

## **BAB 6**

### **PEMBAHASAN**

*Outer Membrane Protein* merupakan komponen mayor antigen yang kaitannya dengan aktivitas nonspesifik endotoksin, terletak pada bagian luar membran sitoplasma dan lapisan peptidoglikan yang membatasi sel terhadap lingkungan sekitarnya.

Pada penelitian ini untuk mendapatkan target protein berupa OMP maka dilakukan prosedur sonikasi, dengan memanfaatkan energi suara untuk menggerakkan partikel penyusun membrane sel dan melepaskan komponen selulernya. Metode ini menembakkan gelombang ultrasonik ke dalam medium cair secara sejajar antara getaran partikel medium amplitude dengan arah rambat secara longitudinal, sehingga terbentuk gelembung kavitas yang menyebabkan terjadinya rapatan dan renggangan. Fenomena tersebut menyebabkan membran sel mengalami perenggangan dalam skala nano. Adanya renggangan ini dimanfaatkan untuk mengeluarkan komponen protein OMP untuk diekstraksi dan dianalisa. Namun hal yang perlu diperhatikan adalah penggunaan gelombang ultrasonik dengan tingkat tinggi dalam medium cair berpotensi menimbulkan ketidakstabilan gelembung yang dapat memecah ikatan molekul antar larutan, dan mengakibatkan timbulnya bola-bola berongga berisi gas yang terperangkap (kejadian ini disebut sebagai efek kavitas) (Candani et al., 2018; Thanu et al., 2018). Pada penelitian ini platelet isolat akan dilarutkan kedalam *phosphate buffer saline* pH 7,4 sebagai larutan buffer dan disonikasi dengan frekuensi 35kHz selama 30 detik dengan jeda 1 menit, serta diulang sebanyak 15 kali. Proses

pengulangan ini bertujuan untuk mengeluarkan material protein target secara kontinu dengan tetap mempertahankan integritas membrane sel bakteri. Penelitian yang dilakukan oleh Joanna *et al* (2017) terkait efek gelombang ultrasonik terhadap keberlangsungan hidup strain bakteri *Salmonella enterica* subs. *thphimurium* memaparkan bahwa sonikasi selama 15 menit dengan frekuensi 20 kHz mampu mengurangi jumlah rerata bakteri dari  $5.35 \pm 0.08$  menjadi  $3.97 \pm 1.03$  log CFU/cm<sup>3</sup>, 40 kHz mampu mengurangi jumlah rerata bakteri dari  $5.54 \pm 0.20$  menjadi  $1.55 \pm 2.40$  log CFU/cm<sup>3</sup>, dan 100 kHz mampu mengurangi jumlah rerata bakteri dari  $5.52 \pm 0.04$  menjadi  $4.48 \pm 0.01$  log CFU/cm<sup>3</sup> (Sienkiewicz *et al.*, 2017).

*Phosphate buffer saline* merupakan larutan buffer yang sudah umum digunakan dalam lingkup laboratorium, dimana komposisinya ialah sodium klorida, sodium fosfat, potassium klorida dan potassium fosfat yang mampu menstabilkan konsentrasi garam disekitar sel mencegah terjadinya osmosis (Martin *et al.*, 2006). Pada penelitian ini untuk mendapatkan protein target yang diinginkan tanpa merusak komponen protein dan mampu menjaga integritas dari membrane sel bakteri maka perlu menggunakan larutan yang mampu menjaga stabilitasnya selama proses ekstraksi hingga proses elektroforesis.

Triton X-100 (TX100) merupakan larutan surfaktan nonionik yang ditambahkan setelah proses sonikasi, dimana memiliki kemampuan melisiskan atau mengancurkan permukaan sel bakteri untuk mendapatkan ekstrak protein yang diinginkan. Larutan surfaktan ini juga memiliki peran sebagai stabilisator, agen

pendenaturasi dan bahan peningkat permeabilitas. Namun dalam penggunaannya perlu diperhatikan waktu paparan dan konsentrasinya, karena penambahan triton X-100 dalam jumlah yang besar dan waktu eksposur yang lama dapat menyebabkan kematian sel. Hal ini terjadi karena senyawa triton mengalami peningkatan toksisitas yang menyebabkan gangguan ikatan hidrogen antara kepala polar pada membran sel dengan lapisan bilayer sel lipid, berujung kepada hancurnya kekuatan dan integritas dari membrane sel itu sendiri. Oleh karena itu penambahan dari senyawa triton diawali dari konsentrasi rendah terlebih dahulu (Koley & Bard, 2010). Pada penelitian ini Triton X-100 2% dicampurkan dengan larutan fosfat buffer salien pH 7,4 sebagai bahan pelarut endapan yang akan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Pada fase ini Triton X-100 akan memfasilitasi proses pelarutan membran protein dengan mendestabilisasi ikatannya dengan lapisan peptidoglikan. Mengingat pada bakteri terutama golongan gram negatif, membran protein memiliki ikatan yang kuat dengan lapisan peptidoglikan, sehingga perlu ditambahkan senyawa surfaktan untuk membantu proses ekstraksi (Koley *et al.*, 2010 dan Noda *et al.*, 2017).

Setelah didapatkan ekstrak dilanjutkan dengan perhitungan kadar protein untuk menentukan nilai konsentrasi protein antigen OMP apakah sudah sesuai dengan syarat pemeriksaan berat molekul (BM) menggunakan SDS-PAGE. Sesuai dengan pernyataan dari Scope (1993) bahwa konsentrasi protein terendah yang diperlukan untuk analisa protein adalah 1,2 µg/mL. Pada penelitian ini diperoleh kadar protein sebesar 9.06 mg/mL menggunakan metode nanodrop A280.

Penelitian ini menggunakan gel poliakrilamid yang dikombinasikan dengan SDS sebagai medium penyangganya. Gel poliakrilamid memiliki keunggulan dibandingkan dengan jenis gel lainnya yaitu dengan tidak mengalami reaksi silang dengan sampel dan tidak membentuk matriks, sehingga tidak menghambat pergerakan sampel dan pemisahan fraksi protein terjadi secara sempurna. Karakterisasi fraksi protein OMP menggunakan teknik SDS-PAGE dengan *separating gel 12%*, *stacking gel 4%*, dan pewarnaan menggunakan *Coomassie blue*, serta tegangan listrik sebesar 130 volt dan 50 mA selama 90 menit menghasilkan beberapa fraksi protein.

Pada penelitian ini dilakukan uji pendahuluan dengan perbandingan konsentrasi buffer dan sampel yang bervariasi. Terlihat pada Gambar 6.1 bahwa pada jalur 1, 2, 9,10 terdapat 2 pita protein yang tampak jelas, dimana pada jalur ini konsentrasi buffer lebih banyak dibandingkan dengan ekstrak sampel. Pada jalur 4 dan 6 dengan konsentrasi buffer dan ekstrak sampel sebanding terdapat 5 (lima) pita protein yang dapat diukur dengan jelas, sedangkan sisa fraksi protein lainnya tampak samar. Pada jalur 3 dan 7 dengan perbandingan konsentrasi buffer dan ekstrak sampel sebesar 2 : 1 terdapat 7 (tujuh) pita protein yang dapat terukur dengan jelas. Pada jalur 8 dengan perbandingan konsentrasi buffer dan ekstrak sampel sebesar 3 : 1 juga terdapat 7 (tujuh) pita protein yang dapat terukur, namun jarak antar pita cukup berdekatan yang mengakibatkan lebih sukar untuk ditentukan batas kanan-kirinya. Tujuh fraksi protein tersebut berukuran 65 kDa, 44 kDa, 42 kDa, 39 kDa, 36 kDa, 33 kDa, 31 kDa menggunakan Aplikasi *Gel Analyzer 19,0*.

Setelah uji pendahuluan dilakukan analisa OMP dengan perbandingan konsentrasi buffer dan sampel 2 : 1 untuk dianalisa ulang berat molekulnya. Pada Gambar 5.2 dapat dilihat fraksi protein yang terukur adalah 65 kDa, 44 kDa, 42 kDa, 39 kDa, 36 kDa, 33 kDa, 31 kDa. Fraksi protein diatas merupakan kandidat dari berat molekul OMP *Salmonella typhi* yang merupakan target protein pada penelitian ini.

Variasi hasil pita protein yang didapatkan berasal dari komponen ekstraselular, karena ekstrak sampel tidak melalui proses pemurnian terlebih dahulu. Hal ini terlihat dari banyaknya variasi pita protein yang terbentuk. Untuk pemurnian ekstrak dapat dilakukan dengan beberapa metode seperti fraksinasi garam atau pelarut organik, sentrifugasi, dialysis dan pemisahan dengan kromatografi kolom. Pada tahapan ini akan terjadi pemisahan partikel kecil dari partikel besar dengan menggunakan membran berdasarkan prinsip difusi, dan dilanjutkan dengan pemurnian lanjutan dengan kromatografi filtrasi gel untuk menghilangkan protein tidak diinginkan (Mayasari, 2016 dan Seftiono, 2008).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Moehario *et al* (1997) mengenai isolasi OMP menggunakan metode sonikasi dengan triton X-100 2% menunjukkan tiga fraksi protein mayor 34, 37, dan 38 kDa pada sebagian besar sampel, 3 sampel tidak terlihat fraksi protein 34 kDa, tetapi semua sampel mempunyai fraksi protein minor dengan berat molekul antara 20,5 sampai 139,9 kDa (Verdugo-Rodriguez *et al.*, 1993). Pada penelitian yang dilakukan oleh Muwarni *et al* (2002) dengan menggunakan *sarcosyl*

dan NOG sebagai larutan isolasi protein OMP didapatkan beberapa fraksi protein antara 5.925 kDa sampai dengan 91.602 kDa (Murwani et al., 2002).

Hasil yang didapatkan tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Hamzah *et al* (2014) dimana terdapat tiga kandidat pita protein antigen OMP *Salmonella thypi* yaitu 25 kDa, 36 kDa, dan 55 kDa. Peneliti memaparkan bahwa perbedaan berat molekul yang variatif dari berbagai daerah dapat disebabkan perbedaan ekspresi gen pada lingkungan yang berbeda, berpengaruh pada sintesa protein dan akhirnya virulensi dari bakteri. Perbedaan juga bisa terjadi karena adanya variabilitas galur atau strain dari *Salmonella thypi* sehingga terdapat sifat maupun protein yang berbeda (Hamzah et al., 2014).

Dari penelitian yang dilakukan oleh Singh et al., 2007 memaparkan bahwa fraksi protein OMP dengan berat molekul  $\leq 40$  kDa mengandung antigen target terhadap *synoval T cells* terutama pada pasien dengan infeksi *Salmonella* dengan ReA/uSpaA. Dengan menggunakan pendekatan proteomik, penelitian tersebut mengidentifikasi terdapat 10 jenis fraksi OMP yang bersifat immunodominan. Variasi berat molekul tersebut diantara 18,5 kDa sampai dengan 39,6 kDa bergantung pada jenis OMPnya. Adapun hasil fraksi protein yang teridentifikasi diantaranya ialah OMP A dengan berat molekul sebesar 26,7 dan 37,6 kDa, OMP D dengan berat molekul 37,6 kDa, dan OMP S1 dengan berat molekul sebesar 43,2 kDa. OMP A merupakan struktur major pada *Salmonella thypi* dan memiliki epitope sel B yang bersifat immunodominan, sedangkan OMP D merupakan bagian dari protein porin yang

bersifat imunodominan untuk T sel. (Singh *et al.*, 2007). Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Toledo *et al.*, 2017 bahwa protein porin OMP diantaranya adalah OMP B, C, D dan F dapat mengaktifkan APCs, memproduksi sitokin dan meningkatkan proliferasi dari sel T helper untuk menghasilkan respon antibodi.

Berdasarkan hasil penelitian ini, didapatkan tujuh fraksi protein yang terukur dengan berat molekul sebesar 31 kDa hingga 65 kDa. Diantara variasi tersebut diduga fraksi protein dengan berat molekul sebesar 65 kDa bersifat lebih antigenik dan mampu menstimulasi pembentukan antibodi lebih baik. Hal ini didasari oleh fakta bahwa semakin besar ukuran molekul dari antigen maka semakin banyak epitopenya, menghasilkan banyaknya ikatan antigen-antibodi.

Perbedaan berat molekul fraksi protein tiap isolat dapat bervariasi bergantung pada protein isoform, reaksi silang dengan antibodi, degradasi protein dan pembelahan nonspesifik proteolitik, fosforilasi, glikosilasi dan glikanasi, serta kompleks protein pada larutan ekstrak. Sedangkan variasi fraksi berat molekul yang didapatkan karena *Outer membrane protein* tersusun atas beberapa struktur yang mempengaruhi sifat antigeniknya. Secara garis besar OMP terbagi atas susunan porin dan non-porin, masing-masing diantaranya memiliki berat molekul yang berbeda. Untuk mengetahui hal tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, disertai dengan identifikasi jenis OMPnya (Singh *et al.*, 2007).