

IDENTIFIKASI PROTEIN DARI CRUDE ANTIGEN OUTER MEMBRANE PROTEIN (OMP) *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR *TYPHI* ASAL SUSPEK DEMAM TIFOID MAKASSAR

Asbar hamzah¹⁾, Cut Muthiadin²⁾, Mashuri Masri³⁾

Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Alauddin Makassar

Email: cutmuthia82@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bobot molekul protein OMP *S. Typhi* asal Makassar dengan menggunakan metode SDS-PAGE. Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei sampai Juni 2014 di Laboratorium Imunologi dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran. Penelitian ini menggunakan antigen OMP hasil ekstraksi kultur bakteri *S. Typhi* dari serum darah penderita demam tifoid yang diperoleh dari Rumah Sakit di Kota Makassar. Monitoring bobot molekul dikerjakan menggunakan SDS-PAGE metode Laemmli yang telah dimodifikasi yaitu *separating gel* 12%, *stacking gel* 3%, dan pewarnaan gel (*staining*) menggunakan *coomassie blue*. Proses elektroforesis menggunakan tegangan listrik 120 volt 40 mA selama 3,5 jam. Gel hasil SDS-PAGE memperlihatkan adanya tiga band protein mayor OMP *S. Typhi* yaitu pada 25 kda, 36 kda, 55 kda, dikarenakan pada ekstrak kasar masih banyak debris dari protein lain.

Kata kunci: OMP *S. Typhi*, SDS-PAGE, Makassar

PENDAHULUAN

Bagian dari *S. Typhi* yang dapat berfungsi sebagai antigen antara lain (i) kapsul Vi polisakarida yang terletak pada lapisan paling luar, berfungsi untuk menghindari respon dan fagositosis, (ii) lipopolosakarida (LPS) yang bersifat virulen dan merupakan antigen penting bagi *S. Typhi*, antigen ini dikenal sebagai antigen O merupakan suatu endotoksin pada manusia dan binatang. Antibodi terhadap LPS antigen O berhubungan erat dengan infeksi sebelumnya, tetapi tidak berkaitan dengan proteksi tubuh terhadap infeksi *S. Typhi*, (iii) flagel protein yang dikenal sebagai antigen H, terdiri dari komponen protein yang disebut sebagai flagelin yang bertanggung jawab terhadap aktifitas antigen flagel, tetapi antibodi terhadap flagelin tidak dapat melindungi tubuh terhadap infeksi *S. Typhi*¹.

Selain itu, diketahui ada tipe antigen lain yang dikenal sebagai antigen OMP (*outer membrane protein*), yaitu salah satu komponen *envelope* bakteri *S. Typhi* yang mengisi hampir separuh bagian membran luar². Beberapa peneliti telah membuktikan bahwa protein spesifik OMP ini merupakan imunogen yang baik dalam menginduksi kekebalan seseorang terhadap *S. Typhi*¹. OMP terletak pada permukaan bakteri Gram negatif, yang akhir-akhir ini dianggap sebagai antigen penting dalam menginduksi suatu

respon imun spesifik³.

Beberapa penelitian yang telah mengidentifikasi protein dari OMP *S. Typhi* yaitu diantaranya: OMP *S. Typhi* memiliki potensi imunogenik yang sangat kuat dan telah dilibatkan sebagai kandidat vaksin demam typhoid. Peran Protein Membran hemagglutinin luar 55kDa *S. Typhi* isolat Jember sebagai protein hemagglutinin dan adhesin⁴. Sri Winarsih dkk⁵: Reaksi antara protein Adh036 *S. Typhi* dengan OMP *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan cara Western Blotting. Aslam, *et al* (2012)⁶ : telah dilakukan purifikasi, identifikasi dan karakterisasi terhadap 34kDa Outer membrane protein (OMP) *S. Typhi* dan memberikan hasil bahwa protein tersebut sangat imunogenik dan dapat mengenali keseluruhan sel *S. Typhi*. Selanjutnya protein tersebut dapat menjadi kandidat vaksin. Kaur, J., Jain,⁷ : diperoleh protein dari OMP *S. Typhi* dengan berat molekul 49 kDa adalah protein yang imunogenik terhadap infeksi *S. Typhi*.

METODE PENELITIAN

1. Preparasi SDS Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE))

Monitoring bobot molekul dikerjakan menggunakan SDS-PAGE metode Laemmli (1970) yang telah di modifikasi⁸. Sebelum proses SDS PAGE, terlebih dahulu plate pembentuk gel (cetakan) disusun, setelah itu *separating gel* dibuat dengan komposisi aquades 3,95 ml; 1,5 M Tris HCl pH 8,8 2,5 ml; 30% acrylamid/bis 3,35 ml; 10% SDS 0,2 ml; 10% APS 75 ul, dan temed 10 ul. Larutan kemudian dituang kedalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 mL (diusahakan tidak terbentuk gelembung udara) sampai batas yang terdapat pada plate. Secara perlahan ditambahkan aquades di atas larutan gel dalam plate agar permukaan gel tidak bergelombang.

Biarkan gel memadat selama kurang lebih 30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan diantara batas air dan gel yang terbentuk) setelah itu, air yang menutup *separating gel* dibuang/diserap dengan menggunakan kertas saring. Setelah *separating gel* memadat, *stacking gel* disiapkan dengan cara yang sama pada prosedur di atas dengan komposisi aquades 2,75 ml; 1,5 Tris HCl pH 6,8 750 ul; 30% acrylamid/bis 700 ul; 10% SDS 50 ml; 10% APS 50 ul dan temed 5 ul. Kemudian tuang *stacking gel* dituang diatas *separating gel* yang telah memadat Sisir tempat penyuntikan sampel lalu dipasang, kemudian biarkan beberapa lama hingga gel memadat. Sisir dilepas perlahan-lahan jika gel telah memadat.

2. Injeksi dan Running Sampel

Sampel diambil dengan pipet, kemudian dimasukkan kedalam eppendorf. Selanjutnya sampel ditambahkan dengan 10-20 µl loading atau reducing sample buffer (RSB) dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. Didinginkan pada suhu kamar. Sampel dimasukkan masing-masing 5, 10, 15, dan 20 µl kedalam sumur gel secara hati-hati dengan menggunakan mikropipet. Sebelum *running*, tuangkan *running buffer* sampai merendam gel. Untuk melakukan *running* hubungkan perangkat

elektroforesis dengan power supply dengan arus pada 40 mA tegangan 120 V selama 3,5 jam.

3. Pewarnaan Gel

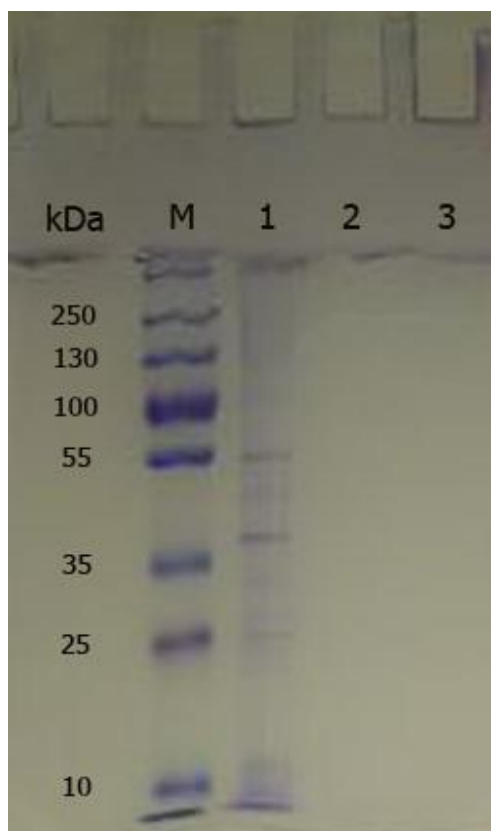
Untuk tahap ini diperlukan larutan staining untuk mewarnai protein pada gel, dan larutan destaining untuk pencucian atau menghilangkan warna pada gel dan memperjelas band protein yang terbentuk. Gel direndam didalam 100 ml larutan pewarna coomassie brilliant blue sambil digoyang selama 30 menit, kemudian larutan pewarna dituang kembali ke wadahnya. Selanjutnya gel direndam dalam larutan destaining selama 1 jam. Dicuci dengan aquades lalu diletakkan dalam wadah kemudian pita protein selanjutnya discan/di foto dengan kamera digital.

HASIL

Proses ekstraksi antigen OMP *S. Thypi* dilakukan dengan menggunakan prinsip sonikasi (proses pengubahan sinyal listrik menjadi getaran mekanis), proses ini bertujuan untuk memecahkan ikatan antar molekul atau untuk merusak sel. Antigen OMP hasil ekstraksi berupa crude antigen *dirunning* pada perangkat elektroforesis protein untuk melihat profil berat molekul protein antigen OMP.

Perhitungan kadar protein penting untuk menentukan apakah nilai konsentrasi protein antigen OMP sudah memenuhi syarat untuk dilakukan pemeriksaan berat molekul (BM) dengan SDS-PAGE, sesuai dengan pernyataan dari Scope (1993) yang menyatakan bahwa konsentrasi protein terendah yang diperlukan untuk analisis protein yaitu sebesar 1,2 µg/ml⁹. Olehnya itu, sebelum dianalisis dengan SDS PAGE telah dilakukan pengukuran terhadap konsentrasi dari protein sampel untuk menentukan apakah sampel layak atau tidak untuk dianalisis menggunakan metode SDS PAGE, dan diperoleh kadar protein sebesar 6,878 mg/mL

Dengan melakukan elektroforesis menggunakan metode SDS PAGE dapat diketahui profil *band* (pita) protein yang muncul pada protein OMP. Pita protein yang muncul dihitung berat molekulnya melalui regresi-korelasi yang dibandingkan dengan protein petanda (*Marker Protein*). Berdasarkan hasil elektroforesis dengan pewarnaan *commassie brilliant blue*, diperoleh gambaran *band* (pita) dalam satuan berat molekul kDa sebagai berikut:



Gambar 1. Hasil SDS PAGE OMP *S. Typhi*

Keterangan:

M = Marker

Line 1 = crude OMP *S. Typhi*

PEMBAHASAN

Metode SDS PAGE pada prinsipnya adalah prosedur untuk memilah molekul-molekul berdasarkan ukuran dan muatannya dengan menggunakan suatu medan listrik, dimana molekul dipindahkan atau digerakkan melewati suatu gel. Ketika arus listrik berlangsung, molekul yang lebih besar akan bergerak lebih lambat melewati gel, sedangkan molekul yang berukuran lebih kecil dapat bergerak lebih cepat. Perbedaan ukuran molekul tersebut akan mempengaruhi bentuk *band* pada gel. Prinsip ini digunakan pada proses purifikasi dan karakterisasi antigen OMP *S. Typhi* untuk melihat protein dari antigen OMP dan variasi berat molekul protein antigen OMP *S. Typhi* tersebut.

Outer Membrane Protein (OMP) merupakan salah satu lapisan membran sel yang merupakan bagian dari mayor antigen yang berhubungan dengan aktivitas nonspesifik endotoksin terutama pada bakteri Gram negatif. *Outer Membrane Protein* (OMP) *S. Typhi* merupakan bagian membran sel yang terletak di luar membran sitoplasma dan lapisan peptidoglikan yang membatasi sel terhadap lingkungan sekitarnya.

Penggunaan metode SDS PAGE dalam penelitian ini, selain merupakan metode

umum dalam analisis protein untuk melihat *band-band* protein sampel dan penentuan berat molekulnya, juga untuk melihat tingkat kemurnian dari protein antigen OMP *S. Typhi* dari sampel itu sendiri.

Elektroforesis SDS-PAGE menggunakan gel buatan sebagai medium penyangga, yaitu gel poliakrilamid yang dikombinasikan dengan SDS. Penggunaan poliakrilamid mempunyai keunggulan dibandingkan dengan gel lainnya, karena tidak bereaksi dengan sampel dan tidak membentuk matriks dengan sampel, sehingga tidak menghambat pergerakan sampel yang memungkinkan pemisahan protein secara sempurna. Selain itu, gel poliakrilamid ini mempunyai daya pemisahan yang cukup tinggi. Matriks poliakrilamid memiliki 2 fungsi utama. Fungsi pertama adalah memisahkan protein menurut ukuran, bentuk dan muatan. Fungsi kedua adalah untuk mempertahankan pH tetap untuk memastikan muatan protein agar tidak berubah.

Komponen penting yang membentuk gel poliakrilamid adalah akrilamid, bis akrilamid, ammonium persulfat dan TEMED (N,N,N',N' tetrametilendiamin). Akrilamid sebagai senyawa utama yang menyusun gel adalah merupakan senyawa karsinogenik. Ammonium persulfat berfungsi sebagai inisiator yang mengaktifkan akrilamid agar bereaksi dengan molekul akrilamid yang lainnya membentuk rantai polimer yang panjang. TEMED berfungsi sebagai katalisator reaksi polimerisasi akrilamid menjadi gel poliakrilamid sehingga dapat digunakan dalam pemisahan protein.

Bis-akrilamida berfungsi sebagai *cross-linking agent* (ikatan silang) yang membentuk kisi-kisi bersama polimer akrilamid. Kisi-kisi tersebut berfungsi sebagai saringan molekul protein. Perbandingan antara akrilamid dengan bis-akrilamid dapat diatur sesuai dengan berat molekul protein yang dipisahkan. Semakin rendah berat molekul protein yang dipisahkan, maka semakin tinggi konsentrasi akrilamid yang digunakan agar kisi-kisi yang terbentuk semakin rapat¹⁰.

SDS sendiri adalah deterjen yang mempunyai muatan negatif yang sangat besar sehingga SDS akan mengikat muatan positif dari protein dan dengan demikian mengakibatkan pergerakan protein ke arah elektroda positif. SDS juga akan menyebabkan protein terdenaturasi (dalam hal ini SDS mampu memutuskan ikatan-ikatan sub unit protein membentuk protein yang dapat terelusi dalam gel) dan meningkatkan daya membuka molekul protein¹¹. Selain SDS, pemanasan sampel sebelum dielektroforesis juga menyebabkan rusaknya struktur tiga dimensi protein menjadi konfigurasi acak. Hal ini disebabkan oleh pecahnya ikatan disulfida yang selanjutnya tereduksi menjadi gugus-gugus sulfidril¹².

Protein yang terdenaturasi sempurna akan mengikat SDS dalam jumlah yang setara dengan berat molekul protein tersebut. Denaturasi protein dilakukan dengan merebus sampel dalam buffer yang mengandung β -merkaptotanol (berfungsi untuk mereduksi ikatan disulfide), gliserol dan SDS. Muatan asli protein akan digantikan oleh muatan negatif dari anion yang teikat sehingga kompleks protein-SDS memiliki rasio

muatan per berat molekul yang konstan¹⁰.

Prosedur pewarnaan berguna untuk mewarnai *band-band* yang muncul sehingga dapat dideteksi keberadaan *band-band*. Pewarna yang sering digunakan ialah *coomassie blue*. *coomassie blue* merupakan pewarna yang sensitif untuk deteksi *band-band* protein pada gel poliakrilamid. Pewarnaan dengan *coomassie blue* memberikan warna biru pada band dengan sensitivitas 50-100 ng/*band*. *Band* protein hasil SDS PAGE terlihat sebagai noda ditempat terjadinya reduksi. *Band-band* yang terlihat memberikan informasi tentang berat molekul dan komposisi subunit dari berbagai kompleks protein¹³.

Karakterisasi protein *S. Thyphi* dilakukan dengan teknik SDS-PAGE dengan *separating gel* 12%, *stacking gel* 3%, dan pewarnaan gel (*staining*) menggunakan *coomassie blue*. Proses elektroforesis menggunakan tegangan listrik 120 volt 40 mA selama 3,5 jam. Gel hasil SDS-PAGE memperlihatkan adanya tiga kandidat pita (*band*) protein antigen *S. Thyphi* yaitu 25 kDa, 36 kDa, 55 kDa.

Disini terdapat perbedaan berat molekul yang sangat variatif dari berbagai daerah hal ini disebabkan adanya perbedaan lingkungan (*environment*) yang mengakibatkan perbedaan ekspresi gen yang selanjutnya berpengaruh pada sintesa protein dan akhirnya mempengaruhi virulensi *S. Thyphi*. Perbedaan bisa juga karena adanya variabilitas galur atau strain dari *S. Thyphi* sehingga terdapat sifat maupun protein yang berbeda¹⁴.

KESIMPULAN

Identifikasi berat molekul protein dengan SDS-PAGE pada antigen crude OMP yaitu menunjukkan pola band 25 kda, 36 kda, 55 kda, dikarenakan pada ekstrak kasar masih banyak debris dari protein lain. Disarankan untuk memurnikan protein (crude) OMP tersebut dengan metode dialisis dan kromatografi.

KEPUSTAKAAN

- Muliawan, dan Surjawidjaya. 1999. Diagnosis dini demam tifoid dengan menggunakan protein membran luar *S. Typhi* sebagai antigen spesifik.
- Sarasombath S, Korbsrisate S, Banchuin N, Thanomsakyuth A, Sukosol T, Ekpo P. 1998. *Serological approaches of Typhoid Fever*. Med.Indon: vol. 7,54 -8.
- Brooks, Geo, F. Janet, S. Butel & L.Nicholas O., 2005. *Mikrobiologi Kedokteran EGC*. Jakarta.
- Diana Chusna Mufida, Candra Bumi, dan Heni Fatmawati. 2009. Peran Protein Membran Luar 55 Kda *Salmonella Typhi* Isolat Jember Sebagai Protein Hemaglutinin Dan Adhesin. Berk. Penel. Hayati: 15 (11-16), 2009
- Winarsih, Sri. 2007. Cloning and expression gene Adhesin Adho36 of *S.Typhi* as candidate vaccines of Typhoid fever. Report of Research. RISTEK
- Aslam MS, Akhter M, Rasheed R, Samra ZQ, Gull I, Athar MA, 2012. Identification and purification of antigenic 34 kDa outer membrane protein of *Salmonella typhi*.

- Pubmed. Clin Lab.; 58 (9-10): 1071-7
- Kaur, J, and Jain, S.K. 2013. High Level Expression of 49kDa Outer Membrane Protein of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Annals of Biological Research*, 4 (1): 107-117.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Scopes, K.R. 1994. *Protein Purification*. Springer Scienses.
- Wilson K. 1994. *Protein and enzyme techniques In Practical Biochemistry*, (ed. Wilson K and Walker JM), Cambridge University Press. p.161-226.
- Smith BJ.1984. *SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins*. Di dalam Walker JM, editor. *Proteins. Methoda in Molecular Biology*. Volume ke-1. Clifton:Humana Pr.hlm 41-55.)
- Sumarmo S, Garna H, Sri RSH, Hindra IS. *Buku Ajar Infeksi dan Pediatrik Tropis*. Jakarta: Badan Penerbit IDAI; 2002.
- Supriyadi. 2006. *Keanekaragaman Genetik Populasi Wereng Hijau, *Nephotettix virescens* Asal Wilayah Endemi dan Nonendemi Virus Tungro Padi*. Disertasi. Universitas Gajah Mada Yogyakarta.