

ANALISIS MOLEKULER PROFIL PROTEIN PILLI UNTUK MENGUNGKAP HUBUNGAN SIMILARITAS 26 STRAIN *Salmonella typhi* ISOLAT JAWA

DARMAWATI, S¹, ANWAR, S.², ARTAMA, T. W³

¹Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang
Jl. Kedungmundu Raya no.18 Semarang, Indonesia

²Fakultas Peternakan, Universitas Diponegoro, Kompleks Drh. R. Soejono Koesoemowardojo
Tembalang, Semarang 50275, Indonesia

³Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Karang Malang Yogyakarta, Indonesia

ABSTRAK

Variasi dan hubungan similaritas 26 strain *Salmonella typhi* Isolat Jawa merupakan awal untuk melacak protein sub unit pilli spesifik yang memiliki aktivitas hemaglutinasi. Tujuan penelitian analisis molekuler profil protein pilli untuk mengungkap hubungan similaritas 26 Strain *S. typhi* Isolat Jawa. Analisis dilakukan terhadap 26 strain yang berasal dari Surabaya, Madiun, Malang, Salatiga, Magelang, Bandung, Bogor, Jakarta, Yogyakarta dengan elektroforesis SDS-PAGE. Analisis hubungan similaritas digunakan program MVSP, untuk mengkonstruksi dendrogram yang mencerminkan klasifikasi dari 26 strain *S. typhi* Isolat Jawa berdasarkan nilai indeks similaritas (S_{SM}) dengan algoritma UPGMA. Hasil analisis profil protein pilli menunjukkan (1) Jumlah pita protein sub unit pilli bervariasi : 8-17 pita, BM tertinggi 200 kD, terendah 10 kD, dengan 20 karakter. (2) Protein 100 kD, 50 kD, 45 kD dan 40 kD adalah protein sub unit pilli yang dimiliki oleh 26 strain *S. typhi* Isolat Jawa. (3) Dari 26 strain *S. typhi* Isolat Jawa terdiri dari dua kelompok besar yang mempunyai indeks similaritas 61,2%. Kelompok pertama adalah strain *S. typhi* Isolat Jawa Tengah dan Jawa Timur, dan kelompok ke dua adalah strain *S. typhi* Isolat Jawa Barat dan DKI. Pita 14 (12,5 kD) dan 15 (78kD) dari protein sub unit pilli hanya dimiliki strain *S. typhi* dari Surabaya. Pita 18(35kD) dan 20 (72kD) dari protein sub unit pilli hanya dimiliki oleh Strain *S. typhi* dari DKI Jakarta.

Kata kunci: Protein Pilli, Hubungan similaritas, Salmonella typhi

PENDAHULUAN

Salmonella typhi (*S. typhi*) adalah bakteri penyebab terjadinya demam tipoid, yang merupakan penyakit infeksi serius serta merupakan penyakit endemis di Indonesia dan negara berkembang. Penyakit ini 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 masuk melalui mulut bersama makanan dan minuman yang terkontaminasi oleh bakteri tersebut, kemudian hanyut ke saluran pencernaan. Apabila bakteri berhasil mencapai usus halus dan masuk ke dalam tubuh mengakibatkan terjadinya demam typhoid. Masuknya bakteri ke dalam tubuh diawali dengan terjadinya perlekatan sel bakteri pada permukaan mukosa intestinal menggunakan pilli.

Pilli dari beberapa bakteri patogen (*Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, *S. typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*) berfungsi sebagai faktor perlekatan bakteri pada permukaan sel inang,

Darmawati (2005), Murini (1998), dan Eri (2006) menyatakan bahwa profil protein pilli dari *S. typhi* Isolat Rumah Sakit Kariadi, Rumah Sakit Sarjito dan Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta sangat bervariasi meskipun diantaranya memiliki beberapa protein hemaglutinin sub unit pilli dengan berat molekul yang sama yaitu 36 dan 45 kD. Oleh karena itu, analisis molekuler profil protein pilli dari 26 strain *S. typhi* Isolat Jawa sangat penting artinya untuk dapat diperoleh informasi profil protein pilli dan menentukan hubungan similaritas dari 26 strain *S. typhi* Isolat Jawa

Tujuan penelitian analisis molekuler profil protein pilli untuk mengungkap hubungan similaritas 26 Strain *S. typhi* Isolat Jawa. Analisis dilakukan terhadap 26

strain yang berasal dari Surabaya, Madiun, Malang, Salatiga, Magelang, Bandung, Bogor, Jakarta, Yogyakarta

BAHAN DAN METODA

Isolasi *Salmonella typhi* Isolat Jawa

Salmonella typhi diisolasi dari darah pasien di Rumah Sakit (Jawa Barat) yaitu: RS. Hasan Sadikin Bandung dan RS. PMI Bogor,(Jawa Tengah) dari RSUD Salatiga dan RSUD Tidar Magelang, (Jawa Timur) dari RS. Syaiful Anwar Malang, Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Surabaya dan RSUD. Madiun, DKI Jakarta dari RS. Cipto Mangunkusumo Jakarta, DIY dari RS. Sarjito dan RS. Betesda. Dari hasil isolasi tersebut diperoleh 26 Isolat *S. typhi* yang dapat dilihat pada tabel 1 dengan morfologi koloni pada media SSA tampak transparan, bentuk koloni bulat, tepi rata dengan diameter 1-2 mm, elevasi cembung, konsistensi halus.

Kultivasi Bakteri

Kultivasi bakteri *Salmonella typhi* isolat Jawa menggunakan media bifasik (BHI agar ditambah BHI cair). Satu koloni bakteri dari media Mac Conkey diinokulasikan ke dalam 5 ml media BHI cair, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam dengan agitasi. Setelah itu kultur tersebut digunakan sebagai starter dimasukkan ke dalam 50 ml media BHI cair kemudian diinkubasikan pada suhu 37° C selama 3 jam dengan agitasi. Selanjutnya kultur tersebut dimasukkan ke dalam media BHI agar miring (dalam botol pipih), setiap botol untuk 15-20 ml kultur bakteri, diinkubasi 48 jam pada suhu 37° C tanpa agitasi, kultur siap dipanen (Asmara, W. dan Darmawati, S., 2000).

Isolasi protein pilli (Metode 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 bakteri), dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya kultur bakteri disentrifus 3000 rpm 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 3000 rpm 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 10.000 rpm 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 0,5 kali pH 7,4 selama 24 jam, larutan dialisa diganti 2 kali. Selanjutnya protein hasil dialisa ditentukan konsentrasinya dengan menggunakan Biorat protein assay, diukur OD pada panjang gelombang 595nm menggunakan spektrofotometer (Bradford, 1970). Setelah itu protein pilli siap di elektroforesis dengan SDS-PAGE.

Separasi protein pilli dengan SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamid Gel Electrophoresis).

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, setelah itu langsung diletakkan di dalam es. 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.

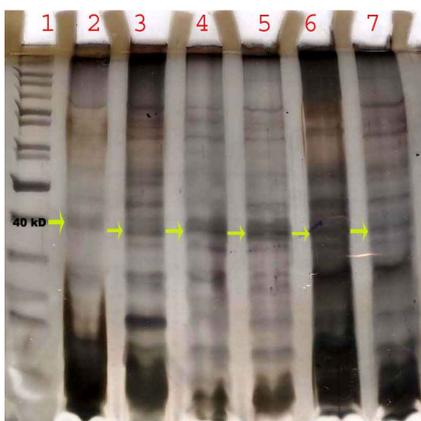
Analisis Profil Protein dan Analisis Hubungan Similaritas 26 Strain *Salmonella typhi* Isolat Jawa

Analisis profil protein dengan menentukan jumlah pita dari setiap strain yang kemudian pita-pita tersebut diberi kode dan selanjutnya digunakan sebagai karakter. Karakter yang dimiliki oleh setiap strain digunakan untuk menentukan hubungan similaritas antara strain satu dengan strain yang lainnya menggunakan program *MVSP*, selanjutnya untuk mengkonstruksi dendrogram yang mencerminkan klasifikasi dari 26 strain *Salmonella typhi* Isolat Jawa tersebut berdasarkan nilai indeks similaritas (S_{SM}) dengan algoritma *UPGMA*.

HASIL dan PEMBAHASAN

Separasi protein pilli dengan SDS-PAGE dan Profil Protein Pilli

Separasi protein pilli dari *S. typhi* dengan SDS-PAGE menurut metode Laemmli (1970) dilakukan untuk melihat profil protein pilli dari 26 strain (pewarnaan perak nitrat) dapat dilihat pada Gambar 1, 2, 3, dan 4. Hal ini dilakukan untuk dapat dibuat sketsa profil protein pilli dengan total karakter 20 dari 26 strain *S. typhi* (Tabel 2), untuk menentukan hubungan antara strain satu dengan yang lainnya dari 26 strain *Salmonella typhi* dapat dilihat pada dendrogram (Gambar 5).

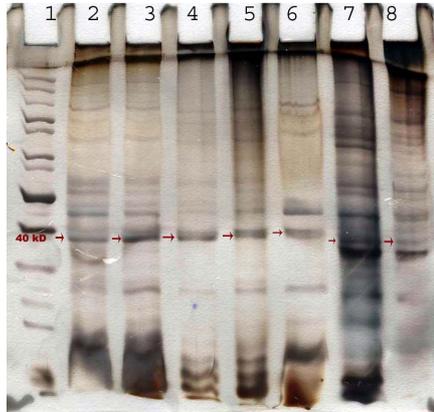


Gambar 1. SDS-PAGE Prot.pilli



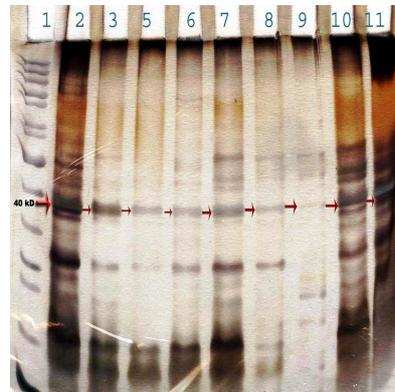
Gambar 2. SDS-PAGE Prot. Pilli *S. typhi*

S.typhi Isolat Jateng dan DIY
(1. Marker, 2.MGL-1, 3.MGL-2,
4.SLT-1, 5.SLT-2, 6. SRJ-1, 7.BET-1)



Gambar 3. SDS-PAGE Prot. pilli *S.typhi* Isolat Madiun dan UI (1. Marker, 2.MD-1, 3.MD-2, 4.UI-1,5.UI-2,6.UI-3,7.UI-4 8.UI-5)

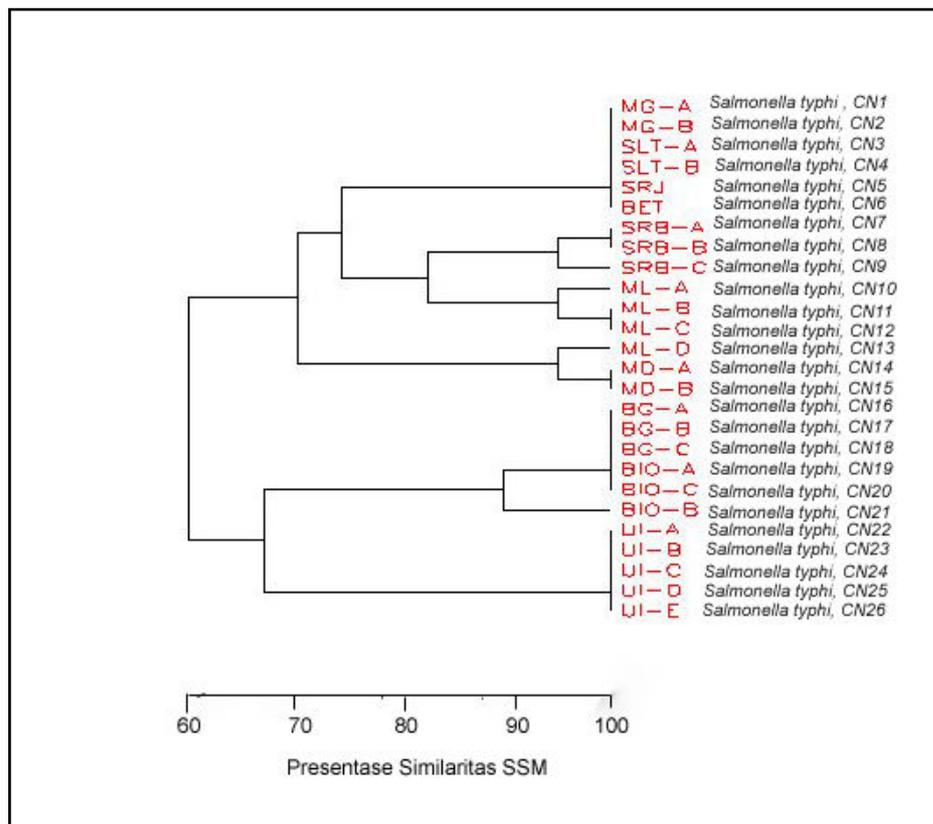
Isolat Jabar(1.Marker,2.BGR-2,3.BGR-3
4.BGR-1,5.BIO-1,6. BIO-2, 7.BIO-3)



Gambar 4. SDS-PAGE Prot. pilli *S.typhi* Isolat Jatim (1.Marker, 2. ML-1, 3.ML-2, 4.ML-3, 5.ML-4, 6.SRB-1, 7.SRB-2, 8. SRB-3, 9. MD-1, 10. MD-2)

Tabel 2: Jumlah Pita Protein Sub Unit pilli 26 strain *Salmonella typhi* Isolat Jawa

No.	Propinsi Kabupaten	Strain <i>S.typhi</i>	Jml. Pita	No.	Propinsi Kabupaten	Strain <i>S.typhi</i>	Jml. Pita
1	Jateng/ Salatiga	<i>Salmonella typhi</i> , CN3	13	14	Jabar/ Bandung	<i>Salmonella typhi</i> , CN19	12
2		<i>Salmonella typhi</i> , CN4	13	15		<i>Salmonella typhi</i> , CN20	12
3	Jateng/ Magelang	<i>Salmonella typhi</i> , CN1	13	16		<i>Salmonella typhi</i> , CN21	10
4		<i>Salmonella typhi</i> , CN2	13	17	Jabar/ Bogor	<i>Salmonella typhi</i> , CN16	8
5	Jatim/ Surabaya	<i>Salmonella typhi</i> , CN7	13	18		<i>Salmonella typhi</i> , CN17	9
6		<i>Salmonella typhi</i> , CN8	13	19		<i>Salmonella typhi</i> , CN18	10
7		<i>Salmonella typhi</i> , CN9	14	20	DKI Jakarta	<i>Salmonella typhi</i> , CN22	15
8	Jatim/ Malang	<i>Salmonella typhi</i> , CN10	14	21		<i>Salmonella typhi</i> , CN23	15
9		<i>Salmonella typhi</i> , CN11	14	22		<i>Salmonella typhi</i> , CN24	15
10		<i>Salmonella typhi</i> , CN12	10	23		<i>Salmonella typhi</i> , CN25	17
11		<i>Salmonella typhi</i> , CN13	10	24		<i>Salmonella typhi</i> , CN26	17
12	Jatim/ Madiun	<i>Salmonella typhi</i> , CN14	10	25	DIY/Sleman	<i>Salmonella typhi</i> , CN5	13
13		<i>Salmonella typhi</i> , CN15	10	26		<i>Salmonella typhi</i> , CN6	13



Gambar 5. Dendrogram “ Cluster Analysis” berdasarkan jumlah pita protein Sub Unit Pilli 26 strain *Salmonella typhi* Isolat Jawa didasarkan analisis S_{SM} dan algoritme UPGMA

Pita-pita protein pilli yang tampak pada Gambar 1, 2, 3, 4 menunjukkan adanya pita yang dimiliki oleh ke 26 strain *S. typhi*, yaitu pita 1,6,7 dan 8. Masing-masing pita mempunyai berat molekul berturut-turut 100 , 50 , 45 dan 40 kD, dari keempat pita protein tersebut pita 40 kD tampak dominan. Sehingga hal ini dapat memberikan gambaran adanya kesamaan yang tampak dominan pula apabila dilihat dari profil protein sub unit pilli. Sedangkan pita 12 dimiliki oleh 26 strain yang ada, strain yang tidak mempunyai pita ke 12 tersebut adalah *S. typhi*, CN 21. Pita-pita protein sub unit pilli yang dimiliki oleh ke 26 strain *S. typhi* dari Jawa ada 20 macam pita yang dapat dijadikan sebagai karakter dan dapat pula dilihat hubungan similaritasnya. Tampak ada 2 kelompok besar, kelompok pertama ada 15 strain yang berasal dari isolat Jawa Tengah dan Jawa Timur. Dari ke 15 strain tersebut ada 3 strain yang berasal dari Surabaya mempunyai karakter spesifik yang tidak dimiliki oleh strain yang lain baik dari kelompok yang sama maupun kelompok strain yang kedua. Karakter itu adalah pita 5 dan 14 yang berat molekulnya lebih kurang 58 kD dan 12,5 kD. Kelompok ke dua dimiliki oleh strain *S. typhi* isolat Jawa Barat dan DKI. Selain itu ada pula karakter yang hanya dimiliki oleh strain tertentu yaitu pita 18 dan 20 dengan berat molekul lebih kurang 35 kD dan 72 kD, yaitu strain dari DKI. Untuk melihat gambaran setiap karakter dapat dilihat pada tabel 3 sebagai berikut.,

Tabel 3. Gambaran Jumlah strain *Salmonella typhi* pada masing-masing karakter pita protein sub Unit pilli

Karakter	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Jml. Isolat	26	20	20	15	3	26	26	26	10	20	19	25	20	3	11	14	13	5	11	5

hal ini menunjukkan adanya kespesifikan strain yang terjadi oleh beberapa faktor antara lain faktor lingkungan, nutrisi yang dapat memicu munculnya protein-protein sub unit pilli yang spesifik untuk dapat tetap mempertahankan hidupnya. Sedangkan protein-protein sub unit pilli yang dimiliki oleh semua strain menunjukkan sebagai karakter yang dimiliki oleh semua strain *S. typhi* Isolat Jawa. Karakter yang dimiliki oleh semua strain ini dapat dikaji lebih lanjut mengenai perannya dalam proses patogenesis.

SIMPULAN

Hasil penelitian mengenai Analisis Molekuler Profil Protein Pilli untuk Mengungkap Hubungan similaritas 26 strain *S. typhi* Isolat Jawa dapat disimpulkan sebagai berikut:

Jumlah pita protein sub unit pilli dari 26 strain *S. typhi* bervariasi yaitu 8-17 pita, BM tertinggi 200 kD, dan terendah 10 kD, dengan jumlah karakter 20. Protein sub unit pilli 100 kD, 50 kD, 45 kD dan 40 kD adalah protein sub unit pilli yang dimiliki oleh 26 strain *S. typhi* Isolat Jawa. Dari 26 strain *S. typhi* Isolat Jawa terdiri dari dua kelompok besar yang mempunyai hubungan similaritas 61,2%. Kelompok pertama adalah strain *S. typhi* Isolat Jawa Tengah dan Jawa Timur, dan kelompok ke dua adalah strain *S. typhi* Isolat Jawa Barat dan DKI. Pita 14 (12,5kD) dan 15 (78kD) dari protein sub unit pilli hanya dimiliki strain *S. typhi* dari Surabaya. Pita 18(35kD) dan 20(72kD) dari protein sub unit pilli hanya dimiliki oleh Strain *S. typhi* dari DKI Jakarta.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Kementerian Negara Riset dan Teknologi melalui Program Insentif yang telah membiayai penelitian ini pada tahun anggaran 2007.

DAFTAR PUSTAKA

- Asmara, W. dan Darmawati, S., 2001. Isolasi dan Karakterisasi Protein Sub Unit Pilli *Pasteurella multocida* Serotipe B:2. Jurnal Pengembangan Peternakan Tropis. Fak. Peternakan UNDIP. Vol. 26 nomor 3
- Darmawati, S. Dan Haribi, R., 2005 Analisis Profil Protein Pilli *Salmonella typhi* Isolat Rumah Sakit Kariadi Semarang. Jurnal Litbang Universitas Muhammadiyah Semarang, 3(2)
- Darmawati, S. dan Haribi, R., 2006. Analisis Molekuler Protein Hemagglutinin Sub Unit Pilli dari *Salmonella typhi* O dan *Salmonella typhi* H. Prociding Seminar Nasional PIT Permi. Surakarta. Agustus 2006
- Darmawati, S., 2007. Hambatan perlekatan *Salmonella typhi* pada Enterosit tikus Putih (Wistar) Oleh Antibodi Poliklonal Anti protein Hemagglutinin Sub Unit Pilli. Jurnal Litbang Universitas Muhammadiyah Semarang, 3(2) September 2007

- 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
- Eri, DM., 2006. Efek Anti Bakteri RIP dari Biji *Momordica charantia* Terhadap *Salmonella typhi* dan *Eschericia coli* . Tesis. Program Studi Kedokteran Tropis. Program Pasca Sarjana. Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Murini, T., 1998. Isolasi dan Karakterisasi Protein Hemagglutinin Sub Unit Pili *Salmonella typhi*. Tesis. Program Studi Ilmu Farmasi. Program Pasca Sarjana. Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
- Nakasone, N. dan M. Iwanaga, 1990. Pili of *Vibrio parahaemolyticus*. Strain as a possible colonization factor. *Infection and Immunity.* 58: 61-69
- Nagayama, K. , T. Oguchi, M. Arita dan T. Honda. 1995. Purification and characterization of a cell – associated hemagglutinin of *vibrio parahaemolyticus*. *Infection and immunity.* 63 : 1987 – 1992
- Osek, J., G. Jonson., A.M. Svennerholm dan Holmgren, J. 1994. Role of antibodies against biotype – specific *Vibrio cholerae* pili in protection against experimental classical and Eltor cholera. *Infection and immunity.* 62 : 2901 – 2907
- Priest, F. dan Austi, B. 1993. *Modern Bacterial Taxonomy.* Chapman & Hall. London
- Punjabi, N.H. 2004. Demam Tifoid dan Imunisasi Terhadap Penyakit ini. U.S. NAMRU-2, Jakarta. [http://www.papdi. Or.id/Imunisasi/demam typhoid dan imunisasi terh.htm](http://www.papdi.Or.id/Imunisasi/demam%20typhoid%20dan%20imunisasi%20terh.htm)
- Simanjuntak, C. 1993. Demam Typoid. *Epidemiologi dan Perkembangan Penelitian.* Cermin Dunia Kedokteran. Vol. 3:52-53