

## **Pengaruh Crude Ekstrak Bunga Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) Terhadap Ekspresi Outer Membrane Protein (OMP) *Salmonella typhi***

I Nengah Kundera<sup>(1)</sup>, Faisal Abdurahman<sup>(2)</sup>.

(1) Biological FMIPA Tadulako University  
Palu -Sulawesi Tengah -94118

2) Faculty of Medicine, Universitas Islam Malang)

### ABSTRACT

Crude extracts of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk) flowers contain antibacterial compounds such as alkaloids, tannins, flavonoid and steroids, which is also empirically useful as medicine for diarrhea. This research is aiming to determine the efficacy of antibacterial exposure of crude extract of *A. heterophyllus* Lamk flowers, and the change of outer membrane protein (OMP) expressions protein virulence factors of *Salmonella typhi*. The results indicate that the crude extract of *A. heterophyllus* Lamk. Flowers has antibacterial efficacy against *S. typhi* at the lowest concentration of 20%, since at this concentration crude extract of *A. heterophyllus* Lamk. flowers is still capable of inhibiting the growth of *S. typhi*. Based on the results of SDS-PAGE electrophoresis and measurement of protein molecular weight, it is found that several OMP molecular weights are 80 kDa, 66kDa, 57 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 33 kDa, 30 kDa, 28kDa, 23 kDa, 20 kDa, 16 kDa, 14 kDa and 10kDa based on the low standard marker protein product [sigma]. It is confirmed that the exposure to crude extract of flower *A. heterophyllus* Lamk. results in the changes of OMP protein expression of *S. typhi* compared to the normal OMP expression. This finding is supported by the inhibition on the growth and activity of *S. typhi* in the test of antibacterial properties of extracts jackfruit *A. heterophyllus* Lamk. flowers.

Keyword : *Salmonella Typhi*, omp, *A. heterophyllus* Lamk.

Keyword : *Salmonella Typhi*, omp, *A. heterophyllus* Lamk.

### ABSTRAK

Crude ekstrak bunga Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) mengandung senyawa antibakteri seperti alkaloid, tanin, flavonid dan steroid, serta secara empiris telah dimanfaatkan sebagai obat diare. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis perbedaan paparan Alkaloid dan tanin ekstrak bunga *A. heterophyllus* Lamk., dan perubahan ekspresi Omp *Salmonella typhi*. Penelitian ini merupakan eksperimen laboratorium yang bersifat eksploratif, menggunakan rancangan percobaan acak lengkap (RAL) dan dianalisis dengan program SPSS. Isolasi OMP *S. typhi*, mengikuti prosedur baku isolasi protein. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa crude ekstrak bunga *Artocarpus heterophyllus* Lamk., memiliki efek antibakteri terhadap *S. typhi* terendah pada konsentrasi 20% karena pada konsentrasi ini telah mampu menghambat pertumbuhan *S. typhi*. Berdasarkan hasil elektroforesis SDS-PAGE dan penghitungan berat molekul protein, bahwa ditemukan beberapa berat molekul Omp yaitu, 80 kDa, 66 kDa, 57 kDa,

45 kDa, 36 kDa, 33 kDa, 30 kDa, 28kDa, 23 kDa, 20 kDa, 16 kDa, 14 kDa dan 10kDa yang menggunakan *low marker standard protein* produk [Zigma]. Paparan crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk, ternyata mengakibatkan terjadinya perubahan ekspresi protein Omp *S.typhi* dibandingkan dengan ekspresi Omp normal. Hal ini bisa dikaitkan dengan gangguan pertumbuhan dan aktivitas *S.typhi* karena paparan Crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk.

Kata kunci : *Salmonella typhi*, *omp*, *A.heterophyllus* Lamk.

## Pendahuluan

Penyakit demam tifoid disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi* masih menjadi masalah kesehatan di negara berkembang. Sekitar 22 juta kasus demam tifoid terjadi setiap tahun di dunia, dengan angka kematian sekitar 216.510 orang (Baker *et.al*, 2007; Baker,*et.al.*,2008; Boyle,*et.al.*,2007).Di negara berkembang insiden demam tifoid setiap tahun berkisar 12-622/100.000 penduduk (Timothy,*et.al.*,2006). Beberapa peneliti membuktikan bahwa *outer membrane protein* (Omp) spesifik ini merupakan imunogen yang baik dalam menginduksi kekebalan seseorang terhadap *Salmonella typhi*. Omp terletak pada permukaan bakteri Gram negatif, yang dianggap sebagai antigen penting dalam menginduksi respon imun (Calva, E., and J.L.Puente., 1995 ;Khanum,*et.al.*, 2006).

Secara empiris bunga *A. heterophyllus* Lamk., telah dimanfaatkan sebagai obat diare sehingga diduga ada senyawa bersifat antibakteri. Pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak bunga

*A.heterophyllus* Lamk., mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* pathogen (EPEC), *S.entritidis*, *V.cholerae* dan *Shigella flexneri* (Hidayat,dkk., 1994 ;Kundera,I.N., 2002).Oleh karena itu kandungan fitokimia dari bunga *A.heterophyllus* Lamk, berpotensi sebagai kandidat antibakteri. Penelitian ini penting dilakukan sebagai upaya penelusuran pemanfaatan bahan hayati menjadi kandidat antibiotik dimasa yang akan datang terhadap *S.typhi*. Oleh karena itu diperlukan berbagai aspek kajian, termasuk kajian molekuler faktor virulensi bakteri yang bertanggungjawab terhadap patogenitas (Demuth, D.R., and R.J. Lamont., 2006 ; Dhaenens,L., F.Szczebara., and M.O.Husson., 1997; Harris, J.B, *et.al.*, 2001).

Hasil penelitian sebelumnya diperoleh bahwa crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk., mengandung alkaloid dan tanin, menarik untuk diteliti mengenai efektivitas senyawa ini sebagai antibakterisidal dan respon molekuler bakteri melalui pengamatan perubahan keberadaan protein outer membran faktor virulensi bakteri *S.typhi*.

Oleh karena itu bila terjadi perubahan ekspresi protein outer membran oleh tekanan senyawa crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk., maka diharapkan bakteri akan mengalami perubahan sifat virulensinya.

### **Bahan dan Metoda Penelitian**

Penelitian ini dilakukan selama 12 minggu dengan menggunakan rancangan percobaan acak lengkap (RAL). Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu : MHA, Agar MacConkey, MHB, NA, buffer posfat, NaCl fisiologis, aquades, *Salmonella*, bunga *A. heterophyllus* Lamk., etanol pa. Medium TCG, Mycobact, BSA, antigen-H (Widal), Chaps, SDS-PAGE (*Sodium-dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*), Brain Heart Infusion (BHI) broth, TSIA. *Salmonella typhi* hasil isolasi dari penderita demam tifoid di RS. Undata Palu hasil pemeriksaan Labkes Undata Palu. Reagen kimia : TCA, ammonium sulfat, NaCl, NaCitrat, EDTA, EGT, dithiotreitol, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ethanol pa., acrylamid, bis-acrylamid, glisin, tris-HCl, tris base, SDS, temed, amonium persulfat, commassie blue, metanol, asam asetat glasial, gliserol, brophenol blue, 2-mercatoethanol, Tween 20, p-nitrophenyl phosphat, diethanolamin, MgCl<sub>2</sub>. Pewarna Gram, Reagen Oksidase, Detergen untuk OMP :

Chaps [3-{(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio}-1-propanesulfonate] (Sigma Ultra), Protein marker (Wide range) dari Sigma Ultra (Arung, E.T, *et.al.*, 2006).

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu : labu mikropipet, otoklaf, inkubator, caliper, coloni counter, perkolator, evaforator mikroskop, inkubator, gelas objek, otoklaf, erlenmeyer, pengaduk gelas, gelas beker, lampu bunsen, lempeng mikrotiter, membran dialisis, membran elektroelusi, *magnetik stirer*, tabung sentrifus (ependorf 15 ml dan 100ml), wadah penyimpan gel hasil elektroforesis, alat elektroforesis vertikal (Bio-Red Mini Proten), alat Blotting (*Bio-Rad Trans-Blot SD-Semy-Dry Transfer Cell*). Membran dialisis, membran elektroelusi, tips, tabung sentrifus (ependorf 1,5 ml dan 100 ml), pipet mikro 5 – 20 µl, 50 – 200 µl, 200-1000 µl, spoit disposibel dll. (Perry, M.B., 1993).

### **Meode Penelitian**

#### **a. Identifikasi *Salmonella typhi***

Sebanyak 3 strain *Salmonella typhi* yang diperoleh dari penderita demam tifoid dibiakkan pada medium Moeller Hinton Agar pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh dilakukan pewarnaan Gram dan dilanjutkan penanaman pada medium deferensial MacConkey pada suhu 37°C, selama 18-24 jam. Hasil pertumbuhan

koloni dari medium MacConkey ditanam lagi pada medium selektif BSA pada suhu 37°C, selama 18-24 jam (Gerlach,R.G.*et.al.*, 2007 ; Morris, *et.al.*, 2003). Koloni bakteri yang tumbuh pada medium MacConkey dilakukan uji oksidase. Koloni bakteri dilakukan indentifikasi biokimiawi dengan *Microbact system* guna menentukan spesies bakteri.

#### **b. Pengujian sifat antibakteri *A.heterophyllus* Lamk.**

Pengujian aktivitas antibakteri mengacu pada metode Kirby-Bauer (McKane,L., and Judi K.,1996). Konsentrasi crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk, yang digunakan yaitu 0%,20%, 30%, 40%, dan 50%. Untuk menentukan MIC dan MBC maka dilanjutkan dengan pengujian antibiogram melalui metode tube delution, dengan menggunakan variasi konsentrasi yang sama.

#### **c. Pemisahan Fimbria dari sel**

Biakan cair dari medium MHB dipindahkan ke dalam tabung sentrifus 100 cc, lalu tambahkan 3 gram *Trichloro acetic acid* (TCA) sehingga konsentrasinya 3%, disentrifus dingin pada suhu 4°C dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Endapan disuspensi dengan PBS pH7,4 secukupnya, kemudian dilakukan pemotongan fimbriae menggunakan alat

omni-mixer modifikasi pada suhu 4°C (Singh, B., 2001). Selanjutnya disentrifus dingin 4°C dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Filtrat dipisahkan (mengandung fraksi fimbriae) dan endapan disuspensi lagi dengan PBS pH 7,4 secukupnya, kemudian dilakukan pemotongan lagi. Proses pemotongan fimbriae diulangi beberapa kali guna mendapatkan perbedaan fraksi fimbriae dengan sel bakteri.

#### **d. Fraksi OMP (Outer membrane Protein)**

Bagian fraksi sel bakteri prosedur (2) disuspensi dengan PBS secukupnya, kemudian ditambahkan *Chaps* (3{(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio}-1-ropanesulfatonate), sehingga diperoleh kadar 0,5% (b/v). Lakukan pengocokan dengan vortex selama 5 menit, kemudian disentrifus dingin 4°C 12.000 rpm selama 15 menit. Filtrat diambil dan dilakukan analisis menggunakan PBS pH 7,4 untuk menghilangkan *Chaps*. Kemudian dialisat diendapkan dengan ammonium sulfat 35%, disentrifus pada suhu 4°C 6000 rpm selama 15 menit. Filtrat dibuang, selanjutnya endapan disuspensi dengan PBS secukupnya dan dilakukan dialis kembali, sehingga diperoleh dialisat sebagai fraksi OMP(Gaind,*et.al.*, 2006).

#### **Pengukuran Kadar Protein OMP**

Menyiapkan tabung reaksi sesuai dengan jumlah sampel dan ditambah 1 tabung sebagai blanko. Masing-masing tabung reaksi diisi dengan 90µl NaCl 0,9%. Sampel protein OMP sebanyak 10µl dimasukkan ke dalam tabung reaksi, sedangkan tabung reaksi yang berfungsi sebagai blanko hanya diisi dengan 100 µl buffer. Masing –masing tabung reaksi selanjutnya ditambah dengan 5 ml preaksi Bradford, divortex dan diinkubasi pada suhu ruang. Pengamatan nilai absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm pada alat spektrofotometer. Berdasarkan nilai absorbansi tersebut hitung kadar protein masing-masing sampel dengan bantuan garis linier dari kurva standar kadar protein. Pengukuran SDS-PAGE protein, running sampel, pewarnaan gel, dan pengukuran berat molekul (Aulanni'am, 2004).

## Hasil Penelitian

### a. Hasil Isolasi *Salmonella typhi* strain Palu

Untuk membuktikan kriteria sampel penelitian bahwa bakteri *Salmonellatyphi* yang digunakan berasal dari darah pasien yang telah diagnosa menderita demam tifoid. Oleh karena itu dilakukan proses isolasi dan identifikasi bakteri Salmonella. Sebanyak 3 sampel bakteri yang diperoleh dari RS.Undata Palu hasil pemeriksaan

Laboratorium Kesehatan Propinsi Sulawesi Tengah telah dilakukan proses identifikasi berdasarkan kriteria isolasi bakteri *S.typhi*. Ciri koloni bakteri *S. typhi* yang ditumbuhkan pada medium deferensial, khususnya MacConkey memperlihatkan koloni bulat, tepi tajam, permukaan halus, tidak berwarna atau buram, dengan diameter koloni 1-3 mm. Beberapa kriteria koloni ini ternyata sesuai dengan kriteria dalam proses identifikasi Salmonella.

Alasan penggunaan medium MacConkey sebagai salah satu sarana untuk isolasi *S.typhi*, karena sejak tahun 1905 medium MacConkey dijelaskan sebagai medium selektif, media deferensial yang digunakan untuk mengisolasi bakteri basil enterik gram-negatif. Medium ini mengandung nutrisi dasar yang juga berisi kristal violet dan garam empedu yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif. Mikroba yang mampu tumbuh pada MacConkey Agar dan mampu memfermentasi lactose, menghasilkan produk sampingan berupa asam sehingga mengakibatkan penurunan pH di daerah sekitar koloni bakteri. Penurunan pH juga menyebabkan indikator berwarna merah pada kondisi normal berubah menjadi warna kuning. Mikroba yang tidak memetabolisme laktosa tidak koloninya tidak berwarna dan

tembus cahaya (transparan). Hasil penelitian ini menunjukkan ciri koloni yang sesuai dengan harapan dalam proses identifikasi *S.typhi*. Selanjutnya pertumbuhan koloni bakteri pada medium BSA yang berwarna hitam. Terbentuknya warna hitam dari koloni Salmonella ini karena adanya kemampuan metabolisme bakteri untuk melepaskan  $H_2S$ . Isolasi Salmonella dengan menggunakan medium BSA merupakan suatu media modifikasi dari Bismut Sulfit Agar (BSA) dari Wilson dan Blair sejak tahun 1927. Media ini sejak awal dimanfaatkan untuk mengisolasi *S.typhi* dari perairan tercemar limbahserta dari bahan-bahan lain. Tipikal koloni *S.typhi* pada media ini adalah hitam

dikelilingi olehberwarna hitam kecoklatan dan sering memperlihatkankemilau metalik. Media ini cukup memberi manfaat untuk isolasi *S.typhi* karena menunjukkan koloni khas hitam pekat (*black jet colony*).

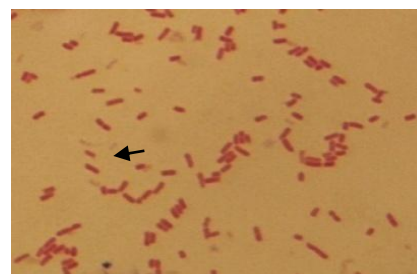
#### b. Hasil Pewarnaan sel *Salmonella typhi*

Hasil pewarnaan Gram sel bakteri *S.typhi*, ternyata diperoleh sel bakteri bentuk batang, berwarna merah maka bakteri ini digolongkan ke dalam bakteri Gram negatif. Secara lengkap proses pewarnaan Gram sel bakteri *S.typhi*, mengikuti standar proses pewarnaan Gram.



Gambar 1. Visualisasi hasil uji TSIA *Salmonella typhi*

Penentuan karakterisasi *S.typhi* juga dilakukan melalui pembiakan bakteri pada medium TSIA, untuk menentukan produksi hidrogen sulfida ( $H_2S$ ), motilitas dan sifat



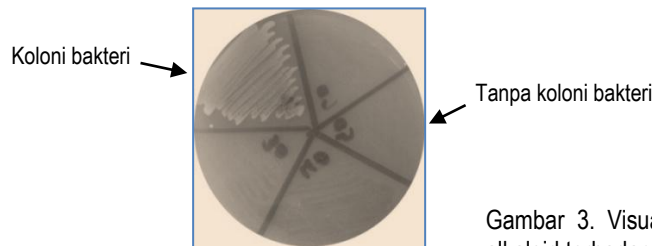
Gambar 2. Hasil pewarnaan Gram sel *Salmonella typhi* dengan pembesaran (10 x 100)

biokimia lainnya. Pemiakan bakteri pada medium TSIA dilakukan melalui metode gores dan tusukan serta diinkubasi pada suhu

37°C selama 1 x 24 jam, sesuai dengan Gambar 1.

**c. Hasil uji sifat antimikroba Crude ekstrak bunga *A. heterophyllus* Lamk., terhadap *Salmonella typhi*.**

Berdasarkan rerata lebar zona hambat pada penentuan MIC crude ekstrak *A.heterophyllus* Lamk., terhadap *S.typhi*, ternyata kontrol positif ethanol memiliki nilai zona hambat lebih kecil dari konsentrasi perlakuan.

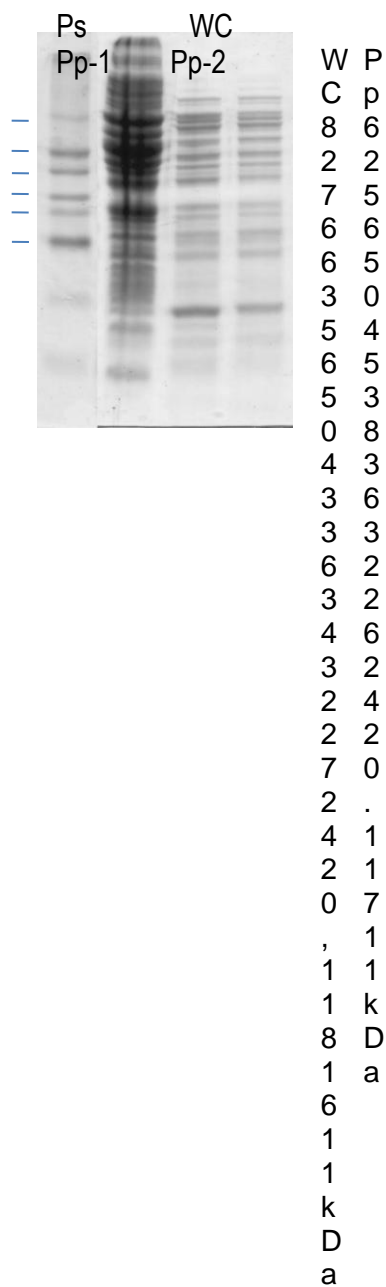


Gambar 3. Visualisasi hasil uji MBC alkaloid terhadap *Salmonellatyphi*

**d. Profil hasil SDS-PAGE protein Pili dan outer membran *S.typhi***

Sesuai dengan rencana penelitian ini bahwa akan dilakukan proses isolasi OMP, maka terlebih dulu dilakukan pemotongan pili *S.typhi*. Hasil isolasi pemotongan protein

pili *S.typhi* setelah dilakukan pengukuran BM protein yang diperoleh melalui elektroforesis SDS-PAGE maka profil protein pili dan OMP dapat dilihat berikut ini.



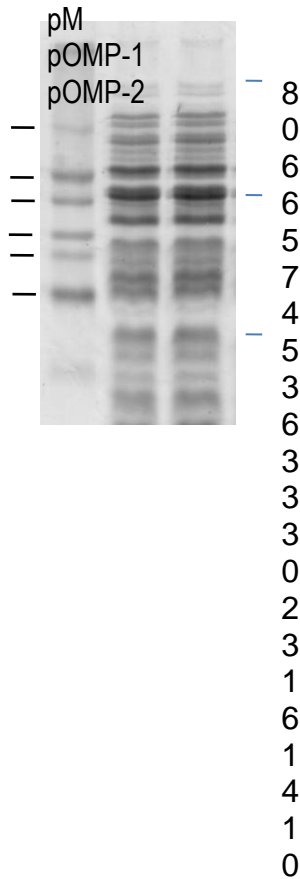
Keterangan :  
WC = wole cell protein, Ps = protein standar  
Pp = protein pili, dan kDa = kilodalton

Gambar 4. Hasil elektroforesis SDS-PAGE profile protein pili dan *Wole Cell Strain Salmonellatyphi* – Palu

Hasil dari proses pemisahan Omp ini menjadi data profiling protein Omp *S.typhi* yang normal sebelum diberikan treatmen

dengan crude ekstrak bunga *A.hetrophyllus* Lamk. Profile proteinnnya dapat dilihat pada gambar berikut ini.





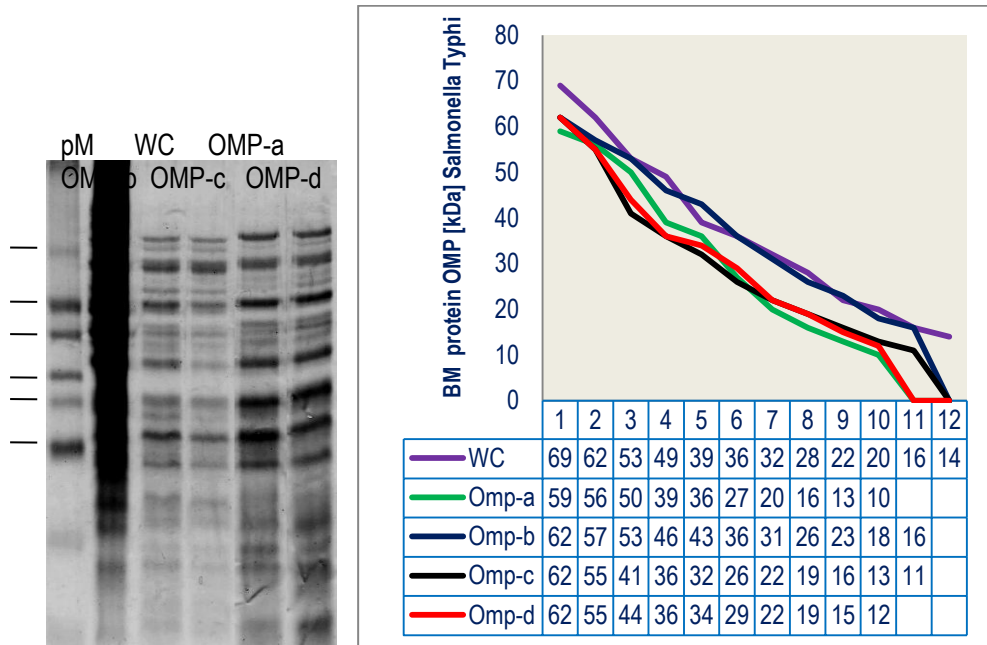
Keterangan :

pM = protein marker, pOmp-1 = protein Omp-1,  
pOmp-2 = protein-2 dan kDa = kilodalton

Gambar 5. Hasil elektroforesis SDS-PAGE Profil protein Omp strain *S.typhi*, tanpa treatment (kontrol)

Untuk mengetahui profile protein Omp *S.typhi* maka dilakukan proses isolasi protein ini sebelum bakteri dipapar dengan

*crude*ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk., berdasarkan pemilihan konsentrasi hasil uji MIC.



Keterangan :

- WC : protein wole cell bakteri tanpa perlakuan
- Omp-a : protein Omp ditreatmen dengan 20% crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk
- Omp-b : protein Omp ditreatmen dengan 30% crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk
- Omp-c : protein Omp ditreatmen dengan 40% crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk
- Omp-d : protein Omp ditreatmen dengan 20% crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk

Gambar 6 . Hasil grafik dan table BM protein Omp *S.typhi* yang ditreatmen dengan crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk.

Berdasarkan grafik diatas terdapat lima kelompok perlakuan protein yang berhasil diisolasi dari sel bakteri *S.typhi* yang dipapar dengan crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk.

**Pembahasan**

Hasil isolasi *S.typhi* membuktikan bahwa berdasarkan ciri koloni dan morfologi bakteri telah sesuai, demikian juga uji biokimia bakteri ini mampu menghasilkan hidrogen sulfida sebagai hasil sampingan

metabolismenya. Selain itu terjadi perubahan warna merah pada indikator medium menjadi kuning sebagai pertanda perubahan pH media akibat terbentuknya asam. Pada bagian media yang diinokulasi dengan cara tusuk terbentuk warna hitam yang menunjukkan terbentuknya hidrogen sulfida, dari sisa metabolisme bakteri *S.typhi*. Pada uji ini telah terjadi fermentasi glukosa / dektrosa yang terdapat dalam media sebagai nutrisi, sehingga terbentuk sedikit hidrogen sulfida. Hasil uji oksidase menunjukkan hasil

yang negatif. Sedangkan hasil uji motilitasnya dinyatakan positif, hal ini membuktikan bahwa sesuai dengan sifat-sifat bakteri *S.typhi*.

Pengujian sifat biokimia *S.typhi* bertujuan memperkuat hasil pengujian sebelumnya, guna menentukan sifat kimiawi dan kemampuan metabolisme *S.typhi*. Berdasarkan indikator bahwa *S.typhi* termasuk bakteri yang mampu merombak beberapa kelompok gula misalnya; glukosa, manitol, lysine, pembentukan H<sub>2</sub>S. Namun disisi lain bakteri ini tidak mampu mefermentasi laktosa, uji indol negatif, uji urease negatif serta bersifat motil. Berdasarkan kriteria uji biokimia tersebut di atas, bahwa dari sekitar 8 sampel Salmonella yang dilakukan pengujian dengan kit *Microbact*, diperoleh 2 strain bakteri *S.typhi* yang layak dijadikan sampel penelitian. Persentase kedekatan hubungan ini juga turut menentukan hasil akhir dari identifikasi *S.typhi*. Berdasarkan hasil uji identifikasi di atas diharapkan sampel bakteri Salmonella yang digunakan memang benar adalah *S.typhi*.

Selanjutnya sampel bakteri dilakukan uji sensitivitas terhadap crude ekstrak bunga Nangka ini dan diperoleh zona hambat dari perlakuan lebih lebar dibandingkan dengan kontrol, namun hanya memberi makna cukup

signfikan. Hal ini karena faktor virulensi bakteri *S.typhi* yang masih kuat sehingga mampu beradaptasi terhadap senyawa crude ekstrak *A.heterophyllus* Lamk. Kemampuan difusi senyawa crude ekstrak pada media agar juga menentukan lebar sempitnya terbentuknya zona hambat tersebut. Menurut Numora (1998), bahwa sesungguhnya beberapa kelompok alkaloid dari berbagai bahan hanyati bersifat antibakteri, demikian juga pada ekstrak bunga *Artocarpus*. Hal ini diperkuat pada penelitian sebelumnya dan telah dibuktikan bahwa ekstrak bunga *Artocarpus heterophyllus* Lamk, mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella enteritidis*, *E.coli* (EPEC) dan *Vibrio cholerae*(Kundera, I.N. 2002). Pada penelitian ini alkaloid yang diekstrak dari bunga *A.heterophyllus* Lamk., telah dibuat dalam bentuk crude melalui proses partisi dari woleekstrak bunga *Artocarpus heterophyllus* Lamk.

Pengujian daya bunuh crude ekstrak *Artocarpus* terhadap *S.typhi*, melalui pengamatan hasil MBC, dengan menggunakan metode *tube delution*. Hasil pengujian dengan teknik *tube delution* menunjukkan bahwa pada konsentrasi 30% sudah tidak terjadi perubahan warna media LB+ crude ekstrak. Selanjutnya setelah dilakukan pembiakan bakteri pada media

MHA hanya ditemukan pertumbuhan koloni bakteri pada kontrol, sedangkan dari konsentrasi 20% sudah tidak ada pertumbuhan koloni bakteri. Hal ini berarti bahwa telah terjadi kematian sel bakteri *S.typhi* karena perlakuan crude ekstrak tersebut. Oleh karena itu dapat dijelaskan bahwa dengan pemberian crude ekstrak alkaloid bunga *Artocarpus heterophyllus* Lamk., ternyata berpengaruh terhadap zona hambat demikian juga pada pengujian MIC serta MBC. Nilai MIC pada pengujian alkaloid terhadap *S.typhi* berkisar pada konsentrasi 30%, sedangkan nilai MBC diperoleh pada konsentrasi < 30%.

Setelah pemotongan pili *S.typhi*, maka akan terjadi pemisahan antara protein pili dan protein outer membran *S.typhi*. Berdasarkan hasil perhitungan BM protein wole sel *S.typhi* diperoleh beberapa BM protein tinggi dan rendah. Hasil elektroforesis protein ini dihitung dengan cara regresi untuk mengetahui nilai R (kurva linier), yang kemudian digunakan untuk perhitungan berat molekul protein yang diperoleh sesuai dengan hasil pengukuran jarak *trackband* protein yang terbentuk pada gel hasil elektroforesis SDS-PAGE. Sesuai dengan hasil perhitungan dengan menggunakan program excel, diperoleh nilai kedekatan  $r = 0,983$  yang bermakna bahwa

kurva regresi memiliki nilai kedekatan yang signifikan karena mencapai lebih dari 0,90%, mendekati 100%.

Bend protein yang berhasil dikarakterisasi dari strain *S.typhi* – Palu terdiri atas protein dengan berat molekul, 82 kDa, 76 kDa, 63 kDa, 56 kDa, 50 kDa, 43 kDa, 36 kDa, 34 kDa, 32 kDa, 27 kDa, 24 kDa, 20.1 kDa, 18 kDa, 16 kDa, dan 11 kDa untuk *wole cell*. Sedangkan protein yang berhasil dikarakterisasi dari potongan pili strain *S.typhi* – Palu terdiri atas protein dengan berat molekul ; 62 kDa, 56 kDa, 50 kDa, 45 kDa, 38 kDa, 36 kDa, 32 kDa, 26 kDa, 24 kDa, 20.1 kDa, 17 kDa, dan 11 kDa. Beberapa protein pili ini telah diketahui sifatnya sebagai protein yang berperan penting pada proses virulensi bakteri, terutama berkaitan dengan adhesi *S.typhi* pada sel enterosit mencit.

Berdasarkan hasil isolasi protein Omp pada *S.typhi*, berdasarkan hasil SDS-PAGE dan penghitungan berat molekul protein, bahwa ditemukan beberapa berat molekul Omp yaitu, 80 kDa, 66 kDa, 57 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 33 kDa, 30 kDa, 28kDa, 23 kDa, 20 kDa, 16 kDa, 14 kDa dan 10kDa. Hasil isolasi protein menggunakan standar *low marker standard protein* produk Zigma. Hasil perhitungan berat molekul ini dibandingkan dengan BM protein *woleCell*

strain *S.typhi* asal Palu, memiliki tingkat kesamaan karena hasil isolasi protein ini digunakan sebagai standar pembandingan profile Omp *S.typhi* yang terpapar dengan *crude* ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk.

Hasil elektroforesis SDS-PAGE isolasi Omp *S.typhi* yang ditreatmen dengan *Crude* ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk., dapat dilihat pada sajian gambar berikut ini. Hasil isolasi berat molekul protein *wole cell* bakteri sebelum perlakuan yaitu, 82 kDa, 76 kDa, 63 kDa, 56 kDa, 50 kDa, 43 kDa, 36 kDa, 34 kDa, 32 kDa, 27 kDa, 24 kDa, 20.1 kDa, 18 kDa, 16 kDa, dan 11 kDa. Sedangkan profile BM protein *wole cells.typhi* setelah perlakuan yaitu ; 69 kDa, 62 kDa, 53 kDa, 49 kDa, 39 kDa, 36 kDa, 32kDa, 28 kDa, 22 kDa, 20 kDa, 16 kDa dan 14 kDa. Sesuai dengan hasil penelitian ini memberikan gambaran bahwa ada beberapa Omp yang masih stabil dan mengalami perubahan ekspresi walaupun tidak diketahui apakah perubahan ini berpengaruh pada fungsi protein tersebut. Beberapa protein Omp yang penting telah juga diisolasi oleh para peneliti sebelumnya.

Penelitian Neves-Ferreira, *et.al.*, (2004) menjelaskan bahwa protein Omp-28 diisolasi dari *S.typhi* yang menunjukkan subunit massa molekul 9632 Da. Urutan asam aminonya ini identik dengan yang

disimpulkan dari bagian DNA dari "protein *putativetransportasi* periplasmik" baik pada *Salmonella serovar enterica* Typhimurium dan beberapa *Salmonella typhi* yang resisten terhadap obat. *Cytochemistry Immunogold* menunjukkan bahwa Omp-28 ditemukan pada membran luar bakteri.

Pada paparan konsentrasi 20% [Omp-a] *crude* ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk., terhadap *Salmonella typhi* ditemukan perubahan ekspresi Omp dibandingkan dengan protein *wole cell*. Ekspresi protein Omp pada perlakuan konsentrasi 20% terdiri atas protein dengan BM, 59kDa, 56kDa, 50kDa, 39kDa, 36kDa, 27kDa, 20kDa, 16kDa, 13kDa dan 10kDa. Bila hasil profile protein ini dibandingkan dengan protein pada *wole cell*, maka nampak sekali ada beberapa protein Omp yang mengalami perubahan berat molekul misalnya dari 69kD-59kDa, namun demikian protein 36kDa, 20 dan 16 masih stabil terekspresi. Pada tahap perlakuan ini secara keseluruhan ditemukan 10 bend protein pada gel elektroforesis SDS-PAGE.

Ekspresi protein Omp pada paparan *crude* ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk, dengan konsentrasi 30% [Omp-b] terhadap *S. typhi*, terdiri atas protein dengan berat molekul, 62kDa, 57kDa, 53kDa, 46kDa, 43kDa, 36kDa, 31kDa, 26kDa,

23kDa, 18kDa dan 16kDa. Jumlah ekspresi protein pada perlakuan 30% juga ditemukan 11 bend protein pada gel elektroforesis, namun berat molekulnya berbeda. Terdapat beberapa protein dengan berat molekul yang tinggi dan protein yang stabil diekspresi yaitu protein bM 36kDa, serta 16kDa.

Untuk perlakuan ketiga yaitu *S.typhi* dipapar dengan crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk., konsentrasi 40% [Omp-c] diperoleh beberapa protein Omp dengan berat molekul 62kDa, 55kDa, 41kDa, 36kDa, 32kDa, 26kDa, 22kDa, 19kDa, 16kDa, 13kDa dan 11kDa. Ditemukan 11 bend protein yang dapat diukur pada gel elektroforesis. Protein Omp dengan berat molekul 62kDa, 55kDa, 36kDa merupakan protein Omp yang masih stabil terekspresi pada perlakuan ini, namun tetap terjadi perbedaan profil dengan perlakuan sebelumnya.

Sedangkan untuk perlakuan paparan crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk., pada konsentrasi 50% [Omp-d] terhadap *S.typhi*, diperoleh beberapa BM protein Omp yaitu, 62kDa, 55kDa, 44kDa, 36kDa, 34kDa, 29kDa, 22kDa, 19kDa, 15kDa dan 12 kDa. Ditemukan beberapa protein Omp yang stabil diekspresi oleh *S.typhi* yaitu, protein dengan berat molekul 62kDa, 55kDa, 36kDa, 22kDa, dan 16 kDa. Protein

ditemukan *conserved* pada perlakuan 30%, 40% sampai pada perlakuan 50%. Dari beberapa protein yang *conserved* pada setiap perlakuan, namun tidak ditemukan pada perlakuan yang berbeda. Tetapi untuk protein Omp 36kDa ditemukan pada semua perlakuan, dan mengapa protein ini begitu stabil terhadap semua perlakuan. Oleh karena perlu dilakukan kajian lebih jauh mengenai sifat dari protein Omp 36kDa ini. Perlu dipahami bahwa peran utama dinding sel bakteri adalah melindungi bagian dalam sel bakteri, karena sel ini akan bertanggung jawab sendiri terhadap kelangsungan hidupnya. Oleh karena itu diperlukan suatu sistem dinding sel yang mampu bertahan dan beradaptasi pada perubahan kondisi lingkungan yang ekstrim.

Hasil penelitian Santoso dan Winarsih, (2002) telah melaporkan bahwa *Salmonella enterica serovar typhi* memiliki adhesin fimbrial yang diberi nama AdhO36. Materi fimbrial ini diperoleh melalui ekstraksi menggunakan deterjen *Chaps* yang bekerja untuk menarik *outer membrane protein* dari bagian badan sel bakteri yang telah dipisahkan dari pili (fimbriae). Singh, *et.al.*, (2007), pada penelitiannya terhadap Omp *S. Typhimurium* mengungkapkan bahwa, fraksi Omp dianalisis dengan SDS-PAGE dan *matrix-*

*assisted laser desorption ionization time-of-flight* (MALDI-TOF) spektrometri massa, yang mengungkapkan 10 protein. Protein ini terdiri atas protein OmpA 37 kDa, 33 kDa TSX, 28 kDa Omp putatif, 28 kDa Vac J, 39 OmpD kDa, 18 kDa OmpX, 23 kDa OmpW, 43 kDa dan 19 lipoprotein OmpS1 kDa peptidoglikan terkait. Pada penelitian ini diungkapkan, bahwa untuk pertama kalinya telah mampu diidentifikasi beberapa protein berat molekul rendah di Omps Salmonella yang *immunoreactive* sel T pada pasien dengan induksi Rea/uSpA Salmonella. Hal ini memberi makna bahwa pada kelompok bakteri Salmonella lain juga ditemukan beberapa protein yang memiliki BM yang hampir sama.

Menurut Wardhani, *et.al.*,(2005), Omp terdiri dari 2 bagian yaitu protein porin dan protein nonporin. Porin merupakan komponen utama Omp, dan merupakan saluran hidrofilik yang berfungsi untuk proses difusi solut dengan senyawa dengan BM < 6000. Sifat resistensi terhadap proteolisis dan denaturasi pada suhu 85°C - 100°C. Protein nonporin terdiri atas protein Omp-A, protein dan lipoprotein, bersifat sensitif terhadap protease, tetapi fungsinya masih belum jelas diketahui. Beberapa peneliti menemukan antigen Omp bakteri

*S.typhi* ada yang sangat spesifik yaitu protein 50 kDa /52kDa.

Chander, *et.al.* (2004), melaporkan bahwa toleransi asam *Salmonella enterica serovar typhi* menimbulkan respon melalui over ekspresi 55 kDa (approx) Omp. Dalam studi tersebut, ditunjukkan untuk pertama kalinya bahwa Omp 53,2 kDa dari *S. typhi* adalah komponen subunit FliC-kompleks motor flagellar yang terletak di ruang periplasmik bakteri. Menariknya, juga ditunjukkan dari penelitian ini bahwa di bawah kondisi asam, *S.typhi* mengekspresikan fenotipe 53,2 kDa dengan intensitas jauh lebih tinggi (0,4 kali) dibandingkan dengan ekspresi dalam kondisi normal. Menurut Arcidiacono, *et.al.*,(2002), bahwa porin memainkan peran kunci dalam penyerapan dan pembuangan senyawa hidrofilik kecil. Pada penelitian lain juga dijelaskan bahwa porin memainkan peran potensial sebagai immunogens dalam tes diagnostik dan vaksinasi. Sundara-Baalaji, *et.al.*(2006) melaporkan bentuk trimerik imunodominan beta-barrel membran protein luar dari *S.typhi* OmpC, agen penyebab tifoid, secara fungsional telah dikarakterisasi. Pori OmpC *enterica serovar Typhi* ternyata lebih besar dibandingkan dengan pori porin OmpC pada *E.coli*.

Crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk., telah diketahui pada penelitian sebelum, mengandung berbagai senyawa yang bersifat antibakteri, namun sejauh ini belum diketahui bagaimana senyawa ini mampu membunuh sel bakteri. Berdasarkan tahap pertama hasil penelitian ini bahwa crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk, mengandung alkaloid dan tannin (Kundera, 2002). Hasil uji MIC alkaloid dari ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk., terhadap *S.typhi* ternyata pada konsentrasi 20% mampu menghambat pertumbuhan bahkan membunuh sel *S.typhi*. Kemampuan penghambatan dan daya bunuh crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk., pada *S.typhi* memiliki korelasi yang positif terhadap perubahan profile ekspresi protein Ompnya. Sesuai dengan hasil penelitian ini bahwa kandungan alkaloid dan tanin dari crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lam., nampaknya cukup memberi pengaruh terkait dengan peningkatan nilai osmolaritas dinding sel bakteri. Sehingga mampu mengganggu kestabilan protein penyusun membran sel bakteri *S.typhi*. Walaupun crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk., telah dipartisi dan secara kualitatif ditemukan alkaloid dan Tanin, namun peran setiap senyawa ini belum dapat memberikan

kesimpulan tentang pola perubahan ekspresi protein Omp ini.

Kajian aktivitas antibakteri yang ditunjukkan oleh crude ekastrak bunga *A.hetrophyllus* Lamk., mengacu pada stress osmolaritas terhadap sel bakteri, karena secara invitro terjadi perbedaan osmolaritas antara sel bakteri dengan media tempat tumbuhnya. Kandungan alkaloid dan senyawa lain mungkin mampu mengganggu berbagai barrier nutrisi dan protein penyusun dinding sel bakteri. Masih menjadi pertanyaan, apakah senyawa alkaloid ini mampu memutuskan berbagai ikatan hidrogen dan sulfida pada dinding sel dan mendegradasi protein penyusun dinding sel bakteri. Hal ini mungkin mengakibatkan terjadinya perubahan komposisi protein dinding sel bakteri dan memberi hasil pada perubahan bend protein hasil elektroforesis SDS-PAGE protein Omp. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji imugenitas crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk., termasuk uji toksisitasnya terhadap hewan coba. Selain itu perlu juga dikaji lebih jauh mengenai peran setiap Omp *S.typhi*, dikaitkan dengan bend-bend protein Omp yang stabil tereksprei walaupun terjadi paparan oleh crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk. Hasil penelitian ini akan menjadi data pendukung



dari pengembangan pemanfaatan ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk, sebagai kandidat anti bakteri atau anti diare.

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa : Crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk., memiliki efek antibakteri terhadap *S.typhi*, dan pada konsentrasi <30% telah mampu menghambat pertumbuhan *S.typhi*. Ekspresi profile protein Omp faktor virulensi strain *S.typhi* dari Palu terdiri atas protein dengan berat molekul; 80 kDa, 66 kDa, 57 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 33 kDa, 30 kDa, 28kDa, 23 kDa, 20 kDa, 16 kDa, 14 kDa dan 10kDa. Terjadi perubahan ekspresi profil *outer membrane protein* (Omp) faktor virulensi bakteri *S.typhi* terhadap paparan crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas dan efek genetik dari crude ekstrak bunga *A.heterophyllus* Lamk, terhadap *S.typhi*.

### Daftar Pustaka

Arcidiacono S., Butler,M.M., and Mello,C.M., 2002. A Rapid Selective Extraction Procedure for the Outer Membrane Protein (OmpF) from *Escherichia coli*, Protein Expression and Purification **25**, 134–137.

Arung, E.T., K.Shimizu., and R.Kondo., 2006. Inhibitory Effect of *Artocarpus*

*heterophyllus* on Melanin Biosynthesis, *Biol. Pharm Bull.* 29 (9). 1966-1969.

Aulanni'am, 2004. Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul, UB-USaha Nasional, 13-83.

Baker , S., K.Holt., S. Whitehead., I. Goodhead., T. Perkins., B. Stocker., J.Hardy., and G. Dougan., 2007. A Linear plasmid truncation Induces unidirectional flagellar Phase Change in H: z66 Positive *Salmonella* Typhi. *Mol. Microbiol.* 66: 1207-1218.

Baker, S., K.Holt., E. Vosse., P. Roumagnac., *et.al.*, 2008. High-Throughput Genotyping of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Allowing Geographical Assignment of Haplotypes and Pathotypes Within an Urban District of Jakarta, Indonesia. *J.Clin.Microbiol.* 46(5): 1741-1746.

Boyle, E.C., J.Bishop., G.A. Grassl., B.B. and Finlay., 2007. Salmonella : From Pathogenesis to Therapeutics, *J.Bacteriol.* 189 (5): 1489-1495.

Calva, E., and J.L.Puente., 1995. *Salmonella* Typhi Outer Membrane Proteins : Their roles in Typhoid Fever, SEA. *J.of Tropmed and PH:* 26 Suppl.2 : 138-144.

Demuth, D.R., and R.J. Lamont., 2006. Bacterial Cell-to-Cell Communication: Role in Virulence and Pathogenesis. *Cambridge Univ.Press.* 175-199./ [www.cambridge.org](http://www.cambridge.org).

Dhaenens, L., F.Szcebara., and M.O.Husson., 1997. Identification, Characterization and Immunogenicity of Lactoferrin-Binding Protein from *Helicobacter pylori*, *Infect.Immun.* 65 (5) : 514 -518.

Chander, H., Majumdar, S., Sapru, S., Rishi, P., 2004. Reactivity of typhoid patient sera with stress induced 55 kDa phenotype in *Salmonella enterica*

- serovar Typhi. *Mol. Cell. Biochem.* 267: 75-82.
- Gaind, R., B. Pagleitti., M.Murgia., R.Dawar., S.Uzzau., P.Cappuccinelli., M.Deb., P. Anggarwal., and S.Rubino., 2006. Molecular characterization of Ciprofloxacin-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhi and ParaTyphi A Causing enteric fever in India. *J.Antimicrob. Chemother.* 58: 1139-1144.
- Gerlach,R.G., D. Jackel., N. Geymeier., and M. Hansel., 2007. Salmonella Pathogenicity Island 4-Mediated Adhesion Is Coregulated With Invasion Genes in *Salmonella enterica*.*Infect.Immun.* 75(10): 4697-4709.
- Harris, J.B., A.Baresch-Bernal., and S.M. Rollins., *et.al.*, 2006. Identification of In Vivo-Induced Bacterial Protein Antigens during Human Infection with *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *Infect.Immun.* 74(9): 5161–5168.
- Hidayat, I.W., M.Agma., S.Arigayo., A.Ramlan., and W.Kraus., 1994. *Phytochemical Screenings and Ethnobotanical Studies of Indonesian Plants part I*, Padjadjaran University, (prosseding), p: 6.
- Khanum, S., N. Us-Saba., M. Qayyum., B. Ul-Islam and A.A. Qazibash., 2006. Emergence of Multidrug Resistant strains of *Salmonella* Typhi and Paratyphi A in the Rawalpindi/Islamabad. *J.Med.Sci.* 6(1): 68-73.
- Kundera,I.N., 2002. Daya antibakteri Ekstrak Bunga Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) Terhadap Beberapa bakteri patogen Saluran Pencernaan, PPS. Unpad. *J. Biosains*, 2 : 44-53.
- McKane, L., and K.Judi.,1996. Microbiology Essentials and Applications, Second edition, McGraw-Hill, Inc.USA, p.787-809.
- Morris, C., M.C.Yip., I.S.M.Tsui., D.K.H.Wong., and J.Hackett., 2003. The Shufflon of *Salmonella enterica* serovar Typhi Regulates Type IVB Pillus-Mediated Bacterial Self-Association, *Infect.Immun.* 71 : 1141-1146.
- Nomura, T., Y.Hamo., and M.Aida., 1998. *Heterocycles*, 47, (2) : 1179.
- Nursal, Sutrista, M. dan N.R.Nganro., 1997. Pengaruh Ekstrak Akar *Acanthus ilicifolus* terhadap pertumbuhan Bakteri *Vibrio parahaemolyticus*, *J. Biosains*, 2 : 32-37.
- Perry, M.B., 1993. Some Structural Aspect of the Antigenic O-polisaccharide componen of *Salmonella* somatic lipopolysaccharides. In : Cabello F, Hormaeche C, Mastroeni P., Bonina L., editor, *Biology of Salmonella*, New York ; *Plenum Press*, 245 : 63 – 78.
- Santoso S., Winarsih S., 2002., Uji Adhesi dan Proktevitas In vivo Protein Omp 36kDa *Salmonella* Typhi Isolat Malang pada Mencit, Kongres Nasional Bersama *PETRI VIII, PERPARI V, PKWI V*, MALANG.
- Singh, B., 2001. Epidemiology : Typhoid Fever, *J. Indian.Acd. of. Clin. Med.* 2 : 1-2.
- Singh, R., Shasany, A.K., Aggarwal, A., Sinha,S., Sisodia,B.S., S. P. S. Khanuja,S.P.S., and Misra,R.,2007.Low molecular weight proteins of outer membrane of *Salmonella typhimurium* are

immunogenic in *Salmonella* induced reactive arthritis revealed by proteomics, British Society for Immunology, *Clinical and Experimental Immunology*, 148: 486–493.

Timothy, F., M.D.Jones., I.Amanda., E.Kathleen., Fullerton, R.Marcus., J.A.Bridget., P.V.MeCarthy., D.Vugia., B.Shiferaw., N.Haubert., S.Wedel., and F.J.Angulo., 2006. A Case-Control Study of The Epidemiology of Sporadic Salmonella Infection in Infants, *Pediatric J.* 118 ; 6 : 2380-2387.

Sundara-Baalaji N., Mathew M.K., and Krishnaswamy S., 2006. Functional assay of Salmonella typhi OmpC using reconstituted large unilamellar vesicles: a general method for characterization of outer membrane proteins. *J.Biochimie*, 88(10):1419-24

Wardhani, P., Prihatini., and M.Y. Probahoedo., 2005. Widal Tube Test Capability Using Imported Antigen and Local Antigens, *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*, 12(1) : 31-37.