

**KARAKTERISASI PROTEIN ISOLAT KLINIK *Escherichia coli*
RESISTEN AMPISILIN DENGAN ELEKTROFORESIS GEL
POLIAKRILAMID**

SKRIPSI



**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
Y O G Y A K A R T A
JUNI 2006**

**KARAKTERISASI PROTEIN ISOLAT KLINIK *Escherichia coli*
RESISTEN AMPISILIN DENGAN ELEKTROFORESIS GEL
POLIAKRILAMID**

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)
Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia Yogyakarta**



Oleh :

LULUK SETIYANINGSIH

01613168

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
Y O G Y A K A R T A
JUNI 2006**

SKRIPSI

**KARAKTERISASI PROTEIN ISOLAT KLINIK *Escherichia coli*
RESISTEN AMPISILIN DENGAN ELEKTROFORESIS GEL
POLIAKRILAMID**

Yang diajukan oleh :

LULUK SETIYANINGSIH

01613168

Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



Sri Mulyaningsih, M.Si., Apt.



Rochmy Istikharah, S.Farm., Apt.

SKRIPSI

**KARAKTERISASI PROTEIN ISOLAT KLINIK *Escherichia coli*
RESISTEN AMPISILIN DENGAN ELEKTROFORESIS GEL
POLIAKRILAMID**

Oleh :

**LULUK SETIYANINGSIH
01613168**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal: 19 Juni 2006

Ketua Penguji,


Sri Mulyaningsih, M.Si., Apt

Anggota Penguji,

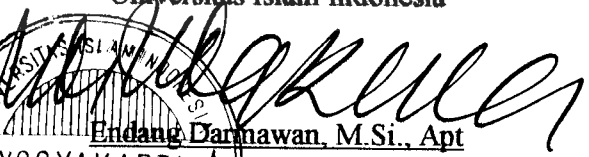

Rochmy Istikharah, S.Farm., Apt

Anggota Penguji,


Dr. Ediatj Sasmito, Apt

Mengetahui

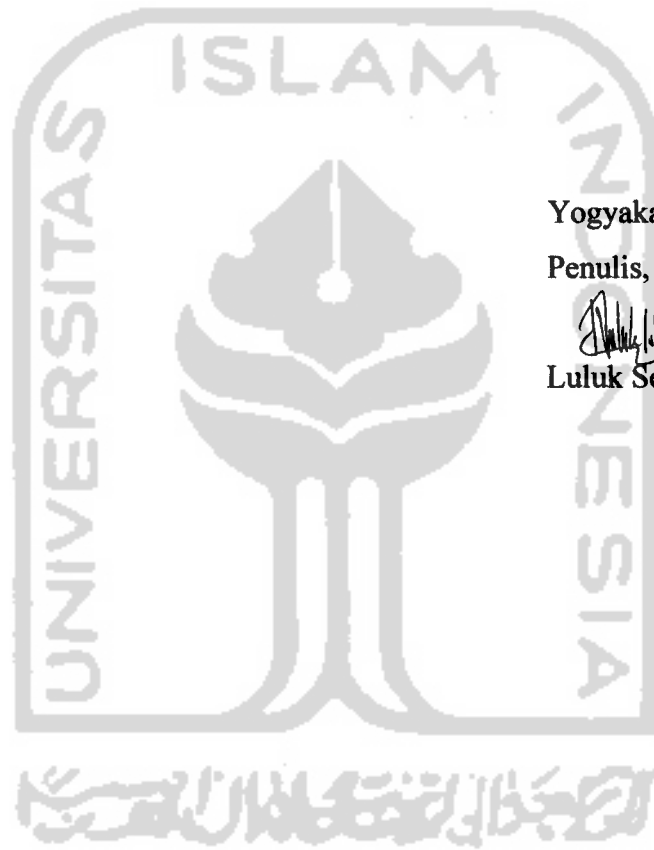
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia


Endang Darmawan, M.Si., Apt



PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.



Yogyakarta, Juni 2006

Penulis,

Luluk Setyaningsih

PERSEMBAHAN
ALHAMDULILLAH, PERTAMA RASA TERIMAKASIHKU
UNTUK ALLAH SWT YANG TELAH MEMBERIKAN
RAHMAT DAN NIKMAT-NYA SEHINGGA SKRIPSI
INI BISA TERSELESAIKAN JUGA.
KUPERSEMBAHKAN KARYA KECILKU INI UNTUK :

« Bapak dan ibu tercinta sebagai orang tua dan sahabat terbaikku, terima kasih atas doa, kasih sayang, dan pengorbanannya selama ini

« Mbak Darni, Yang telah banyak memberikan motivasi dan semangat dalam memaknai hidup

« Mas Iwan, tempat berbagi suka dukaku, terima kasih atas perhatian dan chaynya sampai saat ini.....

« Sis n Rahmis, yang selalu membantu dan memberi semangat ma aq, Makasih bgt ya prend

« Tuks semua temen2 yang tidak bisa aq sebutin satu persatu tengkyu Ya...

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Kata mutiara

Teruslah mempunyai impian namun jangan sampai

terbuai

oleh arus impian itu terlalu dalam

Dan percayalah bahwa Allah tidak akan memberi cobaan

bagi umat-Nya melebihi kemampuannya sendiri

Tiada warna yang lebih cerah melebihi hidup dengan

berjuta impian keberhasilan....

Tidak semua yang kita inginkan bisa kita dapatkan,

karena Allah lebih tahu apa yang kita inginkan.

Tidak disebut kaya karena banyak hartanya, tetapi

yang disebut kaya (yang sebenarnya) adalah kekayaan

jiwa

(HR. Bukhori Muslim).

KATA PENGANTAR



Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas limpahan rahmat, hidayah dan segala karuniaNya, sehingga penyusunan skripsi dengan judul “**KARAKTERISASI PROTEIN ISOLAT KLINIK *Escherichia coli* RESISTEN AMPISILIN DENGAN ELEKTROFORESIS GEL POLIAKRILAMID**” dapat terselesaikan dengan baik. Skripsi ini disusun guna melengkapi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.

Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis telah banyak memperoleh bantuan, dorongan dan pengarahan dari berbagai pihak. Oleh karena itu tiada lain yang dapat penulis sampaikan selain ucapan terima kasih yang tulus kepada :

1. Sri Mulyaningsih, M.Si., Apt, selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah banyak memberikan dorongan, arahan serta bimbingan demi sempurnanya skripsi ini.
2. Rochmy Istikharah, S.Farm., Apt, selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah memberikan bimbingan, saran dan kritik hingga terselesaikannya skripsi ini.
3. Dr. Ediati Sasmito, Apt selaku Dosen Penguji yang telah memberikan masukan, saran dan kritik hingga terselesaikannya skripsi ini.
4. Endang Darmawan, M.Si., Apt, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Farmasi Universitas Islam Indonesia.
5. Seluruh staf laboratorium Universitas Islam Indonesia atas kesabaran dan keikhlasannya.
6. Serta semua karyawan Universitas Islam Indonesia yang telah banyak membantu.

Penulis menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik serta saran yang bersifat membangun. Harapan penulis semoga penelitian ini dapat memperkaya ilmu pengetahuan khususnya farmasi. Amin.

Wassalamu'alaikum wr. Wb.



Yogyakarta, Juni 2006

Penulis

DAFTAR ISI

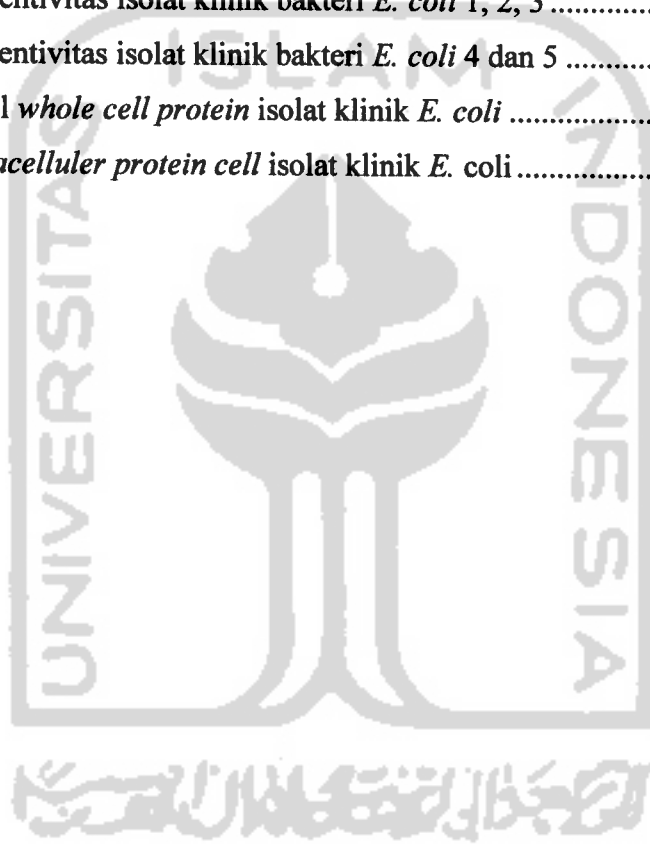
| | |
|---|------|
| KATA PENGANTAR | i |
| DAFTAR ISI | iii |
| DAFTAR GAMBAR | v |
| DAFTAR TABEL | vi |
| INTISARI | vii |
| ABSTRACT | viii |
| BAB I. PENDAHULUAN | |
| A. Latar Belakang Masalah | 1 |
| B. Perumusan Masalah | 3 |
| C. Tujuan Penelitian | 3 |
| BAB II. STUDI PUSTAKA | 4 |
| A. Tinjauan Pustaka | 4 |
| 1. Uraian tentang bakteri <i>E.coli</i> | 4 |
| 2. Resistensi sel mikroba..... | 5 |
| 3. Protein | 8 |
| 4. Ampisilin..... | 9 |
| 5. SDS-PAGE..... | 10 |
| B. Hipotesis..... | 12 |
| BAB III. METODE PENELITIAN | 13 |
| A. Bahan dan Alat..... | 13 |
| 1. Bahan | 13 |
| 2. Alat | 13 |
| B. Cara Penelitian | 14 |
| 1. Uji sensitivitas antibiotik..... | 14 |
| 2. Ekstrasi protein sel menurut metode (Saçilik <i>et al.</i> , 2000) | 14 |
| 3. Ekstrasi protein filtrat..... | 14 |
| 4. Pemisahan protein dengan SDS-PAGE | 15 |
| C. Analisis Hasil | 15 |

| | |
|---|-----------|
| BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN | 17 |
| A. Hasil Uji Sensitivitas Antibiotik | 17 |
| B. Hasil Pemisahan Protein Dengan SDS-PAGE | 20 |
| BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN..... | 26 |
| A. Kesimpulan..... | 26 |
| B. Saran..... | 26 |
| DAFTAR PUSTAKA | 27 |
| LAMPIRAN | 29 |



DAFTAR GAMBAR

| | |
|--|----|
| Gambar 1. Mekanisme resistensi suatu mikroba | 7 |
| Gambar 2. Protein yang diikat SDS | 11 |
| Gambar 3. Migrasi polipeptida dalam gel poliakrilamida | 11 |
| Gambar 4. Skema kerja elektroforesis gel poliakrilamid..... | 16 |
| Gambar 5. Uji sentivitas isolat klinik bakteri <i>E. coli</i> 1, 2, 3 | 18 |
| Gambar 6. Uji sentivitas isolat klinik bakteri <i>E. coli</i> 4 dan 5 | 18 |
| Gambar 7. Profil <i>whole cell protein</i> isolat klinik <i>E. coli</i> | 22 |
| Gambar 8. <i>Extracelluler protein cell</i> isolat klinik <i>E. coli</i> | 22 |



DAFTAR TABEL

| | |
|--|----|
| Tabel I. Hasil uji sensitivitas Isolat klinik bakteri <i>E. coli</i> | 19 |
| Tabel II. Berat molekul <i>Whole Cell Protein</i> | 23 |
| Tabel III. Berat molekul <i>Extracellular Protein</i> | 24 |



KARAKTERISASI PROTEIN ISOLAT KLINIK *Escherichia coli* RESISTEN AMPISILIN DENGAN ELEKTROFORESIS GEL POLIAKRILAMID

INTISARI

Suatu rumah sakit di Yogyakarta menunjukkan bahwa sebagian besar *E. coli* yang diisolasi dari pasien telah resisten terhadap ampisilin. Protein-protein *E. coli* yang resisten ampisilin dapat diketahui dengan menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui *whole cell protein* dan protein ekstraseluler pada isolat klinik bakteri *E. coli* yang resisten terhadap ampisilin yang dibandingkan dengan *E. coli* ATCC 35218 serta untuk mengetahui perbedaan pola protein antar strain *E. coli* yang resisten ampisilin. Langkah pertama yang dilakukan dalam penelitian yaitu uji sensitifitas bakteri *E. coli* resisten ampisilin terhadap antibiotik ampisilin, tetrasiklin, amoksisilin, sulfametoksazol dan gentamisin. Selanjutnya bakteri dibiakkan dalam media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan diinkubasi selama 24 jam 37°C, setelah itu kultur disentrifus sehingga didapatkan ekstraksi protein sel dan ekstraksi protein filtrat yang dilanjutkan dengan SDS-PAGE. Dari hasil penelitian diketahui bahwa pada isolat klinik bakteri *E. coli* yang resisten terhadap ampisilin setelah dipisahkan dengan SDS-PAGE ternyata menunjukkan perbedaan antara pola *whole protein cell* dan protein ekstraseluler dengan *E. coli* ATCC 35218. Pada pola *whole protein cell* terjadi penurunan jumlah *band* sedangkan pada protein ekstraseluler terjadi peningkatan jumlah *band*.

Kata kunci: Resistensi, *Escherichia coli*, *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

**CHARACTERIZATION OF PROTEIN CLINIC ISOLATE *Escherichia coli*
AMPICILIN RESISTANT BY POLYACRYLAMIDE GEL
ELECTROFORESIS**

ABSTRACT

A hospital in Yogyakarta indicate that most *E. coli* insulated from patient have resist to ampicillin. Protein *E. coli* which resist to ampicillin knowable by using *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Intention of this research that is to know the whole cell protein and extracellular protein of isolat bacterium clinic *E. coli* resist to ampicillin which is compared to *E. coli* ATCC 35218 and also to know the difference of protein pattern among the strain *E. coli* resist to ampicillin. First step performed within research that is test the sensitivity bacterium *E. coli* resist ampicillin to antibiotic ampicillin, tetracycline, amoxicillin, sulfamethoxazol and gentamicin. From fifth of isolat clinic *E. coli* resist ampicillin after conducted by test of antibiotic sensitivity, there is an isolat clinic *E. coli* which sensitive to all tested antibiotic. Step hereinafter bacterium breded in Brain Heart Infusion (BHI) of media and incubated during 24 hours at temperature 37°C. Afterwards centrifused culture so that we got cell protein and filtrat protein extraction, and finally we continued with SDS-PAGE. From result of the research we know that *E. coli* which resist to ampicillin in clinic isolate after separated with SDS-PAGE showed difference between whole protein cell and extracellular ptein with *E. coli* ATCC 35218. In whole protein cell decrease band amount was happened but extracellular protein band amount increased.

Keyword: Resistant, *E. coli*, *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Antibiotik termasuk kelompok obat yang paling sering dan terbanyak digunakan dalam pengobatan infeksi. Penggunaan antibiotik yang terus menerus meningkat dan tidak terkendali dengan baik dapat mengakibatkan timbulnya strain kuman yang resisten terhadap berbagai jenis antibiotik. Menurut *World Health Organisation* (WHO), meluas dan timbulnya strain bakteri yang resisten terhadap antibiotik sekarang ini menjadi permasalahan kesehatan di seluruh dunia, terutama di negara-negara berkembang (Nakajima, 1996).

Berbagai antibiotik yang dahulu efektif membunuh mikroorganisme penyebab infeksi, perlahan-lahan mulai menunjukkan pengurangan efektivitas dan akhirnya tidak efektif sama sekali. Resistensi terhadap antibiotik mendorong munculnya antibiotik generasi baru yang pada gilirannya menimbulkan masalah tersendiri, yaitu pada pemilihan jenis dan strategi penggunaannya. Penggunaan antibiotik secara hati-hati perlu dilakukan dalam mengatasi suatu penyakit atau infeksi. Penting untuk menggunakan antibiotik yang berspektrum sempit terhadap patogen target yang spesifik. Perlunya diadakan pengujian terhadap antibiotik-antibiotik untuk mengetahui efektivitas dari masing-masing jenis antibiotik dalam mengatasi suatu penyakit atau infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme tertentu. Dengan pemakaian antibiotik yang tepat kiranya dapat mencegah terjadinya bakteri yang multiresisten (Nakajima, 1996).

Rumah sakit sebagai sarana umum di bidang kesehatan merupakan tempat berkumpulnya orang sakit dan orang sehat sehingga menjadi tempat yang potensial untuk berkembangnya penyakit. Antibiotik dan senyawa antimikroba lainnya merupakan jenis obat yang paling banyak digunakan di rumah sakit. *Escherichia coli* merupakan patogen yang banyak tersebar di alam dan diketahui dapat menyebabkan infeksi nosokomial. Penyakit yang disebabkan oleh *E. coli* ini misalnya diare, infeksi saluran kemih, enteritis, pneumonia, dan meningitis (Nakajima, 1996).

Dari penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *E. coli* telah banyak yang resisten terhadap pemberian antibiotik ampisilin. Penelitian Indrayani (2004) dan Elsanovedya (2004) menunjukkan bahwa sebagian besar *E. coli* yang diisolasi dari pasien suatu rumah sakit di Yogyakarta telah resisten dengan ampisilin. Ini berarti *E. coli* akan dapat bertahan dengan pemberian ampisilin sehingga penyakit yang disebabkan oleh *E. coli* jika diberi ampisilin tidak sembuh. Masalah resistensi ini tentunya akan menimbulkan permasalahan dalam bidang pengobatan penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri ini. Untuk dapat menyembuhkan penyakit yang disebabkan oleh *E. coli* ini dibutuhkan antibiotik yang kekuatannya lebih besar dibanding ampisilin.

Perlu kiranya diketahui bagaimana *E. coli* ini membentuk resistensi terhadap ampisilin dan antibiotik yang lain. Kemungkinan besar *E. coli* resisten disebabkan oleh inaktivasi struktur antibiotik secara enzimatik. Sebagai langkah awal perlu diketahui pola protein bakteri untuk mengetahui mekanisme resistensi dihubungkan dengan tingkat resistensi terhadap antibiotik yang lain. Adanya perbedaan pola protein pada *E. coli* yang resisten terhadap antibiotik ini dapat diketahui dengan memisahkan protein sel utuh sel bakteri yang resisten karena enzim umumnya merupakan protein.

Beberapa metode digunakan untuk *typing* isolat *E. coli* ini. Analisis profil protein sel utuh dengan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) akhir-akhir ini telah digunakan sebagai metode yang berguna untuk identifikasi spesies *Staphylococcus* dan *Bacillus*. SDS-PAGE dari *whole cell protein* juga dapat digunakan untuk *typing Staphylococci*. Disisi lain adanya pola pita protein antar bakteri dalam satu spesies dapat ditunjukkan dengan SDS-PAGE (Clink and Pennington, 1987; Çökmüs and Yousten, 1994).

B. Perumusan Masalah

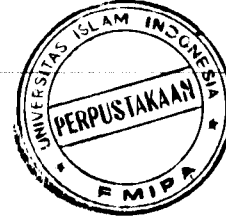
1. Apakah isolat *E. coli* yang resisten terhadap ampisilin menunjukkan pola *whole protein cell* dan protein ekstraseluler yang berbeda dibandingkan dengan *E. coli* ATCC 35218 jika dipisahkan dengan SDS-PAGE ?
2. Apakah antar strain isolat *E. coli* yang resisten terhadap ampisilin menunjukkan pola protein yang berbeda dengan SDS-PAGE ?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan

1. Untuk mengetahui pola protein (*Whole protein cell*) dan protein ekstraseluler pada isolat klinik bakteri *E. coli* yang resisten terhadap ampisilin dibandingkan dengan bakteri *E. coli* ATCC 35218 dengan menggunakan SDS-PAGE.
2. Untuk mengetahui perbedaan pola protein antar strain *E. coli* yang resisten ampisilin menggunakan SDS-PAGE.

BAB II
STUDI PUSTAKA
A. Tinjauan Pustaka



1. *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah bakteri berbentuk batang pendek, gram negatif yang dapat membentuk rantai. Dalam pembiakan yang tidak cocok terjadi bentuk filamen yang panjang, jarang terdapat kapsul, terjadi pergerakan pada beberapa strain. Bakteri membentuk koloni yang bulat konfeks dan dapat memecahkan karbohidrat dengan membentuk asam dan gas, menghasilkan karbondioksida dan hidrogen.

Sebagian besar merupakan flora normal pada usus. Di dalam usus umumnya bakteri ini tidak menyebabkan penyakit malahan dapat membantu fungsi normal dan nutrisi. Organisme ini menjadi patogen hanya bila mencapai jaringan di luar dari saluran cerna khususnya saluran kemih, saluran empedu, paru-paru, peritoneum atau selaput otak yang akan menyebabkan terjadinya peradangan pada organ-organ tersebut. *E. coli* dapat menyebabkan diare dengan beberapa mekanisme (Jawetz *et al.*, 1996).

Sistematika *E. coli* adalah sebagai berikut :

| | |
|------------|--|
| Divisi | : Protophyta |
| Sub divisi | : Schizomycetes |
| Bangsa | : Eubacteriales |
| Suku | : Enterobacteriaceae |
| Marga | : <i>Escherichia</i> |
| Jenis | : <i>Escherichia coli</i> (Salle, 1961). |

E. coli dan sebagian besar bakteria enterik yang lain membentuk koloni bulat, cembung serta lembut dengan tepi yang berbeda. Kultur dalam media diferensial

yang berisi bahan warna khusus dan karbohidrat seperti *Eosin Methylene Blue* (EMB), Mc. Conkey, atau media deoksikholat dapat membedakan koloni yang memfermentasi laktosa (berwarna) dengan koloni yang tidak memfermentasi laktosa (tidak berwarna) dan memungkinkan identifikasi yang cepat dari bakteri enterik. *E. coli* menghasilkan tes positif terhadap indole, lisin dekarboksilase, memfermentasi manitol dan menghasilkan gas dari glukosa. Isolasi dari air seni dapat dengan cepat diidentifikasi sebagai *E. coli* karena hemolisis dalam agar darah dan mempunyai morfologi yang khas pada media Mc. Conkey (Jawetz *et al.*, 1996).

Infeksi klinis terjadi biasanya disebabkan *E. coli*, tetapi bakteri enterik lain merupakan penyebab dari infeksi yang terjadi di rumah sakit dan kadang-kadang menyebabkan infeksi yang diperoleh di komunitas. Bakteri menjadi patogen ketika mereka mencapai jaringan intestinal normal atau tempat flora normal yang kurang umum. Tempat yang sering mengalami infeksi klinis adalah pada saluran air kemih, sistem biliary dan tempat lain dalam rongga perut tetapi beberapa tempat anatomi (bakterimia, kelenjar prostat, paru-paru, tulang, meningen) dapat menjadi tempat infeksi. *E. coli* dapat menyebabkan infeksi sistem saluran kencing, penyakit diare, sepsis dan meningitis pada neonatus. Sulfonamida, ampisilin, sefalosporin, fluorokuinolon dan aminoglikosida mempunyai efek antibakterimia terhadap bakteri enterik, tetapi variasi kerentanan sangat penting (Jawetz *et al.*, 1996).

2. Resistensi Sel Mikroba

Resistensi sel mikroba ialah suatu sifat tidak terganggunya kehidupan sel mikroba oleh antimikroba. Sifat ini dapat merupakan suatu mekanisme alamiah untuk bertahan hidup. Menurut Ganiswarna *et al.*, (1995) dikenal tiga pola resistensi dan sensitivitas mikroba terhadap antimikroba yaitu:

Pola I : Belum pernah terjadi resistensi bermakna yang menimbulkan kesulitan di klinik. Contoh *Streptococcus pyogenes* group A terhadap penisilin G.

Pola II : Pergeseran dari sifat peka menjadi kurang peka, tetapi tidak sampai terjadi resistensi sepenuhnya.

Pola III : Sifat resistensi pada tingkat tinggi, sehingga menimbulkan masalah di klinik (Ganiswarna *et al.*, 1995).

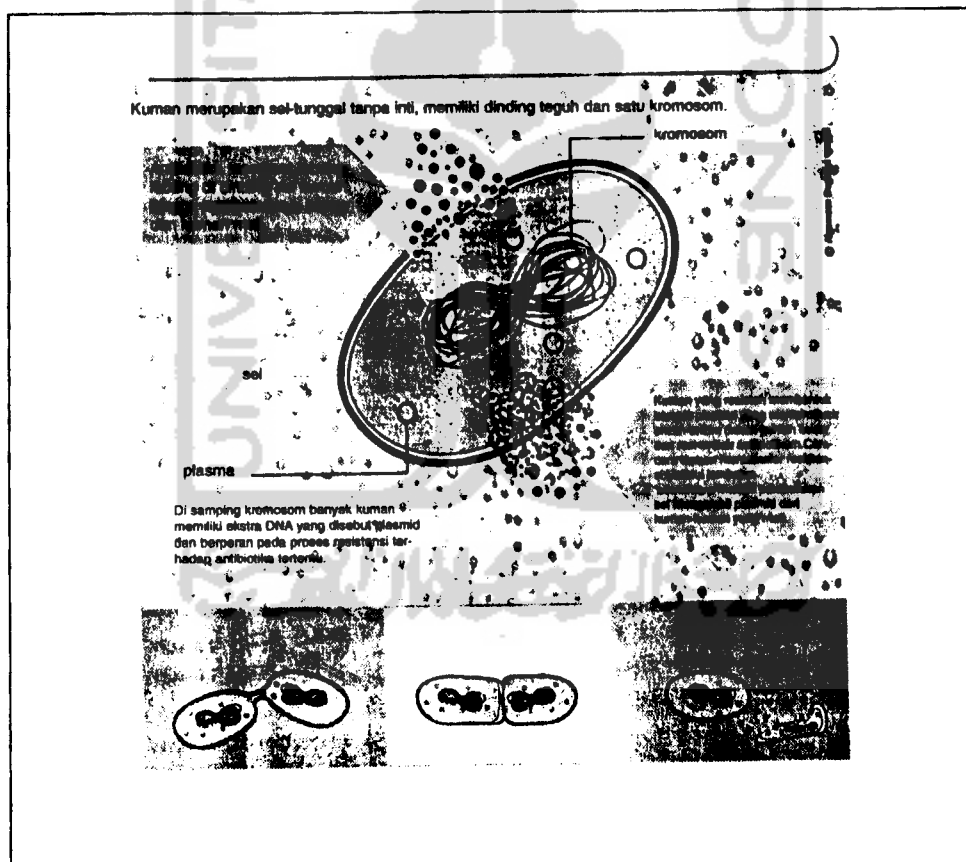
Mikroba yang semula peka terhadap suatu antimikroba, dapat berubah sifat genetiknya menjadi tidak atau kurang peka. Perubahan sifat genetik terjadi karena kuman memperoleh elemen genetik yang membawa sifat resisten, keadaan ini dikenal sebagai resistensi didapat (*acquired resistance*). Elemen resisten ini dapat diperoleh dari luar dan disebut resistensi yang dipindahkan (*transferred resistance*), dapat pula terjadi akibat adanya mutasi genetik spontan atau akibat rangsang antimikroba (*induced resistance*) (Ganiswarna *et al.*, 1995).

Menurut Tjay dan Rahardja (2002), ada lima mekanisme kerja antibiotika dalam penghambatan sintesa materi penting dari bakteri yaitu dengan cara:

- a. Dinding sel: sintesanya terganggu sehingga menjadi kurang sempurna dan tidak tahan terhadap tekanan osmotis dari plasma sehingga akan pecah. Contohnya: kelompok penisilin dan sefalosporin.
- b. Membran sel: molekul lipoprotein dari membran plasma (didalam dinding sel) dikacaukan sintesanya, sehingga menjadi lebih permeabel. Hasilnya, zat-zat penting dari isi sel dapat merembas keluar. Contohnya: polipeptida dan polyen (nistatin, amfoterisin) dan imidazol (mikonazol, ketokonazol, dan lain-lain).
- c. Protein sel: sintesanya terganggu, misalnya kloramfenikol, tetrasiklin, aminoglikosida, dan makrolida.
- d. Asam-asam inti (DNA, RNA); rifampisin (RNA), asam nalidiksat dan kinolon, IDU, dan asiklovir (DNA).
- e. Antagonisme saingan. Obat menyaingi zat-zat yang penting untuk metabolisme kuman hingga pertukaran zatnya terhenti, antara lain sulfonamid, trimetoprim, PAS, dan INH (Tjay dan Rahardja, 2002).

Penggunaan antibiotika harus cukup lama agar menjamin semua parasit benar-benar mati dan menghindarkan kambuhnya penyakit. Lazimnya terapi diteruskan sampai 2-3 hari setelah gejala hilang. Untuk pengobatan penyakit tertentu perlu dilanjutkan lebih lama, misalnya tifus, malaria, TBC, dan endocarditis, bahkan pada lepra yang kadang sampai seumur hidup (Tjay dan Rahardja, 2002).

Penggunaan antibiotika yang sembarangan atau tidak tepat (skema) dosisnya dapat mengakibatkan kegagalan terapi. Disamping itu juga dapat menimbulkan bahaya seperti sensitasi, resistensi, dan supra infeksi. Mekanisme resistensi suatu mikroba dapat dilihat pada gambar 1.

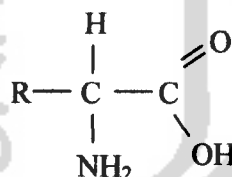


Gambar 1. Mekanisme resistensi suatu mikroba (Tjay dan Rahardja, 2002)

Terjadinya resistensi dapat dikurangi dengan cara (1) mencegah pemakaian antibiotik tanpa pembedaan pada kasus-kasus yang tidak membutuhkannya, (2) menghentikan penggunaan antibiotik pada infeksi biasa atau sebagai obat luar, (3) menggunakan antibiotik yang tepat dan dengan dosis yang tepat pula agar infeksi cepat sembuh, (4) menggunakan kombinasi antibiotik yang telah terbukti keefektifannya, (5) menggunakan antibiotik yang lain jika ada tanda-tanda bahwa suatu organisme akan menjadi resisten terhadap antibiotik yang digunakan semula (Pelczar dan Chan, 1988).

3. Protein

Protein adalah suatu polipeptida yang terdiri atas lebih dari seratus asam amino. Protein mempunyai molekul besar dengan berat molekul bervariasi antara 5000 sampai jutaan. Dengan cara hidrolisis oleh asam atau oleh enzim, protein akan menghasilkan asam-asam amino. Ada 20 jenis asam amino yang terdapat dalam molekul protein. Asam-asam amino ini terikat satu dengan lain oleh ikatan peptida. Protein mudah dipengaruhi oleh suhu tinggi, pH dan pelarut organik (Poedjiadi, 1994).



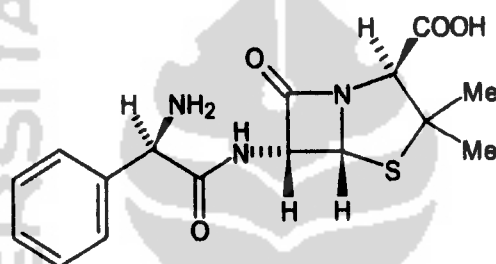
R adalah rantai cabang

Struktur asam amino

Protein merupakan kelompok senyawa yang terbesar terdapat sebagai biomolekul, yaitu sekitar 50 % berat kering senyawa organik total terdapat dalam sel. Ditinjau dari fungsi biologinya dikenal ada berbagai macam kelompok protein, misalnya sebagai enzim, hormon, protein pengangkut, protein pembangun dan masih banyak lagi fungsi yang lain. Dengan cara pengelompokan yang lain dapat ditemukan: (1) kelompok protein sederhana, yaitu yang hanya tersusun atas unit-unit polipeptida saja dan (2) protein majemuk, yang tersusun atas senyawa protein dengan karbohidrat atau lipida (glukoprotein dan lipoprotein) (Wongsosupantio, 1991).

Berdasarkan bentuknya dikenal protein globular yang bentuknya bulat atau lonjong dan protein fibrous, berbentuk serabut. Aplikasi teknik elektroforesis terhadap protein ialah pemisahan, pemurnian, uji kemurnian, bahkan penentuan bobot molekul protein yang unit-unit polipeptida penyusun protein. Enzim yang memiliki struktur protein atau senyawa protein adalah termasuk dalam kelompok biomolekul yang memerlukan elektroforesis sebagai sarana penentuan strukturnya. Ini dapat dimaklumi karena protein tersusun atas asam amino yang pada pH sekitar 7 merupakan ion berkutub ganda atau bersifat ion zwitter (Wongsosupantio, 1991).

4. Ampisilin



$C_{16}H_{19}N_3O_4S$

BM 349,40

69-53-4

(2S,5R,6R)-6-[(R)-2-amino-2-phenylacetamidol]-3,3-dimetil-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid (Anonim, 2001).

Ampisilin merupakan turunan pertama 6-aminopenisilanat yang dapat bekerja terhadap bakteri Gram positif seperti *Staphylococcus*, *Streptococcus*, dan juga terhadap bakteri Gram negatif seperti *Escherchia coli* atau *Proteus*. Karena itulah ampisilin disebut penisilin spektrum luas. Terhadap beberapa mikroba Gram positif, ampisilin kurang berkhasiat dibandingkan penisilin G atau penisilin oral. Kuman yang resisten terhadap ampisilin adalah *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus vulgaris* dan *Mycoplasma*. Karena tidak stabil terhadap penisilinase, ampisilin juga resisten terhadap kuman pembentuk penisilinase (Mutschler, 1986).

Ampisilin merupakan golongan penisilin yang mempunyai struktur β -laktam yang bertanggung jawab atas kerja antibiotika β -laktam, sehingga struktur ini juga yang berperan dalam mekanisme resistensi dengan cara inaktivasi oleh β -laktamase. β -laktamase merupakan enzim yang dibentuk oleh sejumlah bakteri, sehingga dengan terbukanya cincin β -laktam, maka kerja antibakteri dari ampisilin akan hilang (Mutschler, 1986).

Ampisilin merupakan antibiotik yang sering digunakan untuk mengatasi infeksi, antara lain dari saluran cerna dan saluran kemih, kuping (*otitis media*), gonore, kulit, dan bagian lunak (otot, dan sebagainya) (Tjay dan Rahardja, 2002). Disamping reaksi alergi yang umumnya timbul pada semua penisilin, ampisilin sering kali menimbulkan *eksantema makulopapulosa* (Mutschler, 1986).

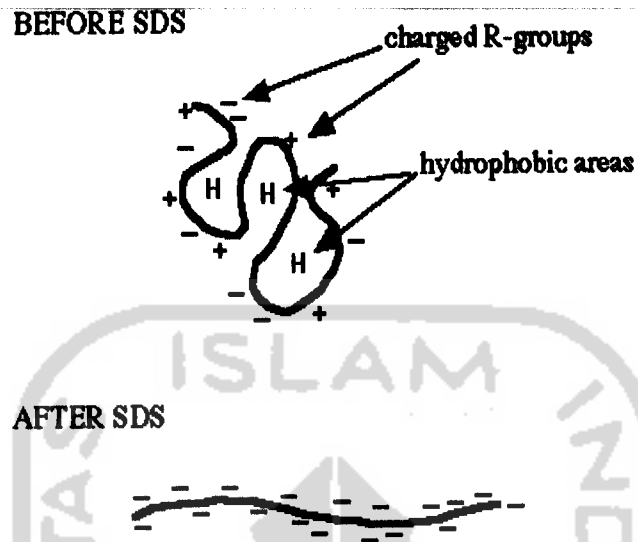
5. Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Akhir-akhir ini teknik elektroforesis banyak digunakan untuk menentukan kemurnian protein, karena pengerjaannya mudah, harga alatnya relatif murah dan hasilnya cukup baik. Cara elektroforesis juga dapat digunakan untuk menentukan bobot molekul protein yang hasilnya dapat disamakan dengan ultrasentrifugal (Wongsosupantio, 1991).

Teknik elektroforesis yang lazim digunakan untuk maksud tersebut adalah dengan gel poliakrilamida. Gel poliakrilamida bersifat stabil dan mempunyai afinitas yang besar terhadap air, sehingga cocok sekali untuk medium elektroforesis. Ada dua macam sistem elektroforesis gel akrilamida, yaitu:

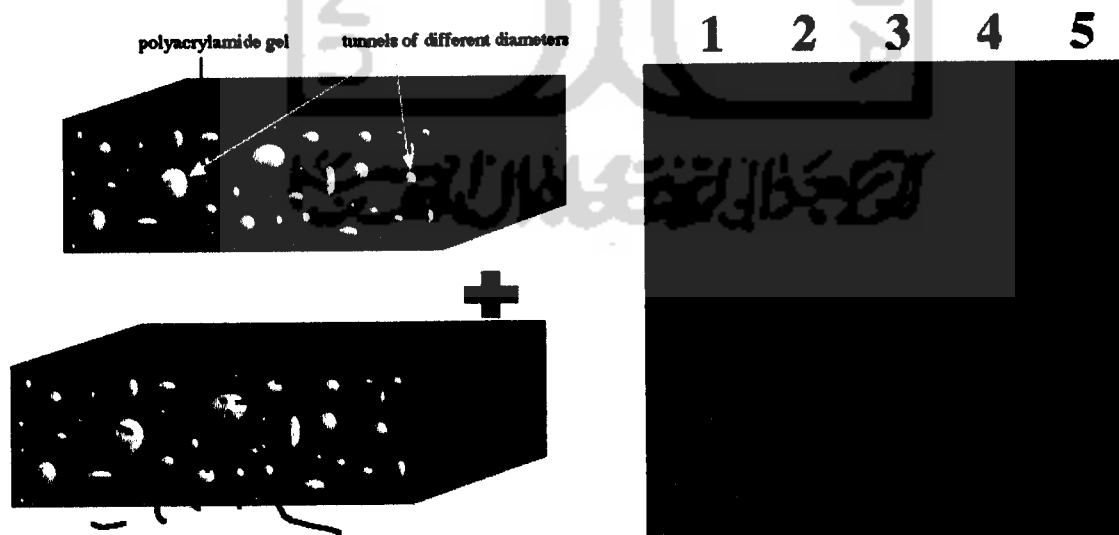
1. Sistem disk gel poliakrilamida (*discontinuos- gel electrophoresis*) dan
2. SDS gel elektroforesis (*Sodium Dodecyl Sulphate gel electrophoresis*) (Wongsosupantio, 1991).

Pada cara SDS gel elektroforesis, protein dibuat terdenaturasi dengan menambahkan suatu senyawa tiol. Disini struktur kuaterner protein diurai menjadi unit rantai polipeptida yang menjadi bermuatan negatif karena mengikat SDS, seperti pada gambar 2 berikut:



Gambar 2. Protein yang diikat oleh SDS (Rybicki *and* Purves, 2006)

Selain itu pada elektroforesis senyawa SDS-poliipeptida akan bergerak ke katoda yang kecepatannya bergantung pada bentuk dan besarnya poliipeptida. Poliipeptida yang besar akan mengalami penahanan yang besar pula, karena adanya gesekan dengan dinding lorong yang ada dalam gel poliakrilamid. Hal ini dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Migrasi poliipeptida dalam gel poliakrilamida (Rybicki *and* Purves, 2006)

B. Hipotesis

Dengan dipisahkannya protein sel bakteri *E. coli* menggunakan SDS-PAGE maka akan diketahui pola protein bakteri yang resisten dibandingkan dengan isolat *E. coli* ATCC 35218. Juga dapat diketahui apakah antar strain pada *E. coli* yang resisten menunjukkan pola protein sel yang berbeda. Adanya perbedaan protein pada bakteri yang resisten dan ATCC mengindikasikan adanya protein yang terlibat dalam mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotik. Penelitian lebih lanjut dapat dilakukan untuk mengisolasi *band* protein yang berbeda ini sebagai upaya untuk mengetahui tentang mekanisme resistensi bakteri *E. coli* terhadap antibiotik.



BAB III

METODE PENELITIAN

A. Bahan Dan Alat

1. Bahan

- a. Bahan utama adalah isolat klinik bakteri *Escherichia coli* yang resisten terhadap ampisilin.
- b. Bahan untuk uji sensitivitas isolat bakteri *Escherichia coli* yaitu akuades steril, media *Brain Heart Infusion* (BHI), media agar Muller Hinton, ampisilin, amoksisilin, tetrasiklin, gentamisin, sulfametoksazol.
- c. Bahan untuk isolasi *whole cell protein* dan protein ekstraseluler yaitu kultur isolate *E. coli*, kultur *E. coli* ATCC 35218, kultur *S. aureus* ATCC 25923.
- d. Bahan untuk elektroforesis yang digunakan adalah *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS), akrilamida, bis-akrilamida, tris, *N,N,N',N'-Tetramethylethylene Diamine* (TEMED), Amonium per sulfat (APS), glisin, merkaptoetanol, *bromofenol blue* R-250, methanol, butanol, kloroform, asam asetat glasial, *Comassie Blue*, akuades.

2. Alat

- a. Alat untuk uji sensitivitas antibiotik, yang digunakan adalah autoklaf (All American), inkubator (Memmert), petri disk, cotton buds, penjepit, lampu Bunsen.
- b. Alat yang digunakan untuk isolasi *whole cell protein* dan protein ekstraseluler yaitu sentrifus (Hitachi), shaker (GFL), tabung eppendorf, mikropipet (Finn), alat- alat gelas (Pyrex), penangas air.
- c. Alat untuk elektroforesis yang digunakan adalah mini protein kit (Bio Rad), yellow tip, blue tip, white tip, mikropipet (Finn), alat- alat gelas (Pyrex).

B. Cara Penelitian

1. Uji sensitifitas antibiotik

Uji sensitifitas antibiotik dilakukan dengan metode difusi agar berdasarkan pedoman *National Committee Clinical Laboratory Standard/ NCCLS* (1997) yaitu, beberapa koloni kuman ditumbuhkan selama 24 jam pada media agar. Kemudian diambil dan disuspensikan kedalam 0,5 ml BHI cair, diinkubasi 5-8 jam pada suhu 37°C. Suspensi ditambah akuades steril hingga kekeruhan sesuai dengan standar konsentrasi bakteri 10⁸ CFU/ml. Kapas lidi dicelupkan dalam suspensi bakteri kemudian ditekan pada dinding tabung hingga kapasnya tidak terlalu basah, kemudian dioleskan pada permukaan media agar, selanjutnya diletakkan disk yang mengandung antibiotik. Diinkubasi pada 24 jam pada 37°C.

2. Ekstraksi protein sel dilakukan dengan menggunakan metode Saçilik *et al.*, (2000) yang dimodifikasi

Isolat bakteri ditanam pada media *Brain Heart Infusion* (BHI), satu koloni disuspensikan pada *BHI broth*. Sampel diinkubasi selama 24 jam pada 37°C kemudian disentrifus 10 menit 4000 rpm. Sel bakteri kemudian dicuci 3 kali dengan menggunakan akuades steril. Pellet sel yang didapat ditambah 25 µl *SDS sample buffer* (0,625 ml 1,5 M Tris pH 8,8; 0,5 g SDS; 0,25 mg *Bromophenol Blue*; 1,25 ml Merkptoetanol; 2,5 ml Gliserin dan dilarutkan dalam akuades sampai 5 ml). Kemudian dimasukkan dalam air mendidih selama 5 menit agar protein terdenaturasi. Protein kemudian disentrifus kembali selama 5 menit pada 4000 rpm dan supernatan yang didapat dikumpulkan pada tabung eppendorf dan disimpan pada suhu 0°C sampai elektroforesis dilakukan.

3. Ekstraksi protein filtrat

Berdasarkan metode Saçilik *et al.*, (2000) yang dimodifikasi. Sebanyak 600 µl supernatan kultur, ditambah dengan 400 µl metanol, 200 µl kloroform dan 300 µl akuades dicampur dan disentrifus selama 10 menit pada 4000 rpm. Bagian atas (supernatan) diambil dan ditambah dengan 300 µl metanol kemudian distirer dan

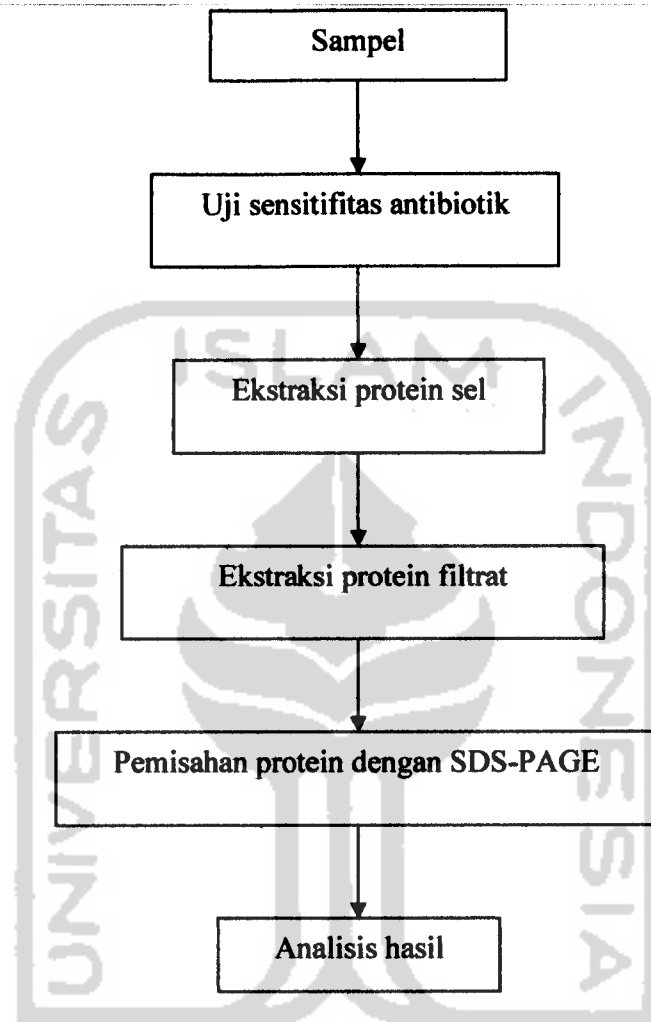
disentrifus lagi selama 10- 15 menit pada 4000 rpm. Endapan (pellet) diambil lalu dikeringanginkan, setelah itu ditambah 25 μ l SDS *sample buffer* (0,625 ml 1,5 M tris pH 8,8; 0,5 g SDS; 0,25 mg *bromofenol blue*; 1,25 ml merkaptoetanol; 2,5 ml gliserin dan dilarutkan dalam akuades sampai 5 ml) dan dimasukkan dalam air mendidih selama 5 menit agar protein terdenaturasi.

4. Pemisahan protein dengan SDS-PAGE

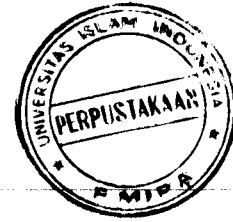
Protein yang telah didenaturasi dianalisis dengan SDS-PAGE menurut Saçilik *et al.*, (2000). Metode ini menggunakan 4 % *acrylamide stacking gel* (0,325 ml akrilamida 30 %, 0,625 ml 0,5 M tris pH 6,8, 25 μ l SDS 10 %, 1,25 μ l TEMED, 12,5 μ l dan aquades 1,525 ml) dan 12% *acrylamide separating gel* (2 ml akrilamida 30 %, 1,25 ml 1,5 M tris pH 8,8, 50 μ l SDS 10 %, 2,5 μ l TEMED, 25 μ l dan aquades 1,675 ml). Protein yang telah terdenaturasi kemudian dimasukkan kedalam sumuran gel poliakrilamid, selanjutnya gel dijalankan dengan arus konstan 80 volt sampai *bromophenol blue* mencapai dasar. Gel kemudian dicat dengan *Coomassie Brilliant Blue R 250* (sigma). Sigma marker digunakan sebagai standar berat molekul dalam SDS-PAGE.

C. Analisis hasil

Hasil uji kepekaan berupa diameter hambatan bakteri *E.coli* terhadap beberapa bakteri yang diuji dibandingkan dengan standar NCCLS, dikategorikan tingkat sensitif, intermediet atau resisten. Hasil pemisahan protein dengan SDS-PAGE akan diperoleh *band*/ pita pola protein. Pola pita protein dari bakteri *E. coli* resisten ampisilin dibandingkan dengan *E. coli* ATCC 35218. Bakteri dianalisis antara *band* dengan pola resistensi.



Gambar 4. Skema kerja elektroforesis gel poliakrilamid



BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Uji Sensitivitas Isolat Klinik Bakteri *Escherichia coli*

Uji sensitivitas isolat klinik bakteri *E. coli* ini bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri yang akan digunakan dalam penelitian sesuai dengan yang dikehendaki (resisten) atau tidak (sensitif). Isolat klinik bakteri *E. coli* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Sebelum dilakukan uji sensitivitas isolat klinik bakteri *E. coli*, bahan dan alat yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu. Sterilisasi ini bertujuan untuk membunuh semua mikroorganisme yang ada, sehingga dapat mencegah terjadinya kontaminasi dan mikroorganisme yang ditumbuhkan nanti benar-benar mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian. Alat yang digunakan untuk sterilisasi ini adalah autoklaf pada temperatur 121°C selama 15-20 menit.

Setelah semua bahan dan alat yang akan digunakan steril maka langkah selanjutnya yaitu memasukkan bahan dan alat kedalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang juga telah disterilkan sebelumnya dengan cara menyalakan Sinar UV dan *Blower* selama 10-15 menit dan membersihkan ruangan dalam LAF dengan alkohol 76 % agar kondisi tetap aseptis. Kemudian uji sensitivitas antibiotik dilakukan dengan metode difusi agar berdasarkan pedoman *National Committee Clinical Laboratory Standard/ NCCLS* (1997) yaitu, beberapa koloni kuman ditumbuhkan selama 24 jam pada media agar. Kemudian diambil dan disuspensikan kedalam 0,5 ml BHI cair, diinkubasi 5-8 jam pada suhu 37°C. Suspensi ditambah akuades steril hingga kekeruhan sesuai dengan standar konsentrasi bakteri 10⁸ CFU/ml. Kapas lidi dicelupkan dalam suspensi bakteri kemudian ditekan pada dinding tabung hingga kapasnya tidak terlalu basah, kemudian dioleskan pada permukaan media agar, selanjutnya diletakkan disk yang mengandung antibiotik. Diinkubasi selama 24 jam pada 37°C.

Hasil uji sensitivitas antibiotik dapat diketahui dengan mengukur diameter hambatannya, seperti pada gambar 5 dan gambar 6.



Gambar 5. Uji sensitivitas isolat klinik bakteri *E. coli* 1, 2, 3

Keterangan

- 1= Isolat klinik *E. coli* R1 (Resisten 1)
- 2= Isolat klinik *E. coli* R2 (Resisten 2)
- 3= Isolat klinik *E. coli* S3 (Sensitif 3)



Gambar 6. Uji sensitivitas isolat klinik bakteri *E. coli* 4 dan 5

Keterangan

- 4= Isolat klinik *E. coli* R4 (Resisten 4)
- 5= Isolat klinik *E. coli* R5 (Resisten 5)

Berdasarkan pada gambar uji sensitivitas isolat klinik bakteri *E. coli* 1, 2, 3, 4 dan 5 diatas, maka tingkat resistensi dari isolat klinik bakteri *E. coli* tersebut dapat diketahui dengan cara mengukur diameter hambatan disekitar disk antibiotik standar. Diameter hambatan yang yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan standar NCCLS sehingga tingkat sensitivitas dari masing-masing isolat dapat ditentukan apakah termasuk tingkat resisten atau sensitif terhadap disk antibiotik yang diujikan. Hasil uji sensitivitas antibiotik dapat dilihat pada tabel I.

Tabel I. Hasil Uji Sensitivitas Isolat Klinik Bakteri *E. coli*

| No. | Jenis Isolat | Diameter hambatan (mm) | | | | |
|-----|-------------------|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | AMP | AML | TE | SXT | CN |
| 1. | <i>E. coli</i> R1 | - (R) | - (R) | 5,70 (R) | - (R) | 18,70 (R) |
| 2. | <i>E. coli</i> R2 | 9,52 (R) | 8,84 (R) | 26,7 (S) | 30,10 (S) | 21,30 (S) |
| 3. | <i>E. coli</i> S3 | 22 (S) | 29,60 (S) | 23,44 (S) | 27,30 (S) | 19,00 (S) |
| 4. | <i>E. coli</i> R4 | - (R) | - (R) | 6,82 (R) | - (R) | 7,60 (R) |
| 5 | <i>E. coli</i> R5 | - (R) | - (R) | - (R) | - (R) | 22,60 (S) |

Keterangan

| | | | |
|-----|-------------------|---|---------------------------|
| AMP | : ampisilin | R | : Resisten |
| AML | : amoksisilin | S | : sensitif |
| TE | : tetrasiklin | - | : tidak ada zone hambatan |
| SXT | : sulfametoksazol | | |
| GN | : gentamisin | | |

Tabel I mengindikasikan bahwa isolat *E. coli* R1, R2, R4 dan R5 semuanya bersifat resisten terhadap ampisilin. Umumnya isolat yang resisten terhadap ampisilin juga resisten terhadap amoksisilin yang juga termasuk dalam golongan antibiotik yang sama yaitu antibiotik β -laktam turunan penisilin. Sementara isolat klinik *E. coli* S3 yang sensitif terhadap ampisilin juga masih sensitif terhadap amoksisilin, juga masih sensitif terhadap antibiotik yang diujikan. Hal ini disebabkan bahwa semua antibiotik golongan penisilin mekanisme kerjanya menghambat biosintesis dinding sel, sehingga isolat bakteri *E. coli* yang resisten terhadap ampisilin juga resisten

terhadap amoksisilin. Begitu juga sebaliknya isolat *E. coli* yang sensitif terhadap ampisilin juga sensitif terhadap amoksisilin.

Isolat *E. coli* R1 dan R4 bersifat resisten terhadap semua antibiotik yang diujikan, sedangkan isolat *E. coli* R5 masih sensitif terhadap gentamisin. Karena gentamisin mekanisme kerjanya mengganggu sintesa protein sel yang berada didalam sel, sehingga kemungkinan terjadinya resistensi kecil. Isolat *E. coli* R2 hanya resisten terhadap ampisilin dan amoksisilin. Ini berarti isolat *E. coli* R2 sensitif terhadap tetrasiklin, sulfametoksazol dan gentamisin. Hal ini disebabkan karena gentamisin, sulfametoksazol dan tetrasiklin bersifat bakteriostatik yaitu antibiotik yang kerjanya menghambat pertumbuhan bakteri bukan membunuh bakteri. Selain itu tetrasiklin dan gentamisin juga menghambat sintesa protein sedangkan sulfametoksazol mengganggu lipoprotein dari membran plasma (didalam dinding sel).

Dari kelima isolat klinik bakteri *E. coli* resisten ampisilin ini ternyata setelah dilakukan uji sensitivitas antibiotik tidak semuanya resisten terhadap ampisilin, ada satu isolat klinik bakteri *E. coli* yang sensitif terhadap ampisilin juga sensitif terhadap antibiotik yang lain yaitu isolat *E. coli* S3, sehingga isolat klinik bakteri *E. coli* yang digunakan dalam penelitian ini tidak semuanya resisten terhadap ampisilin karena ada satu isolat klinik bakteri *E. coli* S3 yang ternyata sensitif terhadap ampisilin juga antibiotik lain yang digunakan dalam penelitian ini.

B. Pemisahan Protein Dengan SDS-PAGE

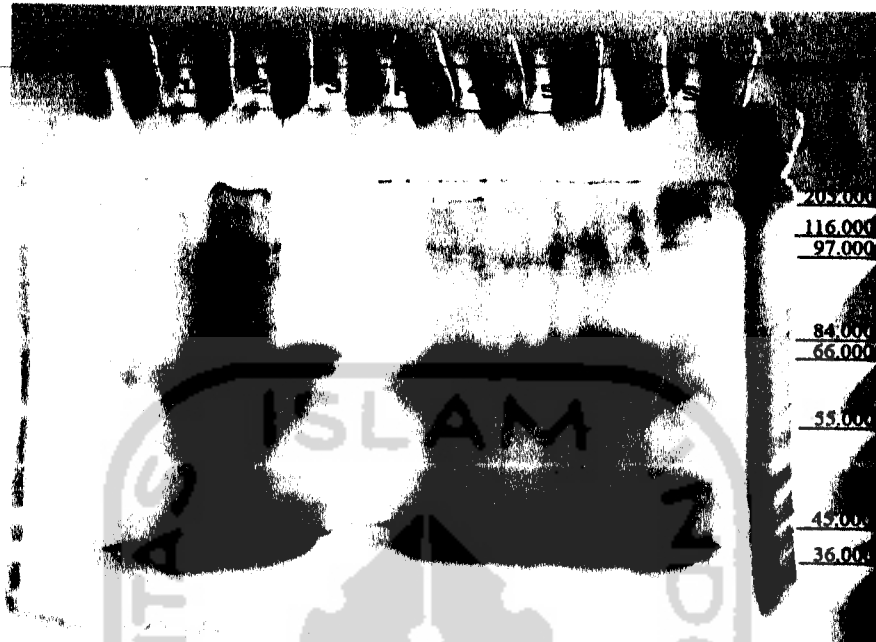
Setelah uji sensitivitas isolat klinik bakteri *E. coli* dilakukan, maka langkah selanjutnya yaitu pemisahan protein dengan SDS-PAGE. Sebelum protein dipisahkan dengan SDS-PAGE sebelumnya dilakukan preparasi dan pembuatan SDS-PAGE terlebih dahulu. Gel SDS-PAGE dibuat dengan mereaksikan akrilamid dan bis akrilamid yang dibantu oleh senyawa inisiator yaitu Amonium Persulfat (APS). Karena monomer akrilamid maupun bis akrilamid yang bekerja sebagai pembuat silang sebenarnya cukup stabil dalam penyimpanan, bahkan bila saling tercampur, sehingga reaksi polimerisasi akan terjadi bila ada senyawa radikal atau senyawa inisiator maka digunakanlah APS. Karena APS merupakan inisiator pembentuk

senyawa radikal bebas, maka dibutuhkan suatu senyawa yang dapat berfungsi sebagai katalis polimerisasi yaitu *N, N, N, N Tetrametil Etilendiamin (TEMED)*.

Dalam elektroforesis gel poliakrilamid, gel yang dibuat dapat diatur kadarnya dengan cara mengubah kadar bis akrilamidnya. Kadar bis akrilamid yang rendah akan membuat gel mempunyai pori-pori besar, sehingga dapat digunakan untuk memisahkan molekul yang besar serta dapat mengurangi gesekan antara molekul yang besar dengan pori gel. Sebaliknya gel yang mempunyai kadar bis akrilamid yang besar maka akan mempunyai pori-pori gel yang kecil, sehingga dapat digunakan untuk penyaring makromolekul. Senyawa akrilamid dan bis akrilamid merupakan senyawa yang bersifat toksis untuk syaraf sehingga perlu dihindari kontak dengan kulit pada waktu pengerjaannya.

Setelah pembuatan gel poliakrilamid dilakukan, maka langkah selanjutnya yaitu mendenaturasikan protein dengan cara penambahan SDS *Sample buffer*. Selain untuk mendenaturasikan protein, SDS *Sample buffer* juga berfungsi untuk memudahkan sampel dimasukkan ke dalam sumuran gel poliakrilamid. Selanjutnya yaitu mengalirkan arus listrik dengan bantuan *Running buffer*, sehingga protein dapat bermigrasi.

SDS PAGE yang digunakan terbuat dari *stacking gel 4%* dan *resolving gel 12%*. Fungsi *stacking gel* untuk mempermudah sampel dari sumuran menuju *resolving gel* dimana pada gel ini sebenarnya terjadi pemisahan protein berdasarkan pada berat molekulnya. Protein dengan BM kecil akan mudah menerobos gel sehingga bermigrasi jauh dari sumuran semula, demikian sebaliknya protein yang mempunyai BM besar tidak akan jauh bermigrasi. BM dari suatu protein dapat ditentukan dengan membandingkan protein marker. Protein yang dipisahkan dengan SDS PAGE akan tampak sebagai pita/ *band* setelah diwarnai dengan *staining solution* yang mengandung *Commassie blue*. Setelah diwarnai dengan *staining solution* diberi perlakuan *destaining solution* untuk mencuci *staining solution*, sehingga tampak *band* protein pada gel seperti gambar 7 dan 8.



Gambar 7. Profil *Whole Cell Protein* isolat klinik *E. coli*



Gambar 8. *Extracellular Protein Cell* isolat klinik *E. coli*

Keterangan

1 = *E. coli* R1
 2 = *E. coli* R2
 3 = *E. coli* S3
 4 = *E. coli* R4

5 = *E. coli* R5
 P = Protein marker
 A = *E. coli* ATCC 35218
 S = *S. aureus* ATCC 25923

Berdasarkan pada band/ pola pita protein pada gambar 7 dan gambar 8 maka dapat ditentukan berat molekul dari isolat klinik bakteri *E. coli* resisten ampisilin yang dibandingkan dengan protein marker. Untuk *profil whole cell protein* isolat klinik *E. coli* resisten ampisilin didapatkan *band* dari suatu protein dengan berat molekul seperti pada tabel II. Sedangkan pada protein ekstraseluler juga didapatkan *band* dari suatu protein dengan berat molekul seperti pada tabel III.

Tabel II. Berat molekul *whole cell protein* isolat klinik *E. coli* resisten ampisilin

| Ukuran Molekul(KDa) | Jenis Isolat | | | | | | |
|---------------------|--------------|-------|-------|-----|-------|-------|---------------|
| | Ec R1 | Ec R2 | Ec S3 | PM | Ec R4 | Ec R5 | Ec ATCC 35218 |
| <i>Band 1</i> | 205 | 201 | 197 | 205 | 198 | 209 | 205 |
| <i>Band 2</i> | 110 | 116 | 112 | 116 | 116 | 112 | 127 |
| <i>Band 3</i> | 107 | 109 | 99 | 97 | 107 | 96 | 111 |
| <i>Band 4</i> | 106 | 99 | 96 | 84 | 102 | 71 | 105 |
| <i>Band 5</i> | 84 | 96 | 60 | 66 | 88 | 69 | 97 |
| <i>Band 6</i> | 68 | 57 | 55 | 55 | 54 | 52 | 62 |
| <i>Band 7</i> | 45 | 42 | 21 | 45 | 41 | 40 | 60 |
| <i>Band 8</i> | 19 | 28 | 12 | 36 | 18 | 18 | 58 |
| <i>Band 9</i> | - | - | - | - | - | - | 56 |
| <i>Band 10</i> | - | - | - | - | - | - | 48 |
| <i>Band 11</i> | - | - | - | - | - | - | 24 |
| <i>Band 12</i> | - | - | - | - | - | - | 8 |

Keterangan

- Ec : *Escherchia coli*
- PM : Protein marker
- R : Resisten
- S : Sensitif

Tabel III. BM *Extracellular Protein Cell* isolat klinik *E. coli* resisten ampisilin

| Ukuran Molekul(KDa) | Jenis Isolat | | | | | | |
|---------------------|--------------|-------|-------|-----|-------|-------|---------------|
| | Ec R1 | Ec R2 | Ec S3 | PM | Ec R4 | Ec R5 | Ec ATCC 35218 |
| <i>Band 1</i> | 208 | 117 | 92 | 205 | 60 | 97 | 56 |
| <i>Band 2</i> | 131 | 105 | 37 | 116 | 56 | 56 | 53 |
| <i>Band 3</i> | 114 | 91 | - | 97 | 36 | 53 | 42 |
| <i>Band 4</i> | 106 | 58 | - | 84 | - | 43 | 36 |
| <i>Band 5</i> | 104 | 56 | - | 66 | - | 36 | - |
| <i>Band 6</i> | 70 | 54 | - | 55 | - | - | - |
| <i>Band 7</i> | 59 | 43 | - | 45 | - | - | - |
| <i>Band 8</i> | 52 | 36 | - | 36 | - | - | - |

Keterangan

- Ec : *Escherchia coli*
 PM : Protein marker
 R : Resisten
 S : Sensitif

Berdasarkan tabel II dan tabel III dapat diketahui bahwa jumlah *band* pada isolat klinik bakteri *E. coli* yang resisten terhadap ampisilin dengan *E. coli* ATCC 35218 berbeda, pada *whole cell protein* isolat klinik bakteri *E. coli* yang resisten terhadap ampisilin mempunyai delapan *band* sedangkan *E. coli* ATCC 35218 mempunyai dua belas *band*. Pada protein ekstraseluler jumlah *band* pada isolat klinik bakteri *E. coli* yang resisten ampisilin ada delapan *band* kecuali *E. coli* R4 yang mempunyai tiga *band* dan *E. coli* R5 yang mempunyai lima *band*, sedangkan *E. coli* ATCC 35218 mempunyai empat *band*. Ini berarti pada *whole cell protein* terjadi penurunan jumlah *band*, sedangkan pada protein ekstraseluler terjadi peningkatan jumlah *band*.

Selain pola pita/*band* yang berbeda antara *whole cell protein* dan protein ekstraseluler dengan *E. coli* ATCC 35218, strain antar isolat *E. coli* yang resisten ampisilin juga berbeda setelah dipisahkan dengan SDS-PAGE. Ada strain-strain isolat *E. coli* yang resisten ampisilin mengalami *over expression* atau penumpukkan

seperti pada *whole cell protein*. Hal ini kemungkinan disebabkan bakteri melepaskan banyak β -laktamase untuk melawan ampisilin sehingga terjadi *over expression*.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut.

1. Pada isolat klinik bakteri *E. coli* yang resisten terhadap ampisilin setelah dipisahkan dengan SDS-PAGE ternyata menunjukkan perbedaan antara pola *whole protein cell* dan protein ekstraseluler dengan *E. coli* ATCC 35218. Pada pola *whole protein cell* terjadi penurunan jumlah *band* sedangkan pada protein ekstraseluler terjadi peningkatan jumlah *band*.

2. Strain antar isolat *E. coli* yang resisten terhadap ampisilin ternyata juga mempunyai pola yang berbeda setelah dipisahkan dengan SDS-PAGE. Ada yang mengalami *over expression* dan ada yang tidak.

B. Saran

1. Perlu dilakukan pemisahan protein bakteri Gram positif dengan jumlah yang lebih banyak, sehingga perbedaan band atau pola pita protein dengan Gram negatif dapat diketahui.

2. Selain itu juga perlu dilakukan *typing isolat* bakteri *E. coli* yang resisten terhadap ampisilin.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2001, *British Pharmacopoeia 2001*, The Departement of Health, Great Britain.
- Clink, J., and Pennington, T.H., 1987, Staphylococcus whole-cell polypeptide analysis: evaluation as a taxonomic and typing tool. *J. Med. Microbiol.* 23: 41-44.
- Çökmüs, C., and Youten, A.A., 1994, Characterization of Bacillus sphericus strains by SDS-PAGE. *J. Invest. Pathol.* 64:267-268.
- Elsanovedya, 2004, Uji Kepekaan Bakteri Patogen Pada Sputum dari Laboratorium Klinik dan Rumah Sakit Umum Daerah Jogjakarta Terhadap Antibiotik, *Skripsi*, Jurusan Farmasi Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta
- Ganiswarna, Setiabudi, Suyatna, Purwastyastuti, Nafrialdi, 1995, *Farmakologi dan terapi*, Edisi IV, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Indrayani, M., 2004, Uji kepekaan Bakteri Patogen pada Urin dari Laboratorium klinik dan Rumah Sakit umum Daerah Jogjakarta Terhadap Antibiotik, *Skripsi*, Jurusan Farmasi Universitas Islam Indonesia , Yogyakarta.
- Jawetz, E., Melnick, JL., and Adelberg, E.A., 1996 *Mikrobiologi untuk profesi Kesehatan*, Terjemahan Tonang, Penerbit EGC, Jakarta.
- Mubarika, Sofia, 1989, *Petunjuk Laboratorium Rekayasa Genetika*, PAU-Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Mutschler, E., 1986, *Dinamika Obat*, Edisi V, diterjemahkan Mathilda B. Widiyanto dan Anna Setiadi Ranti, ITB, Bandung, 620-650.
- Nakajima, H., 1996, International Mobilization Againts New and Resisten Disease, *Health Horisons Magazine*, No 29, 10-11.
- NCCLS (National Committe for Clinical Laboratory Standard), 1997, *Approved Standard.*, 6th ed. Villanova, Pennsylvania.
- Pelczar and Chan, 1988, *Dasar-dasar Mikrobiologi*, diterjemahkan Ratna Sri Hadioetomo, Universitas Indonesia, Jakarta.

- Rybicki and Maud, P., 2006, *SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)*, available at <http://www.mcb.uct.ac.za/sdspage.html> (diakses 14 Maret 2006).
- Sacilik, S.C., Osmanacasculu, Palabiyicoclu, Bengisun, J.S., Cumhur, K., 2000, Analysis of *Methicilyn Resistant Staphilococcus aureus* Isolates by Polyacrylamide Gel Electrophoresis in an Intensive Care Unit of Ünit-Sina Hospital, *Turk J Med Sci*, 30, 367-371.
- Salle, 1961, *Fundamental of Bacteriology*, Fifth Edition, Mc. Graw Hill Book Inc., New York.
- Sambrook, J., Fritsch E.F., and maniaty, T., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Labortory Press.
- Thomson-Carter FM, Penninton TH., 1989, Characterization of methicilyn resistant isolates of *Staphilococcus aureus* by analysis of whole cell and exported proteins. *J Med Microbiol*, 28: 25-32, 1989.
- Tjay dan Rahardja, 2002, *Obat-Obat Penting*, Edisi V, Elex Media Komputindo, Jakarta, 66-89.
- Wongsosupantio, S., Dr., 2001, Elektroforesis Gel Protein, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 14-29.

LAMPIRAN

Komposisi dan Pembuatan bahan- bahan kimia untuk elektroforesis gel poliakrilamida.

1. **Akrilamida 30 %**

2,9 g akrilamida dan 0,1 g bis-akrilamida kemudian dicampur dengan akuades steril sampai 10 ml.

2. **1,5 M Tris pH 8,8**

BM Tris = 121,14

1,8171 g Tris dilarutkan dengan aquades, sesuaikan pH dengan penambahan HCl tetes demi tetes. Setelah pH sesuai tambahkan aquades hingga 10 ml.

3. **0,5 M Tris pH 6,8**

BM Tris = 121,14

0,6057 g Tris dilarutkan dengan aquades, sesuaikan pH dengan penambahan HCl tetes demi tetes. Setelah pH sesuai tambahkan aquades hingga 10 ml.

4. **Buffer elektroda 5x**

7,1 g Glisin, 1,515 g tris, 0,75 gr SDS larutkan dalam aquades hingga 100 ml.

5. **Buffer sampel**

0,625 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 0,5 g SDS, 0,25 mg bromofenol blue, 1,25 ml merkaptoetanol, 2,5 ml gliserin semua bahan dilarutkan dengan aquades seteah itu ditambah dengan aquades lagi hingga 5 ml.

6. **Amonium persulfat (APS) 10 %**

1 g APS dalam 10 ml aquaedes.

7. **Sodium dodecyl sulphate (SDS) 10 %**

1 g SDS dalam 10 ml aquaedes.

8. **Staining solution**

22,5 ml methanol, 22,5 ml aquades, 5 ml asam asetat glasial 0,1 g coomasie brilliant blue kemudian dihomogenkan.

9. **Destaining solution**

25 ml methanol, 65 ml aquades dan 10 ml asam asetat glasial lalu dicampur.

10. **Gel SDS-PAGE**

*** Stacking gel 4%**

0,325 ml Akrilamida 30 %, 0,625 ml 0,5 M tris pH 6,8, 25 μ l SDS 10 %, 1,25 μ l TEMED, 12,5 μ l dan aquades 1,525 ml.

*** Resolving gel 12%**

2 ml Akrilamida 30 %, 1,25 ml 1,5 M tris pH 8,8, 50 μ l SDS 10 %, 2,5 μ l TEMED, 25 μ l dan aquades 1,675 ml.

11. Marker Protein yang digunakan

M = 3788 (36.000- 205.000)

- | | |
|--------------------------|---------|
| 1. Gliseraldehid 3 P-DH | 205 KDa |
| 2. ovalbumin | 116 KDa |
| 3. glutamic DH | 97 KDa |
| 4. albumin | 84 KDa |
| 5. fructose-6 -PK | 66 KDa |
| 6. phosphorilase | 55 KDa |
| 7. β galaktosidase | 45 KDa |
| 8. myosin | 36 KDa |

