

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui *Outer Membrane Protein* (OMP) bakteri *Salmonella typhi* isolat Rumah Sakit Ibnu Sina Gresik. Dari hasil pewarnaan Gram terlihat bakteri bentuk batang, koloni bakteri nampak berwarna merah menandakan bahwa *Salmonella typhi* merupakan bakteri Gram negatif (Kasim, 2020).

Langkah pertama yang dilakukan pengambilan spesimen kultur darah dengan sampel darah sebanyak 8 – 10 ml untuk pasien 1 – 3 ml untuk pediatric dan 0,5 – 1 ml untuk pasien Neonatus. Sampel darah dimasukkan ke dalam botol *Bactec* dan dimasukkan ke alat *Bactec 9050* inkubasi selama 1-4 x 24 jam. Jika terdapat pertumbuhan dilanjutkan pengecatan Gram dan penanaman pada BAP dan MC agar dan di inkubasi di suhu 37°C selama 18 – 24 jam. Selanjutnya dilakukan inokulasi pada *Phoenix* dengan mengambil koloni dari media pertumbuhan dan masukkan ke ID Broth vortex selama 5 detik lalu di ukur kekeruhan menggunakan Nephelometer dengan standar 0,5 – 0,6 Mc Farland untuk Gram Negatif dan 0,2 – 0,3 Mc Farland untuk Gram Positif.

Selanjutnya dilakukan isolasi *Outer Membrane Protein* bakteri *Salmonella typhi*. *Outer Membrane Protein* mempunyai peranan penting pada virulensi bakteri Gram negatif. *Outer Membrane Protein* (OMP) *Salmonella typhi* merupakan bagian dinding sel yang terletak di luar membran sitoplasma dan lapisan peptidoglikan yang membatasi sel terhadap lingkungan sekitarnya (Kasim, 2020).

Pengamatan profil protein dalam penelitian ini menggunakan teknik elektroforesis gel dengan poliakrilamid yang merupakan larutan dari akrilamid dan bis akrilamid sebagai separasi sampel protein atau biasa disebut juga metode *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Elektroforesis* (SDS-PAGE). Metode karakterisasi protein dengan menggunakan SDS-PAGE umumnya didasarkan pada berat molekul protein. Karakterisasi protein ini menggunakan metode elektroforesis karena tidak mempengaruhi struktur bipolimer dan sensitif terhadap berat molekul yang cukup kecil. Pada penelitian ini identifikasi profil protein OMP *Salmonella typhi* berdasarkan berat molekul relatifnya telah dilakukan preparasi protein menggunakan teknik SDS-PAGE yaitu dengan menentukan perbedaan letak pita pada gel dibandingkan dengan marker protein.

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, bisakrilamid, ammonium persulfat dan TEMED (*N,N,N',N'* tetrametilendiamin).

Sodium Dodecyl Sulphate (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 protein (Hamzah, 2015).

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 protein. Karakterisasi protein *Salmonella typhi* dalam penelitian ini dilakukan dengan teknik SDS-PAGE dengan *Separating Gel* 12%, *stacking gel* 4%, dan pewarnaan gel (*staining*) menggunakan *Coomassie Blue*.

Hasil pewarnaan didapatkan pada kolom I terdapat 7 pita (band) yaitu 97 kDa, 41,9 kDa, 36 kDa, 27,5 kDa, 23,1 kDa, 15,7 kDa, 13,9 kDa. Pada kolom II, III dan IV terdapat 6 pita (band) yaitu 97 kDa, 41,9 kDa, 36,0 kDa, 33,5 kDa, 27,5 kDa, 13,9 kDa dan ada kolom V, VI, VII dan VIII terdapat 6 pita (band) yaitu 54,6 kDa, 41,9 kDa, 36 kDa, 27,5 kDa, 16,4 kDa, 13,9 kDa.

Hasil pemeriksaan SDS-PAGE menunjukkan protein utama OMP Bakteri *Salmonella typhi* isolat Rumah Sakit Ibnu Sina Gresik berada pada 36 kDa yang tampak tebal diantara protein-protein lain yang tampak. Selain itu terdapat protein minor yang spesifik yaitu 41,9 kDa, 27,5 kDa dan 13,9 kDa.

Perbedaan tebal dan tipisnya pita yang terbentuk disebabkan oleh perbedaan jumlah dari molekul-molekul yang termigrasi, pita tebal merupakan fiksasi dari beberapa pita. Pita yang memiliki kekuatan ionik lebih besar akan termigrasi lebih jauh daripada pita yang lain ionik kecil. Protein yang digunakan sebagai ciri genetik untuk mempelajari keragaman individu dalam satu populasi. Ada atau tidaknya pita pada jarak migrasi tertentu menunjukkan ada atau tidaknya protein yang termigrasi dan berhenti pada jarak tersebut selama proses elektroforesis (Nugraha, 2019).

Hasil penelitian OMP strain *Salmonella typhi* isolat Rumah Sakit Ibnu Sina Gresik memiliki berat molekul berada pada 36 kDa yang memiliki karakteristik yang sama dengan OMP *Salmonella typhi* isolat RS di Makasar (Hamzah, 2015), *Salmonella typhi* isolat Rumah Sakit Kariadi Semarang (Darmawati, 2012) dan *Salmonella typhi* isolat RSUD Syaiful Anwar Malang (Sanarto, 2002).

Persamaan berat molekul OMP bakteri *Salmonella typhi* isolat Rumah Sakit Ibnu Sina Gresik dengan daerah Makasar, Semarang dan Malang menunjukkan kesamaan karakteristik yang dimiliki oleh bakteri *Salmonella typhi* dari beberapa daerah di Indonesia terutama persamaan serotipe antigen dalam hal ini Antigen O (Antigen Somatik) terletak pada lapisan luar dari tubuh bakteri *Salmonella typhi*. Berdasarkan persamaan berat molekul dan perhitungan indeks

similiaritas dapat diketahui apakah bakteri *Salmonella typhi* tersebut berasal dari strain yang sama dan merupakan kesamaan sub spesies *Salmonella typhi* dari beberapa keanekaragaman hayati bakteri *Salmonella typhi* yang ada di Indonesia.

Selain itu dalam penelitian ini terdapat perbedaan berat molekul yang sangat variatif yang berbeda dengan daerah lain hal ini disebabkan adanya perbedaan lingkungan (*environment*) yang mengakibatkan perbedaan ekspresi gen yang selanjutnya berpengaruh pada sintesa protein dan akhirnya mempengaruhi virulensi *Salmonella typhi*. Perbedaan bisa juga karena adanya variabilitas galur atau strain dari *Salmonella typhi* sehingga terdapat sifat maupun protein yang berbeda.

Pathogenesis bakteri *Salmonella typhi* diawali oleh adanya adhesi antara sel bakteri dengan jaringan inang dengan perantaraan pili dan *Outer Membrane Protein* (OMP). Penelitian yang dilakukan oleh Sanarto (2002) pada bakteri *Salmonella typhi* strain Malang menunjukkan bahwa bakteri tersebut mempunyai molekul hemagglutinin yang juga merupakan adhesin dari OMP dengan berat molekul 36 kDa. Adhesi merupakan kemampuan bakteri untuk dapat melekat pada sel inang. Kemampuan bakteri dalam melakukan adhesi dimediasi oleh berbagai macam protein yang terdapat pada permukaannya. Variasi protein tersebut dinamakan adhesin. Adhesin (AdhF36) merupakan senyawa kimia dengan BM 36 kDa. Ekspresi kepemilikan protein AdhF36 isolat *Salmonella typhi* sebagai faktor virulensi berperan sebagai media adhesi, sehingga diharapkan mampu menghambat tahap awal aktivitas adhesi bakteri bila digunakan sebagai kandidat vaksin (Kundera, 2014).