

## BAB 4

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan tipe penelitian eksploratif laboratorium tentang profil struktur protein adhesin pili *Shigella flexneri* dan untuk membuktikan adanya protein hemagglutinin pada berat molekul 49,8 kDa *Shigella flexneri* adalah molekul adhesin dengan metode uji adhesi

#### 4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah bakteri *Shigella flexneri* yang telah dikultur di laboratorium mikrobiologi universitas brawijaya dan hewan coba mencit balb/c betina yang sehat (dengan ciri-ciri mata jernih, bulu tidak berdiri, dan tingkah laku normal), berumur 12 minggu dengan berat badan antara 20-30 gram, yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Biologi, Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Variabel terikat / dependen: indeks adhesi *Shigella flexneri*
- b. Variabel bebas / independen: protein hemagglutinin sub-unit pili 49,8 kDa *Shigella flexneri*

#### 4.4 Lokasi dan Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Desember 2011-Februari 2012.

#### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.5.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang diperlukan antara lain: bakteri *Shigella flexneri*, enterosit (usus halus dan kolon) mencit, media DDT (dithiothreitol), BHI (Brain Heart Infusion) broth, larutan PBS (Phosphat Buffer Saline) pH 7,3 dan 7,4, aquades, dan Duhn Mixer.

##### 4.5.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang dibutuhkan antara lain: eppendorf, mikropipet, sentrifugasi, water bath, kaca objek, mikroskop, yellow tip, blue tip, hand gloves, cawan petri, shaker, dan SDS-PAGE.

#### 4.6 Definisi Operasional

- Protein Hemaglutinin adalah protein yang bisa mengaglutinasi eritrosit. Melalui uji hemaglutinasi (HA) akan dipilih berat molekul protein pili yang dapat mengaglutinasi eritrosit pada titer terendah. Aglutinasi ditandai dengan gambaran yang difus, berkabut pada sumuran *V microplate*. Titer HA merupakan kebalikan dari nilai dilusi tertinggi yang masih dapat menyebabkan hemaglutinasi lengkap. Satu unit HA adalah jumlah minimal bakteri yang dibutuhkan untuk menyebabkan hemaglutinasi lengkap tersebut. Protein heagglutinin terletak pada pili dan OMP.

Merujuk pada penelitian yang dilakukan Anam (2012) protein hemagglutinin *Shigella flexneri* ada pada pili .

- Adhesi *Shigella flexneri* adalah perlekatan ke permukaan enterosit mencit sebagai awal patogenesis infeksi *Shigella flexneri*.
- Indeks adhesi adalah banyaknya bakteri yang melekat pada enterosit dihitung sampai seratus enterosit dan dibuat reratanya.
- Uji adhesi tidak langsung adalah uji dengan menggunakan antibodi yang diambil dari *Shigella flexneri*.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Isolasi protein dari pili *Shigella flexneri* dan OMP dengan SDS PAGE

Prosedur isolasi protein mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh ehara (Ehara et al, 1987). Pili diambil dan dipanen dari suspensi bakteri botol berisi media TCG yang sudah diinkubasikan. Hasil didapatkan dari kumpulan suspensi bakteri tersebut dimasukan dalam botol steril yang berisi dengan Tricorelactic Acid(TCA) sampai konsentrasi mencapai 3%. Setelah itu botol tersebut dishaker selama 1 jam dalam suhu ruangan. Kemudian disentrifugasikan dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 C. Dari hasil sentrifugasi tersebut didapatkan pellet bakteri yang akan dibuang dan dieendapkan lagi dengan larutan 10 ml PBS dengan pH 7,4. Suspensi dari bakteri akan dipotong dengan menggunakan mesin pili cutter. Pemotongan pili akan dilakukan dengan metode omni mixer modification pada suhu 4<sup>o</sup> C. Metode ini terdiri dari 6 siklus yang masing-masing siklusnya memiliki kecepatan yang berbeda-beda yaitu 5000 rpm selama 30 detik; 5000 rpm selama 1 menit; 5000 rpm selama 2 menit; 10000 rpm selama 1 menit; 10000 rpm selama 2 menit; dan

10000rpm selama 2 menit. Setelah setiap satu siklus selesai disentrifugasikan dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang berisi potongan pili dimasukkan ke dalam ependorf. Sisa pelet kemudian dibuat suspensi dengan PBS pH 7,4 dan dilanjutkan pada tahap siklus pemotongan pili selanjutnya. Sampai pada siklus akhir pemotongan pili semua supernatan(pili) disentrifugasi lagi pada kecepatan 12.000rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan berisi fraksi pili tadi dimasukan ke dalam ependorf dan disimpan pada suhu 20° C. Peletnya kemudian dicampur dengan PBS pH 7,4 yang juga mengandung NO G 0,05%. Sampel yang akan dipakai divortex selama 1menit dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Pindahkan supernatan ke dalam ependorf dan simpan dalam suhu 20°C. Pellet dicampur lagi dengan PBS yang mengandung NOG kurang lebih 3 kali lagi dengan supernatan yang telah dipindah ke dalam ependorf yang berbeda setiap kali dan disimpan pada suhu -20°C.

Untuk mengetahui profil berat molekul dari sampel dengan menggunakan metode SDS PAGE (Laemli,1970). Protein sampel dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit di dalam larutan buffer yang mengandung 5mM Tris pH 6.8: 5% mercapto-ethanol, 2,5 w / v sodium dodecyl sulfat, 10% v / v glycerol tracking gel 4%. Tegangan arus listrik yang digunakan sebesar 120 mV. Sebagai media pewarnaan, pemakaian comasie blue disesuaikan dengan standar sigma molecular low range. Setelah selesai menghitung berat molekul, dilanjutkan dengan tahap multiplikasi bakteri dengan metode yang sama selama 6 kali.

Pemurninian protein hemaglutinin pili mengacu pada metode Ehara (Ehara et al ,1987) dengan modifikasi (Sumarno,1991). Hasil dari pengumpulan

pili kemudian dielektroforesis menggunakan metode SDS-PAGE. Hasil dari gel electrophoresis menginterpretasikan profil dari protein pili. Band yang memenuhi kriteria kemudian dipotong supaya hanya menyisakan satu protein band. Band dari gel yang telah dipotong dikumpulkan dan disisipkan dalam suatu membrane tape yang telah diisi dengan buffer yang digunakan dalam electrophoresis. Kemudian tape yang berisi band tersebut dimasukkan ke dalam apparatus electrophoresis horizontal selama 90 menit pada tegangan 120 mV. Setelah itu membrane tape didialisis dengan menggunakan PBS pH 7.4 buffer selama 2x24 jam yang di mana setiap buffer diganti 4 kali.

#### **4.7.2 Induksi dan Koleksi Antibodi IgG *Shigella dysenteriae***

Induksi dan koleksi IgG dilakukan merujuk pada penelitian yang dibuat oleh khoirul anam (Anam, 2012) dan Wiwik Agustina (Agustina, 2012). Preparasi sel enterosit mencit dilakukan dengan mengacu pada metode Weisser (Weisser 1973). Induksi IgG dilakukan dengan hasil konjugasi antara Ag pili 49,8 kDa *S. dysenteriae* ini di larutkan dalam PBS dengan perbandingan 100ug : 100uL. Penyuntikan dilakukan sebanyak dengan regimen satu kali penyuntikan per satu minggu. Pada minggu ke-lima mencit dimatikan dan dilakukan pengambilan serumnya.

Pengambilan serum IgG dilakukan melalui ventrikel kanan jantung mencit. Darah tersebut kemudian dikumpulkan ke dalam tabung steril dan dimasukkan dalam posisi miring selama 30 menit kedalam inkubator bersuhu 37 °C. Setelah itu tabung dimasukkan kedalam lemari pendingin bersuhu 4 °C selama 10 menit. Hasil pendinginan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan hasil sentrifugasi diambil dan

dimasukkan dalam tabung steril, untuk penyimpanan dilakukan dalam suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pada penelitian sebelumnya reaksi silang antibody *S.dysenteriae* dengan protein Shigella spp yang lainya (Anam, 2012).

#### 4.7.3 Isolasi sel enterosit mencit Balb/c

Preparasi sel enterosit mencit dilakukan dengan mengacu pada metode Weisser ( Weisser 1973 ). Dengan perlahan, usus yang kecil dikeluarkan dari tubuh mencit. Usus yang telah diambil dibersihkan dengan menggunakan PBS yang mengandung dithiothreitol 1.0 mM pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Jaringan usus halus diletakan di larutan yang mengandung 1,5 mM KCl, 9,6 mM NaCl, 27,0 sodium citrate, 8,0 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dan 5,6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit dalam mesin shaker dengan pelan. Setelah itu Supernatan dibuang, dan sel dicuci dengan PBS dan disentrifugasi selama 3 kali atau lebih dalam 1500 rpm selama 5 menit dan suspensikan dalam PBS yang mengandung 1% Bovin Serum Albumin (BSA) dalam konsentrasi  $10^6/\text{ml}$ . Selanjutnya jumlah dari enterosit dihitung dengan menggunakan hemocytometer. Enterosit dijaga dalam suhu  $4^{\circ}\text{C}$  untuk dilakukan uji adhesi

#### 4.7.4 Uji adhesi protein pili terhadap sel enterosit mencit

*Shigella flexneri* yang dikultur dalam BHI broth selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dipanen dan dibuat suspense dengan PBS 1% BSA sampai konsentrasinya sekitar  $10^8/\text{ml}$ . Seratus mikroliter suspense dicampurkan dengan 100 ml suspense  $10^6$  sel enterosit mencit per ml di dalam larutan PBS yang mengandung 1% BSA. Campuranya diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit dengan gentle shaking. Kemudian protein non adheren dipisahkan dari bakteri

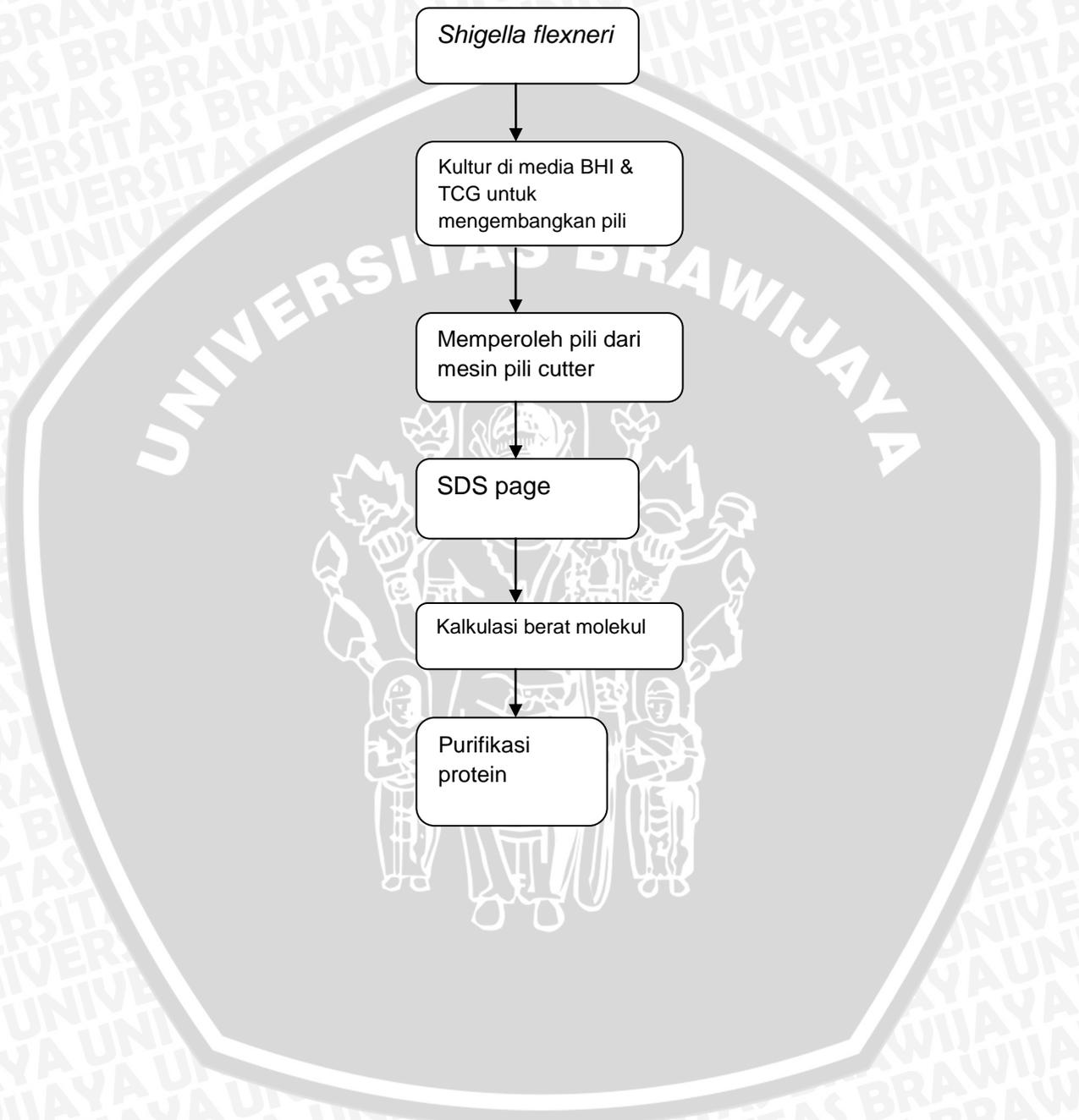
pencucian berulang PBS yang mengandung 1% BSA. Enterosit dikumpulkan dan disentrifugasi dalam kecepatan 1500rpm selama 20 menit dan disuspensi di dalam PBS 300 mikroliter. Sebanyak 20 mikroliter suspensi diekstrak dan dibuat smear pada objek glass kemudian dibuat sediaan dengan pewarnaan gram yang hasilnya dilihat di bawah mikroskop.

#### 4.7.5 Pewarnaan imunositokimia

Pewarnaan imunositokimia dilakukan untuk melihat gambaran dari struktur antigen dari bakteri yang mengadhesi enterosit dengan ikatan antibody. Sediaan diletakan dalam slide kemudian difiksasi dengan methanol ABS lalu cuci dengan larutan PBS pH 7,4 selama 5 menit. Inkubasi dengan FBS 5%; 0,25 Triton X-100 selama 60 menit dalam suhu ruang. Inkubasi dengan antibody primer (1:100) semalam di suhu 4 C. Cuci dengan PBS pH 7,4 3 kali selama 5 menit. Inkubasi dengan antibody sekunder (1:200) selama 60 menit setelah itu cuci dengan PBS pH 7,4. Inkubasi dengan substrat for Ap Conj. 20-30 menit lalu cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit. Berikan counterstain berupa methyl green 0,5% selama 10 menit. Cuci dengan dH<sub>2</sub>O 3 kali 5 menit lalu tiriskan dan mounting selama 10 menit menggunakan gelatin 10%. Selanjutnya lakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop.

#### 4.8 Alur Kerja Penelitian

##### Eksploratif



### Eksperimental

