

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

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

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah bakteri *Shigella sonnei* yang telah dipanen 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 sonnei*.
- b. Variabel bebas / independen: protein hemagglutinin sub-unit pili 49,8 kDa *Shigella sonnei*.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan 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 sonnei*, 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

- Adhesi *Shigella sonnei* adalah perlekatan ke permukaan enterosit mencit sebagai awal patogenesis infeksi *Shigella sonnei*.
- Protein Hemagglutinin 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 sonnei* ada pada pili .

- 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 sonnei*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Kultur Bakteri

Bakteri yang digunakan berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sediaan berupa cairan dari bakteri akan dikultur di media Salmonella-Shigella Agar (SSA), dalam suhu 37° C selama 24 jam. Media TCG digunakan untuk memperbanyak pertumbuhan pili dari bakteri *Shigella sonnei*. Medium ini terdiri dari 0,02 thioproline: 0,3% NaHCO₃, 0,1% mono sodium l-glutamate, 1% baktorypton, 0,2% ekstrak yeast, 0,5% NaCl: 2% bacto agar and ethylene tetraacetic acid (EGTA) (Ehara *et al.*, 1989). Media dibuat menggunakan 250 ml botol, yang dituang ke 15 botol dan dikeringkan dalam suhu 15° C. Setiap botol diisi dengan 50 ml medium TCG. *Shigella sonnei* akan dipanen dengan prosedur yang disebutkan dan dikultur pada cawan petri yang berisi medium MacConkey untuk multiplikasi dan diinkubasi dalam suhu 37° C selama 24 jam. Setelah dikultur dalam MacConkey sampel diberi 10 ml larutan PBS dengan pH 7,4 kemudian dipanen dengan cara pengerokan supaya terbentuk suspensi. Suspensi yang sudah terbentuk diambil dan dimasukkan dalam botol yang mengandung 1000 ml Brain Heart Infussion (BHI). Botol kemudian dishaker selama 30 menit di waterbath dalam suhu 37° C. Pada akhirnya didapatkan suspensi bakteri 10 ml bakteri yang dimasukkan pada masing-masing botol yang berisi media TCG dan kemudian diinkubasi dalam suhu 37° C selama 2x24 jam.

4.7.2 Isolasi Protein Pili *Shigella Sonnei*

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^o 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^o 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 10000 rpm selama 2 menit. Setelah setiap satu siklus selesai disentrifugasikan dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 menit pada suhu 4^o 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 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4^o C. Supernatan berisi fraksi pili tadi dimasukan ke dalam ependorf dan disimpan pada suhu 20^o C.

4.7.3 SDS-PAGE

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.

Pemurnian 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.

4.7.4 Induksi dan Koleksi Antibodi IgG *Shigella dysentriae*

Induksi dan koleksi IgG dilakukan merujuk pada penelitian yang dibuat oleh khoiril 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

Shigella dysenteriae ini di larutkan dalam PBS dengan perbandingan 100 ug : 100 uL. Penyuntikan dilakukan pada 5 ekor mencit dengan dosis masing-masing 200 uL (Protein 49,8 kDa 500 ul + 500 uL Complete Adjuvan) pada minggu pertama. Pada minggu kedua sampai keempat dilakukan penyuntikan dengan dosis masing-masing 200 uL (Protein 49,8 kDa 500 ul + 500 uL Incomplete Freund's Adjuvan) disetiap minggunya. Pada minggu ke-lima dilakukan pengambilan serum pada mencit.

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° C.

4.7.5 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° C. Jaringan usus halus diletakan di larutan yang mengandung 1,5 mM KCl, 9,6 mM NaCl, 27,0 sodium citrate, 8,0 mM KH₂PO₄, dan 5,6 mM Na₂HPO₄ dan diinkubasi pada suhu 37° 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 10⁶/ml. Selanjutnya jumlah

dari enterosit dihitung dengan menggunakan hemocytometer. Enterosit dijaga dalam suhu 4° C untuk dilakukan uji adhesi.

4.7.6 Uji Adhesi Protein Pili terhadap Sel Enterosit Mencit

Shigella sonnei yang dikultur dalam BHI broth selama 24 jam pada suhu 37° C dipanen dan dibuat suspensi dengan PBS 1% BSA sampai konsentrasinya sekitar 10⁸/ml. Seratus mikroliter suspensi dicampurkan dengan 100 ml suspensi 10⁶ sel enterosit mencit per ml di dalam larutan PBS yang mengandung 1% BSA. Pili diambil dan dipanen dari suspensi bakteri botol berisi media TCG yang sudah diinkubasikan. Hasil yang didapatkan dari kumpulan suspensi bakteri tersebut dimasukkan ke dalam botol steril yang berisi dengan Tricorelactic Acid (TCA) sampai konsentrasi mencapai 3% lalu digoyang selama 1 jam dalam suhu ruangan. Kemudian disentrifugasikan dengan kecepatan 6.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4° C. Dari hasil sentrifugasi tersebut didapatkan pellet bakteri yang akan dibuang dan diendapkan lagi dengan larutan 10 ml PBS dengan pH. Suspensi dari bakteri akan dipotong dengan menggunakan mesin *pili cutter*. Kemudian protein *non adheren* dipisahkan dari bakteri dengan pencucian berulang PBS yang mengandung 1% BS. Untuk mengetahui profil berat molekul dari sampel digunakan 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% 7,4A. Hasil dari gel elektroforesis 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 elektroforesis. Kemudian

tape yang berisi band tersebut dimasukkan ke dalam apparatus elektroforesis 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. Dilusi dari sampel dibuat pada V microplate di mana setiap sumur memiliki volume 50 ml. Setiap sumur diisi dengan suspensi darah mencit dengan kadar 0,5 volume dan dikocok menggunakan *rotator plate* selama 1 menit. Setelah itu plate diletakkan pada suhu ruang selama 1 jam. Enterosit dikumpulkan dan disentrifugasi dalam kecepatan 1.500 rpm selama 20 menit dan disuspensi di dalam PBS 300 μ l sel enterosit mencit per ml di dalam larutan PBS yang mengandung 1% BSA. Campurannya diinkubasi pada suhu 37^o C selama 30 menit dengan *gentle shaking*. Sebanyak 20 μ l suspensi diekstrak dan dibuat smear pada objek glass kemudian dibuat sediaan dengan pewarnaan gram yang hasilnya dilihat di bawah mikroskop.

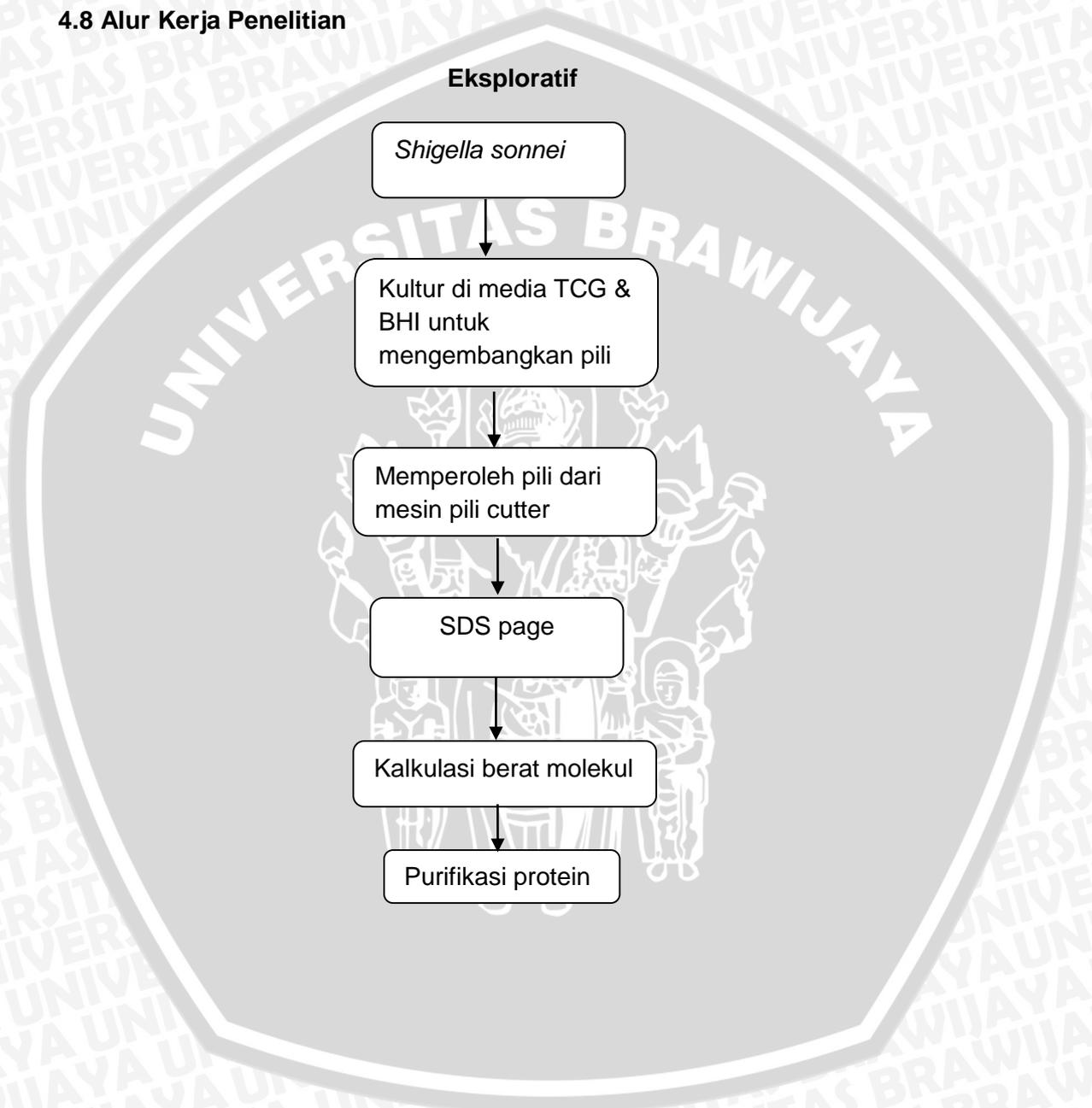
4.7.7 Pewarnaan Imunositokimia

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^o 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 *Alkaline Phospatase Conjugate* 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 H₂O 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



Eksperimental