

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik untuk mengetahui pengaruh kadar glukosa terhadap ekspresi protein AdhO36 (merupakan *Outer Membrane Protein S. Typhi* dengan berat molekul 36 kDa) *S. Typhi*. Pengaruh kadar glukosa ini akan diamati pada lima kelompok perlakuan yang akan diinkubasikan dalam medium Luria Bertani Broth. Masing-masing perlakuan yaitu :

1. Kadar Glukosa 40 mg/100mL
2. Kadar Glukosa 80 mg/100mL
3. Kadar Glukosa 160 mg/100mL
4. Kadar Glukosa 240 mg/100mL
5. Kadar Glukosa 320 mg/100mL

Perbedaan perlakuan kadar glukosa didasarkan pada kadar glukosa normal, kadar hipoglikemia dan kadar hiperglikemia. Kadar glukosa ini mengacu pada Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia yang diterbitkan oleh Perkeni. Kadar glukosa 40 mg/100mL, 80 mg/100mL, 160 mg/100mL, 240 mg/100mL, dan 40 mg/100mL masingmasing mewakili kelompok hipoglikemia, kelompok glukosa darah normal, kelompok pre diabetes melitus, kelompok diabetes melitus, dan kelompok mulai timbulnya komplikasi diabetes melitus.

4.2 Jumlah Pengulangan

Penelitian ini dilakukan empat kali pengulangan berdasarkan rumus :

$$p(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4 \quad (\text{Solimun, 2001})$$

Keterangan : n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan bulan Agustus 2014 sampai Desember 2014.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kadar glukosa pada medium Luria Bertani Broth *S. Typhi*.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah ekspresi protein AdhO36 (OMP dengan berat molekul 36 kDa) *S. Typhi*.

4.5 Definisi Operasional

- Bakteri *S. Typhi* diambil dari stock bakteri *S. Typhi* di Laboratorium Mikrobiologi FKUB yang berasal dari darah penderita demam tifoid di RSU dr. Saiful Anwar Malang.

- Protein AdhO36 adalah *Outer Membrane Protein* (OMP) *S. Typhi* dengan berat molekul sekitar 36 kDa pada SDS-PAGE yang diperoleh dengan cara pemisahan menggunakan SDS terhadap permukaan bakteri *S. Typhi*.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

- Bakteri *S. Typhi*
- Medium pembiakan bakteri : Agar MH (Muller Hinton), medium MacConkey, medium Thiaprolin Carbonate Glutamate (TCG) agar, Bismuth Sulfite Agar (BSA) dan Luria Bertani Broth.
- Pewarna Gram, Reagen Oksidase, Kit *Microbact*, Garam NaCl, Bahan Elektroforesis (SDS-PAGE) (Lampiran), SDS, Phosphat Buffer Saline pH 7,4

4.6.2 Alat Penelitian

Mikroskop, incubator, gelas obyek, otoklaf (Tomy –Autoclave SS 325), Erlenmeyer, pengaduk gelas, tabung reaksi, gelas baker, ose, botol, lampu busen, cawan petri, timbangan analitik, membran dialysis, *magnetic stirrer*, tips, tabung sentrifus (ependorf), 15 ml dan 100 ml, pipet mikro, wadah untuk menyimpan gel hasil elektroforesis, alat elektroforesis vertikal (Bio-Rad Mini Protean), vortex, spektrofotometer (Hitachi U 2000), *refrigerated centrifuge* (Hettich-Mikro 22R), pH meter (Penway-3310), alat *blotting* (Bio-Rad Trans-Blot SD – *Semy-Dry Transfer Cell*).

4.7 Metode Pengumpulan Data

4.7.1 Identifikasi Bakteri *S. Typhi* dan Perlakuan Glukosa

4.7.1.1 Identifikasi Ulang

Identifikasi ulang terhadap bakteri, yang dikerjakan meliputi : pewarnaan Gram, penanaman pada medium diferensial MacConkey dan medium selektif BSA, uji oksidase, dan reaksi biokimiawi menggunakan *Microbact* System.

Spesifikasi	Kriteria Hasil Pengujian
Pewarnaan Gram	Gram negatif, bentuk batang
Medium diferensial MacConkey	Memperlihatkan koloni bulat, tepi tajam, permukaan halus, tidak berwarna, diameter koloni 1-3 mm
Medium BSA	Koloni bulat, tepi tajam, permukaan halus, koloni berwarna hitam pekat (<i>black jet colony</i>), diameter koloni 1-3 mm.
Uji Oksidase	Negatif
<i>Myrobact</i> System	Menunjukkan hasil positif pada : lysine (+), glukosa (+), H ₂ S (+), manitol (+)

Keterangan :

Gram negatif : hasil pewarnaan sel bakteri berwarna merah
 Lysine (+) : perubahan warna medium menjadi kuning (orange)
 Glukosa (+) : perubahan warna medium menjadi kuning (orange)
 H₂S (+) : perubahan warna medium menjadi kehitaman
 Manitol (+) : perubahan warna medium menjadi kuning (orange)

(Kit *Manual Myrobact*; Chapin& Murray, 1999 ; Castilla, *et al.*, 2006)

4.7.1.2 Perbanyakkan Bakteri

Bakteri yang sudah diidentifikasi ditanam di medium Luria Bertani Broth dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam, setelah itu ditanam pada medium MacConkey dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

4.7.1.3 Perlakuan Glukosa

Perlakuan glukosa dilakukan pada medium cair Luria Broth kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam dengan kadar glukosa sesuai dengan masing-masing perlakuan (40mg/100 mL, 80 mg/100 mL, 160 mg/100 mL, 240 mg/100 mL, dan 320mg/100 mL). Masing-masing perlakuan diinkubasikan pada medium cair Luria Bertani Broth 200 mL dengan jumlah bakteri masing-masing perlakuan berasal dari 4 koloni dari 4 plate MacConkey. Biakan bakteri siap dilakukan sentrifugasi untuk diambil pelet bakteri.

4.7.2 Pengambilan Pelete Bakteri *S. Typhi*

- 1) Pada medium cair Luria hasil perlakuan glukosa ditambahkan TCA 3% (200mL Luria + 6 g TCA)
- 2) Dikocok dengan gerakan memutar selama 1 jam
- 3) Dituang pada tabung sentrifugasi dan disentrifugasi 6000 rpm 15 menit pada suhu 4°C
- 4) Prosedur tersebut diulang sampai supernatant jernih
- 5) Setelah jernih supernatant dibuang dan pelete ditambah PBS 5 mL dihomogenkan dengan cara dipipeting
- 6) Suspensi pelete bakteri dimasukkan ke dalam ependorf dan disimpan pada suhu 4°C

4.7.3 Koleksi *Outer Membrane Protein* (OMP)

Proses koleksi OMP meliputi beberapa langkah berikut :

- 1) Pelete disuspensikan dengan PBS yang mengandung SDS 0,05%
- 2) Campuran pelete dan PBS disamakan Optical Densitynya dengan cara spektrofotometri

- 3) Divortex selama 1 menit
- 4) Didiamkan selama 5 menit pada suhu ruang
- 5) Disentrifugasi 12.000 rpm selama 15 menit
- 6) Supernatan diambil (supernatan mengandung OMP)

4.7.4 Elektroforesis OMP untuk Mendapatkan Protein AdhO36 *S. Typhi*

Langkah I Pembuatan Gel

A. *Separating Gel* dan *Stacking Gel*

- 1) Bahan bahan untuk membuat *stacking gel* (Lampiran) dicampur pada gelas plate
- 2) Bahan bahan untuk membuat *separating gel* (Lampiran) dicampur pada gelas plate
- 3) Masing-masing campuran ditambah APS dan temed sebagai katalisator
- 4) Campuran bahan *separating gel* dituang pada set kaca
- 5) Ditunggu hingga konsistensinya seperti jelly atau tidak cair lagi
- 6) Campuran bahan *stacking gel* dituang pada set kaca di atas permukaan *separating gel* yang sudah membentuk jelly
- 7) Ditunggu hingga konsistensinya seperti jelly atau tidak cair lagi

Langkah II *Sample Running*

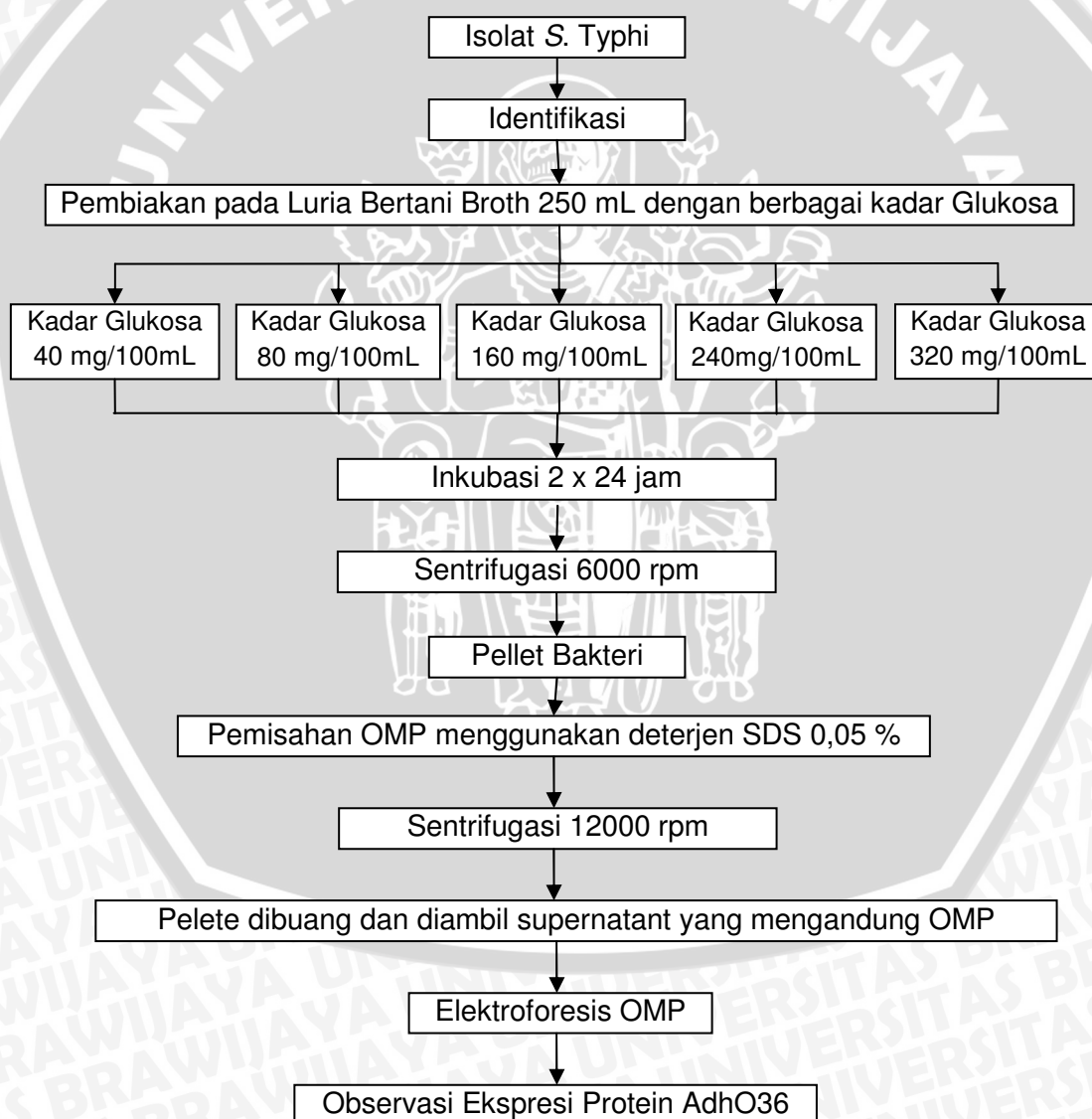
- 1) Siapkan protein yang akan dilakukan *running* (20 μ L) ditambahkan RSB (Reducing Sample Buffer) dengan perbandingan 1 : 1
- 2) Panaskan protein + RSB dalam air mendidih selama 10 menit untuk menonaktifkan enzim dan memutus rantai polimer protein.
- 3) Masukkan sampel dalam sumur gel SDS-PAGE sebanyak 20 μ L
- 4) *Running* elektroforesis pada 200 V selama 45 menit.

- 5) Ambil gel dan dilakukan pewarnaan dengan *commassie blue* selama satu malam. Zat pewarna dibersihkan kemudian dilakukan pelunturan pewarnaan dengan menggunakan larutan *destaining*.

4.7.5 Penilaian Ekspresi protein AdhO36 *S. Typhi*

Penilaian terhadap ekspresi protein AdhO36 dilakukan dengan cara melihat perbedaan ketebalan pita pada hasil pemeriksaan elektroforesis.

4.7.6 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian

4.8 Pengolahan Data

Ketebalan pita protein dibaca dengan menggunakan program Corel Photo-Pain 11 sehingga bisa dikonversi ke dalam angka. Hasil berupa data numerik selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan metode *Oneway-ANOVA* pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$)

