebagai salah satu antigen kunci untuk pengembangan vaksin multi-epitop melawan *S. typhi* (Bidar Ajerloo et al., 2025; Beiranvand et al., 2026). Meskipun demikian, studi in vivo yang mengkarakterisasi imunogenesitas protein pili asli, terutama terkait dosis optimum dan sub unit protein yang dikenali oleh sistem imun, masih terbatas. Padahal, informasi ini fundamental tidak hanya untuk pengembangan vaksin subunit tetapi juga untuk pengembangan diagnostik berbasis antigen. Penelitian ini bertujuan untuk mengisi celah tersebut dengan menganalisis imunogenesitas protein pili *S. typhi* isolat BA07.4 melalui pengukuran absorbansi antibodi pada berbagai dosis imunisasi serta mengkarakterisasi spesifisitas antibodi yang terbentuk menggunakan metode Western blot pada model mencit Balb/C.

## METODE PENELITIAN

Penelitian eksperimental laboratorik ini dilaksanakan dari Agustus 2019 hingga Desember 2020 di Laboratorium Rekayasa Genetik PAU Universitas Gadjah Mada, Laboratorium Hewan Coba, dan Laboratorium Biologi Imunologi Universitas Muhammadiyah Semarang, setelah mendapat persetujuan etik (No: 00034/04/LPPT/XI/2020). Protein pili diisolasi dari kultur *S. typhi* isolat BA07.4 menggunakan metode biphasic. Kultur dalam media BHI cair diinokulasi ke media BHI agar miring dan diinkubasi 48 jam. Bakteri ditambahkan TCA 3%, disentrifugasi, dan pelet dicuci dengan PBS. Pili dipotong dari sel menggunakan vortex super mixer pada 4°C. Supernatan yang mengandung protein pili dipekatkan dengan amonium sulfat 40%, kemudian didialisis terhadap PBS 0,5x selama 2x24 jam. Konsentrasi protein diukur dan disimpan pada -20°C. Tiga puluh ekor mencit Balb/C betina (8 minggu, ±30 g) dibagi menjadi 6 kelompok (n=5): kontrol (PBS+adjuvan) dan kelompok dosis antigen 2, 3, 4, 5, 6 µg. Imunisasi dilakukan secara

intraperitoneal tiga kali, yaitu hari ke-0 (dengan *Freund's complete adjuvant*), hari ke-14, dan ke-28 (dengan *Freund's incomplete adjuvant*). Pada hari ke-35, darah diambil melalui *cardiac puncture* dan serum dipisahkan. Kadar antibodi IgG anti-protein pili diukur menggunakan metode inhouse ELISA. Mikroplate dilapisi antigen (5 µg/mL), diblokir dengan BSA 1%, kemudian diinkubasi berturut-turut dengan serum mencit (pengenceran 200x), konjugat *Anti-mouse IgG Alkaline Phosphatase* (Sigma), dan substrat NPP. Absorbansi dibaca pada λ 405 nm. Data dianalisis dengan One Way ANOVA dan uji lanjut Tukey menggunakan SPSS 17 (p≤0,05). Profil protein pili dianalisis dengan SDS-PAGE (gel pemisah 10%). Untuk Western blot, protein hasil SDS-PAGE ditransfer ke membran nitroselulosa secara semi-dry. Membran diblokir, lalu diinkubasi dengan serum mencit (dosis 5 µg dan kontrol, pengenceran 1:100), dilanjutkan dengan konjugat yang sama. Deteksi menggunakan substrat NBT-BCIP hingga pita ungu terbentuk.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### HASIL

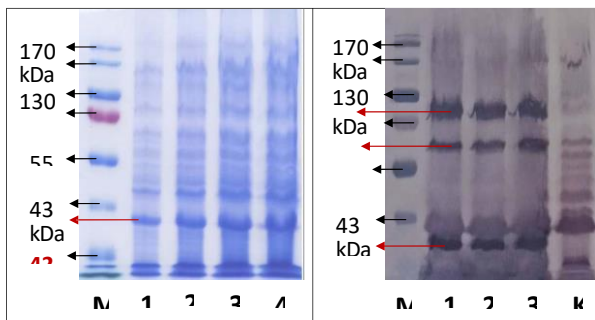
Hasil pengukuran absorbansi antibodi serum mencit Balb/C setelah imunisasi dengan protein pili pada berbagai dosis menunjukkan pola dose-response yang jelas.

**Tabel I.** Absorbansi antibodi serum mencit Balb/C setelah imunisasi dengan protein pili *S. typhi* pada dosis 2-6 µg

Dosis	Absorbansi (Mean ± SD)
Kontrol	0,423 ± 0,087
2	1,856 ± 0,234
3	2,134 ± 0,312
4	2,456 ± 0,287
5	2,827 ± 0,356
6	2,678 ± 0,298

Rerata absorbansi tertinggi terdapat pada kelompok dosis 5 µg (2,827), diikuti dosis 6 µg (2,678). Kelompok kontrol menunjukkan absorbansi terendah (0,423). Uji One Way ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok (p=0,000). Uji *Post Hoc* Tukey

mengungkapkan bahwa semua kelompok perlakuan berbeda signifikan dibandingkan kontrol ( $p < 0,05$ ), namun antar kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ). Analisis Western blot menggunakan serum pool dari kelompok dosis 5  $\mu\text{g}$  (absorbansi tertinggi) sebagai antibodi primer menunjukkan adanya pita-pita spesifik.



Gambar 1. Visualisasi protein pili *S. typhi*. (A) SDS-PAGE, (B) Western blot. M: Marker, 1-3: Sampel (serum perlakuan dosis 5  $\mu\text{g}$ ), K: Kontrol (serum tanpa imunisasi antigen)

Pada Gambar 1B, terlihat pita ungu yang jelas pada berat molekul sekitar 87, 58, dan 42 kDa di ketiga jalur sampel perlakuan (1, 2, dan 3). Sebaliknya, pada jalur kontrol (K) yang menggunakan serum dari mencit tanpa imunisasi antigen, tidak terdeteksi pita apapun, mengkonfirmasi spesifisitas reaksi.

## PEMBAHASAN

### Imunogenesitas Protein Pili dalam Menginduksi Antibodi Spesifik

Penelitian ini mendemonstrasikan bahwa protein pili *S. typhi* isolat BA07.4 bersifat imunogenik pada mencit Balb/C. Peningkatan absorbansi antibodi seiring peningkatan dosis hingga 5  $\mu\text{g}$  mengindikasikan hubungan dose-response yang positif. Dosis 5  $\mu\text{g}$  menghasilkan respons antibodi tertinggi, menandakannya sebagai dosis optimum dalam penelitian ini. Penurunan absorbansi pada dosis 6  $\mu\text{g}$  mungkin disebabkan oleh fenomena toleransi imun atau supresi akibat dosis antigen yang terlalu tinggi, yang dapat memicu apoptosis sel T (Janeway *et al.*, 2001).

Perbedaan signifikan semua kelompok perlakuan terhadap kontrol ( $p < 0,05$ ) membuktikan bahwa respons antibodi yang terukur bersifat spesifik terhadap protein pili, bukan karena pengaruh adjuvan Freund's yang berperan sebagai immunopotentiator. Temuan ini selaras dengan studi *in silico* yang mengidentifikasi protein pili (major curlin subunit) sebagai protein dengan antigenisitas tinggi dan kandidat utama dalam desain vaksin multi-epitop untuk *S. typhi* (Bidar Ajerloo *et al.*, 2025; Beiranvand *et al.*, 2026). Pendekatan komputasi modern seperti *machine learning* juga semakin menegaskan potensi antigen ini dengan mampu memprediksi imunogenisitas protein *Salmonella* secara efisien (Spiga *et al.*, 2025).

Studi oleh Athavale *et al.* (2025) menambah perspektif penting dengan menunjukkan kompleksitas respons imun di daerah endemis. Mereka menemukan bahwa individu yang sembuh dari demam tifoid menunjukkan peningkatan IgM yang signifikan terhadap berbagai antigen, termasuk protein membran luar (OMP). Hal ini menggarisbawahi bahwa pemilihan antigen seperti protein pili harus mempertimbangkan dinamika respons imun populasi target. Selain itu, pemahaman tentang dinamika antibodi pasca infeksi atau vaksinasi, termasuk fenomena penurunan titer dan kemungkinan infeksi ulang seperti yang dijelaskan oleh Teunis *et al.* (2025), menjadi krusial dalam mengevaluasi efektivitas jangka panjang sebuah kandidat vaksin.

### Spesifisitas Antibodi terhadap Sub Unit Protein Pili

Analisis Western blot mengkonfirmasi spesifisitas antibodi yang dihasilkan. Antibodi dari mencit yang diimunisasi dengan dosis 5  $\mu\text{g}$  secara spesifik mengenali tiga sub unit protein pili dengan berat molekul 87, 58, dan 42 kDa. Tidak adanya pita pada kelompok kontrol menegaskan tidak ada reaksi silang nonspesifik. Keberadaan beberapa pita imunogenik ini menunjukkan bahwa protein pili memiliki multiple epitop yang dikenali

oleh sistem imun humoral, yang menguntungkan karena respons poliklonal dapat memberikan perlindungan lebih luas. Berat molekul yang terdeteksi ini kemungkinan merupakan sub unit pilin atau kompleks protein yang menyusun struktur pili utuh, seperti yang disandi oleh gen *pilS* (Dogan & Baker, 2014). Karakterisasi ini penting untuk pengembangan lebih lanjut, baik untuk produksi protein rekombinan sub unit tertentu maupun untuk desain peptida sintetik sebagai kandidat vaksin.

### Implikasi dan Aplikasi Potensial

Hasil penelitian ini memiliki implikasi penting. Pertama, menguatkan bukti bahwa protein pili adalah target imunogenik yang layak untuk pengembangan vaksin subunit *S. typhi*. Kedua, antibodi spesifik yang dihasilkan dapat dimanfaatkan untuk pengembangan kit diagnostik cepat (*rapid diagnostic test*) berbasis deteksi antigen. Pendekatan ini dapat mengatasi kelemahan tes deteksi antibodi konvensional yang sering memberikan hasil positif palsu di daerah endemis karena paparan sebelumnya atau infeksi berulang (Singh *et al.*, 2026; Teunis *et al.*, 2025). Perkembangan terbaru dalam teknologi immunoassay multiplex, seperti yang dikembangkan oleh Avolio *et al.* (2025), mampu mengukur respons antibodi terhadap berbagai patogen enterik sekaligus dari sampel darah maupun saliva. Hal ini membuka peluang untuk pengembangan alat diagnostik berbasis antigen pili yang lebih komprehensif dan akurat di masa depan.

### Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan. Pertama, hanya mengukur respons humoral IgG sistemik, belum mengevaluasi respons mukosal (IgA) atau seluler (misalnya, produksi IFN- $\gamma$ ). Kedua, belum melakukan uji tantangan (*challenge test*) untuk membuktikan efektivitas protektif antibodi. Penelitian lanjutan dengan desain lebih komprehensif, termasuk pengukuran sitokin seperti IFN- $\gamma$  (MacLennan *et al.*, 2026) dan uji tantangan, sangat diperlukan untuk memvalidasi potensi protein pili sebagai kandidat vaksin yang efektif.

## KESIMPULAN

Pili *Salmonella typhi* isolat BA07.4 terbukti imunogenik pada mencit Balb/C dengan dosis optimum 5  $\mu$ g yang menghasilkan absorbansi antibodi tertinggi. Antibodi yang terinduksi secara spesifik mengenali tiga sub unit protein pili dengan berat molekul 87, 58, dan 42 kDa berdasarkan analisis Western blot. Hasil ini, yang diperkuat oleh berbagai studi imunoinformatika dan serologi terkini, mengkonfirmasi potensi protein pili sebagai kandidat vaksin subunit maupun komponen diagnostik untuk demam tifoid, meskipun diperlukan studi lebih lanjut untuk evaluasi protektivitas dan pengembangannya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Athavale, A., Subramaniam, A., Hussain, A., Rani, I., Rathore, D. K., Upadhyay, S. K., ... & Rai, R. C. (2025). Antibody Responses to Salmonella Typhi Antigens among Typhoid Recovered Individuals in an Endemic Region. *bioRxiv*, 2025.07.04.663140.
- Avolio, L. N., Pisanic, N., Kruczynski, K. L., Moss, W. J., Talaat, K. R., Kaminski, R. W., ... & Heaney, C. D. (2025). Development of an enteric pathogen multiplex immunoassay to measure antibody responses in blood and saliva for integrated serology applications. *Journal of Immunological Methods*, \*542\*, 113898.
- Beiranvand, M., Shams, N., Jaydari, A., Nazifi, N., & Khademi, P. (2026). A wide proteome analysis to engineer an efficient epitope based vaccine against Salmonella Typhi: An immunoinformatic study. *Human Immunology*.
- Bidar Ajerloo, M., Hajizade, A., Nazarian, S., & Khalili, K. (2025). Rational design of a multi epitope vaccine against Salmonella typhi via subtractive proteomics, reverse vaccinology and molecular modeling. *Scientific Reports*, \*15\*(1), 32057.
- De Coster, I., AbdelGhany, M., Sarakinou, E., Fineschi, C., Marchetti, E., La Gaetana, R., ... & Arora, A.K. (2026). Safety and immunogenicity of a conjugate vaccine candidate against Salmonella enterica serovars Typhi and Paratyphi A in healthy adults in Europe: a phase I randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases*.
- Dogan, G., & Baker, S. (2014). *Salmonella enterica* serovar Typhi and the pathogenesis of typhoid fever. *Annual Review of Microbiology*, \*68\*, 317-336.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). *Immunobiology: The Immune System*

- in Health and Disease* (5th ed.). New York: Garland Science.
- MacLennan, C.A., Rondini, S., Micoli, F., & Martin, L.B. (2026). Multivalent vaccines for invasive Salmonella disease: need, rationale, and immunological foundations. *Infection and Immunity*.
- Milligan, R., Paul, M., Richardson, M., & Neuberger, A. (2018). Vaccines for preventing typhoid fever. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (5), CD001261.
- Nga Tran, V.T., Van, T.T., Tuan, A.T., Klemm, E.J., Minh, C.N.N., Vinh, P.V., ... & Baker, S. (2017). An evaluation of purified Salmonella Typhi protein antigens for the serological diagnosis of acute typhoid fever. *Journal of Infection*, \*75\*(2), 104-114.
- Salerno-Goncalves, R., Galen, J.E., Levine, M.M., Fasano, A., & Sztein, M.B. (2026). Manipulation of Salmonella Typhi Gene Expression Impacts Innate Cell Responses in the Human Intestinal Mucosa. *Infection and Immunity*.
- Singh, H., Kumar, A., & Sharma, R. (2026). Target product profile to guide development of next generation diagnostic test for Salmonella enterica: Responding to the crisis of drug resistant typhoid. *Journal of Infection and Public Health*, \*19\*(4), 103177.
- Spiga, O., Visibelli, A., Pettini, F., Roncaglia, B., & Santucci, A. (2025). SHASI-ML: a machine learning-based approach for immunogenicity prediction in Salmonella vaccine development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, \*15\*, 1536156.
- Teunis, P. F., Seidman, J. C., Tamrakar, D., Qamar, F. N., Saha, S. K., Garrett, D. O., ... & Aiemjoy, K. (2025). Seroresponse to repeated infections with salmonella enterica typhi and paratyphi A. *Epidemics*, \*54\*, 100874.
- World Health Organization (WHO). (2023). *Typhoid fever*. Fact sheet.