

ANALISIS PROTEIN PILLI *Salmonella typhi* Isolat RS. Kariadi Semarang DENGAN ELEKTROFORESIS SDS-PAGE

*Pilli Protein Salmonella Typhi Isolate Kariadi Hospital Semarang Analysis
Through Electrophoresis SDS-Page*

Sri Darmawati¹⁾ Ratih Haribi²⁾

- 1 Lecturer of Nursing and Health Faculty University of Muhammadiyah Semarang
2 Lecturer of Nursing and Health Faculty University of Muhammadiyah Semarang

ABSTRACT

Background : *Salmonella typhi* is bacteria which causes typhoid fever. Typhoid fever is severaly serious, infectious decease and is endemic decease in Indonesia with relatively high frequency rate around 358-810/100.000 people each year. This decease is usually spreading along with many kinds of decease which also have relatively high mortality rate, that is 1-5% of the sufferers (Punjabi, NH., 2004). The infection process of bacteria into human body is signified with bacteria cell adhering in mucosa intestinal surface. Pilli is structured by pillin protein consisting of several sub units of pilli protein.

Objective : conducting pilli protein *Salmonella typhi* isolate Kariadi Hospital Semarang analysis through electrophoreses SDS-PAGE, so that the amount of sub unit of pilli protein with each its molecule weight can be found out.

Method : This research is conducted through three stages; firstly, bacteria cultivation with biphasic media (BHI Agar and broth BHI); secondly, pilli isolation with Ehara method (1986); thirdly, sub unit of pilli protein separation with 12% SDS-PAGE based on Lemmli method (1970).

Result : There are four major sub units of protein in pilli, that is, 36kDa; 26,5 kDa; 22,2kDa; 18,6kDa and there are also four minor sub units of protein pilli, that is, 116 kDa; 62,3kDa; 45kDa; 20,9kDa, and several other minor sub units of protein with every thin band.

Keywords : *Salmonella* and *Electrophoresis*

PENDAHULUAN

Salmonella typhi (*S.typhi*) adalah bakteri yang menyebabkan terjadinya demam typhoid. Demam typhoid adalah suatu penyakit infeksi serius yang telah lama dikenal serta merupakan penyakit endemis di Indonesia, dengan angka kejadian termasuk tertinggi di dunia yaitu antara 358-810/100.000 penduduk/tahun. Penyakit ini dianggap serius karena dapat disertai berbagai penyakit dan juga mempunyai angka kematian yang cukup tinggi, yaitu 1-5 % dari penderita (Punjabi, NH., 2004). Demam typhoid dapat terjadi pada semua umur, terbanyak pada usia

3-19 tahun, sekitar 77% dengan puncak tertinggi pada usia 10-15 tahun (Simanjuntak, 1993).

Bakteri ini ditularkan melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi oleh kotoran atau tinja dari seseorang pengidap atau penderita demam typhoid. Kuman ini akan masuk melalui mulut dan hanyut ke saluran pencernaan. Apabila kuman masuk ke dalam tubuh manusia, tubuh akan berusaha untuk mengeliminasi. Tetapi bila kuman dapat bertahan dan jumlah yang masuk cukup banyak, maka kuman akan berhasil mencapai usus halus dan berusaha

masuk ke dalam tubuh yang akhirnya dapat merangsang sel darah putih untuk menghasilkan interleukin yang merangsang terjadinya gejala demam, perasaan lemah, sakit kepala, nafsu makan berkurang, sakit perut, gangguan buang air besar serta gejala lainnya. Usaha pencegahan dapat dilakukan dengan cara perbaikan sanitasi lingkungan dan hygiene perseorangan, tetapi hal ini akan memakan waktu yang lama dan biaya yang cukup besar. Sehingga dapat dilakukan dengan cara yang lain yaitu dengan mencegah proses masuknya bakteri ke dalam tubuh. Masuknya bakteri ke dalam tubuh diawali dengan terjadinya perlekatan sel bakteri pada permukaan mukosa intestinal.

Pilli pada *Salmonella* merupakan salah satu faktor perlekatan pada permukaan mukosa intestinal, hal ini penting dalam proses invasi bakteri menembus dinding sel epitel yang merupakan awal mekanisme patogenesis. Setelah terjadi invasi bakteri ke dalam mukosa intestinal diikuti kolonisasi. Pilli tersusun dari protein pillin yang terdiri dari beberapa sub unit protein pilli (Brock, T. D. dan M.T. Madigan, 1991)

Berdasarkan permasalahan itu, maka penelitian ini bertujuan untuk melakukan analisis molekuler protein pilli *Salmonella typhi* dengan elektroforesis SDS-PAGE sehingga dapat diketahui jumlah protein sub unit pilli dengan berat molekulnya.

METODE

Penelitian ini dilakukan dengan 3 tahapan yaitu: kultivasi bakteri, isolasi protein pilli dan separasi protein pilli dengan SDS-PAGE.

a. Kultivasi bakteri

Kultivasi bakteri *Salmonella typhi* isolat RS. Kariadi Semarang menggunakan media bifasik (BHI agar ditambah BHI cair), diinkubasi 48 jam pada suhu 37 C tanpa agitasi (Widya, A. Dan S. Darmawati, 2000)

b. Isolasi protein pilli (Metoda Ehara, 1986)

Tabung sentrifus volume 250 ml

disiapkan, kemudian 200 ml kultur bakteri dimasukkan ke dalam tabung, ditambah *Trichloro Acetic Acid* (TCA) hingga konsentrasinya 3% (6 ml TCA ke dalam 200ml kultur kuman), dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya kultur bakteri disentrifus 700 g pada suhu 4°C selama 20 menit, supernatan kemudian dibuang, dan pelet diresuspensikan dalam 10 ml PBS pH 7,4. Pilli bakteri kemudian dipotong dari permukaan sel dengan *vortex super mixer* selama 5 kali 3 menit pada suhu 4° C, kemudian suspensi bakteri disentrifus 700 g selama 20 menit pada suhu 4° C. Supernatan adalah protein pilli, kemudian ditambahkan 40 % ammonium sulfat ke dalam supernatan, dilarutkan pada suhu 4° C sampai larut sempurna.

Selanjutnya supernatan disentrifus 700 g selama 20 menit pada suhu 4° C, setelah itu pelet diresuspensikan dalam 1 ml PBS pH 7,4. Untuk menghilangkan ammonium sulfat dari suspensi protein dilakukan dialisa terhadap PBS selama 24 jam, larutan dialisa diganti 2 kali. Selanjutnya protein hasil dialisa ditentukan konsentrasinya dengan menggunakan Biorat protein assay, diukur OD pada panjang gelombang 595 nm menggunakan spektrofotometer (Bradford, 1970).

c. Separasi protein pilli dengan SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamid Gel Electroforeses)

Separasi protein pilli dengan SDS-PAGE menurut metode Laemmli (1970) disiapkan plat glas, spaser, sisir yang telah dibersihkan dengan detergen dan alkohol 70% untuk pencetak gel. Setelah alat pencetak gel disiapkan, dimasukkan 4 ml larutan 12 % sebagai gel pemisah, kemudian ditambahkan butanol untuk menutup permukaan larutan secukupnya, ditunggu 30-60 menit sampai terjadi polimerisasi. Selanjutnya gel dibersihkan dengan menyemprotkan aquades ke permukaannya, sisir dimasukkan, dan gel pemampat yang

telah disiapkan dimasukkan pula, ditunggu selama 30 menit atau sampai terjadi polimerisasi, sisir diambil, gel siap digunakan. Selanjutnya gel yang telah mengalami polarisasi dipasang pada Biorat mini protein II, kemudian ditambahkan ke dalamnya larutan elektroda bufer pH 8,3.

Sampel disiapkan, sampel ditambah 5x sampel bufer dengan perbandingan 4:1 (v/v), setelah itu campuran tersebut dipanaskan selama 2 menit di dalam air yang telah mendidih. Sampel selanjutnya siap dimasukkan ke dalam gel, setelah itu diberi aliran listrik dengan tegangan 100 volt hingga bromo phenol blue keluar dari bagian bawah gel.

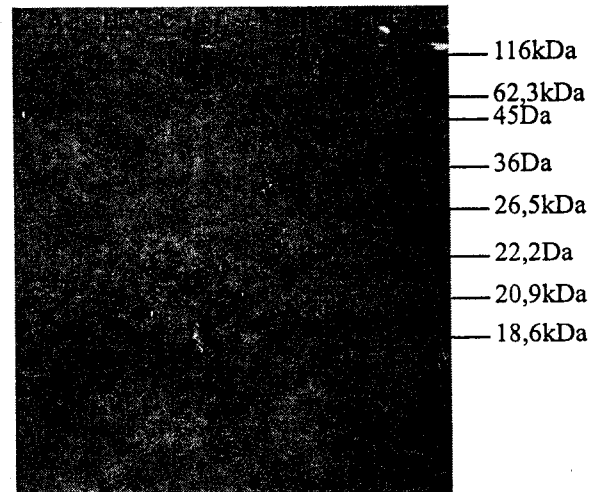
Gel diambil, selanjutnya diwarnai dengan 0,1% *Coomassie Brilliant Blue R-250* selama 30-60 menit hingga pita-pita protein terwarnai. Selanjutnya untuk menghilangkan warna pada gel yang tidak mengandung protein diberi larutan destaining, larutan destaining diganti 3-4 kali hingga gel tampak bersih. Kemudian untuk menentukan berat molekul protein yang diinginkan dihitung R_f nya dan diplotkan pada grafik logaritmik dari R_f marker protein yang berat molekulnya telah diketahui.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Protein Pilli

Pilli *Salmonella typhi* diisolasi dengan metode Ehara et al.(1986), kemudian diseparasi dengan 12% SDS-PAGE dan diwarnai dengan *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Hasil yang diperoleh menunjukkan 4 pita protein utama yang berat molekulnya 36 kDa; 26,5kDa; 22,2kDa; 18,6 kDa yang tampak tebal diantara protein-protein yang tampak. Selain itu terlihat pula beberapa protein minor yang berat molekulnya 116kDa; 62,3kDa; 45kDa; dan 20,9 kDa yang tampak tipis (Gambar 1). Dua diantara protein tersebut yaitu 36kDa dan 45 kDa merupakan protein yang serupa dengan protein yang ditemukan oleh Tri Murini (1998) pada *Salmonella typhi* isolat RS

Sarjito Yogyakarta. Selain itu pada *Salmonella typhi* isolat RS Sarjito juga ditemukan subunit-subunit protein yang lain namun dengan berat molekul yang berbeda dengan protein sub unit pilli dari *Salmonella typhi* isolat RS Kariadi. Perbedaan sub unit protein tersebut disebabkan karena perbedaan genetic dari isolate yang berbeda, hal ini dapat digunakan sebagai salah satu alat untuk mendeteksi asal spesies yang menginfeksi.



Gambar 1.
Elektroforesis protein pilli *Salmonella typhi* isolat RS Kariadi Semarang
Kolom A, B, C, E, F, G, H, dengan 8 pita protein (116kDa; 62,3kDa; 45kDa; 36kDa; 26,5kDa; 22,2kDa; 20,9kDa; 18,6kDa). Kolom D adalah molekul standar (Sigma Marker)

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian mengenai analisis molekuler protein pilli *Salmonella typhi* isolat RS. Kariadi Semarang dengan elektroforesis SDS-PAGE sehingga dapat disimpulkan bahwa : Ada 4 sub unit protein utama pada pilli yaitu 36kDa; 26,5kDa; 22,2kDa; 18,6kDa; dan ada 4 protein minor yaitu 116kDa; 62,3kDa; 45kDa; 20,9kDa; serta beberapa protein minor yang sangat tipis sekali.

SARAN

Perlu dilakukan analisis molekuler protein pilli *Salmonella typhi* dari beberapa isolat yang lain dari Jawa sehingga dapat

diketahui profil protein pilli *Salmonella typhi* dari beberapa isolate dari Jawa.

DAFTAR PUSTAKA

Brock, T. D. dan M.T. Madigan, 1991. *Biology of Microorganism*. Prentice Hall, America. Pp. 72-73.

Ehara M, M, Ishibashi, S. Watanabe, M. Iwanaga, S. Shimotori, dan T. Naito, 1986. Fimbriae of *Vibrio cholerae* 01: observation of fimbriae on the organism adherent to the intestinal epithelium and development of new medium to enhance fimbriae. *Trop. Med.* 28: 21-23

Punjabi, N.H. 2004. Demam Tifoid dan Imunisasi Terhadap Penyakit ini. U.S. N A M R U - 2 , J a k a r t a . <http://www.papdi.Or.id/Imunisasi/demam typhoid dan imunisasi terh.htm>

Simanjuntak, C. 1993. Demam Typoid. Epidemiologi dan Perkembangan Penelitian. *Cermin Dunia Kedokteran*. Vol. 3:52-53

Widya, A., dan S. Darmawati, 2000. Isolasi dan Karakterisasi Protein Sub Unit Pilli *Pasteurella multocida* Serotipe B:2. *Jurnal Pengembangan Peternakan Tropis*. Fak. Peternakan UNDIP. Vol. 26 nomor 3