

PROFIL DAN IDENTIFIKASI *SERUM AMILOID PROTEIN*
(SAP) SEBAGAI PROTEIN FASE AKUT PADA MENCIT
YANG DIPAPAR *SALMONELLA ENTERITIDIS*

*PROFILE AND IDENTIFY THE SERUM OF AMILOID PROTEIN (SAP)
AS ACUTE PHASE PROTEIN AT MICE WHICH INOCULATED
SALMONELLA ENTERITIDIS*

Sunarni Zakaria⁽¹⁾, Rochmah Kurnijasanti⁽¹⁾, Iwan Sahrial Hamid⁽¹⁾

ABSTRACT

This research have a purpose to identify SAP as acute phase protein from mice which inoculated Salmonella enteritidis with the method SDS-PAGE. Its important is role SAP in detecting early case of infection and inflammation, as protektor of infectif agent and prevent the culture degradasi pass role antiproteinase, so that require to be isolation SAP. Used 80 mouse old age three months of mean weight 25 g, decided our treatment group, each treatment group consisted five mouse inokulasi with the bacterium of Salmonella enteritidis 10^6 , 10^8 , 10^9 and 10^{10} cell / ml by intraperitoneal. Later then at 20, 32, 38 and 44 hours after inoculated by removed blood serum, protein level rate from serum detected by chromatografi. Serum which have been collected is ready to weared to be identified with the Sodium of Dodecyl Sulfate Polyacrylamide of Gel Electroforesis (SDS Page) to know the to molecular weight. Result have been identified by the serum protein from mouse of molecular weight equal to 25,89 kDa that suggest SAP. The Protein identified from mouse which infection of Salmonella enteritidis of equal to 10^6 and 10^8 at collection 20 and 44 hours after inoculation.

Keywords: Amiloid protein, salmonella enteritidis

⁽¹⁾ Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

PENDAHULUAN

Serum Amiloid Protein merupakan salah satu protein fase akut selain Pentraxin (PTX3), Serum Amiloid A Protein (SAA), C Reaktif Protein (CRP) dan α_2 -makroglobulin, merupakan kelompok molekul protein *major changes* yang secara fungsional dan struktural ditampilkan pada spesies tertentu dalam ekspresi dan respon inflamasi dan infeksi (Matsujama *et al.*, 1984). Salah satu protein fase akut yang dideteksi kadarnya meningkat dalam serum 100-1000 kali selama inflamasi adalah Serum Amiloid Protein (SAP). Dengan demikian SAP dapat dipakai salah satu indikasi kejadian infeksi akut oleh agen patogen. Protein fase akut juga memainkan peranan dalam ikatan dengan antigen atau imunogen agen infeksi, proses opsonisasi, koagulasi darah, sebagai anti-proteinase (Protocol online, 1996).

Peran SAP sebagai protein fase akut dalam mencegah kerusakan jaringan akibat proses inflamasi ataupun nekrosis juga belum banyak diungkap. Dale *et al.*, (1995). Pentingnya peran SAP dalam mendeteksi secara dini kasus-kasus infeksi dan inflamasi, sehingga perlu dilakukan isolasi SAP. teknik separasi SDS-Page merupakan langkah awal untuk identifikasi protein tersebut.

Berdasarkan latar belakang permasalahan yang ditunjang pula dengan dasar teoritik SAP, maka dapat dirumuskan suatu permasalahan bahwa perlu dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi dan mengetahui profil SAP sebagai protein fase akut pada mencit yang diinokulasi *Salmonella enteritidis*.

Menurut Sangwei Lu, *et al.* (1999), *Salmonella enteritica* serotype enteritidis merupakan bakteri terbesar yang ditularkan lewat makanan dan kasusnya meningkat secara drastis pada dua dekade terakhir. LD₅₀ pada mencit dicapai

dengan menginokulasikan antara 10² sampai dengan 10⁸ organisme. *Salmonella* menyebabkan sakit pada mencit melalui beberapa fase, termasuk daya tahan terhadap lingkungan asam pada lambung, setelah itu masuk ke dalam usus halus dan menyerang sel M (macroform) yang mana secara khusus terdapat pada lokasi sel fagosit Peyer's patch. Patogenesis selanjutnya dapat menimbulkan terjadinya reaksi infeksi dan inflamasi.

Dikatakan oleh Dale *et al.*, (1995) bahwa inflamasi merupakan suatu fenomena yang diawali dengan infeksi atau kerusakan jaringan, melibatkan rangkaian interaksi molekuler dan seluler sebagai respons tubuh. Respons yang terjadi adalah respons fase akut yang ditandai oleh panas, bengkak, kemerahan, rasa sakit lokal, granulositosis, peningkatan adrenokortikotropik hormon (ACTH), glukokortikoid dan peningkatan secara dramatis protein fase akut yang dihasilkan oleh metabolisme di liver dan sintesis protein. Protein fase akut secara cepat didistribusikan lewat sirkulasi, kadar puncak dicapai 18 – 36 jam setelah stimulus dan konsentrasinya dalam plasma akan menurun setelah 3 – 5 hari. Beberapa protein fase akut yang telah ditemukan adalah C-Reaktif Protein, α_2 Makroglobulin, α_1 Antichymotrypsin, α_2 Plasmin inhibitor dan Serum Amiloid Protein (SAP). Peran Protein Fase Akut antara lain adalah ikatan dan opsonisasi, koagulasi darah, antiproteinase dan memodulasi respon imun. Sedangkan mediator yang terlibat dalam peran tersebut adalah kortikosteroid dan sitokin seperti Interleukin 1 dan 6 serta TNF α (Zeigler and Enanue, 1981).

Serum Amiloid Protein atau SAP/APCS/PTX2 (Pentraxin) merupakan salah satu protein fase akut yang ditemukan pada serum

manusia dan mencit yang kadarnya meningkat pada infeksi dan inflamasi, terdiri dari 204 rantai asam amino yang terletak pada kromosom 1q21-23. Mempunyai ikatan non kovalen dengan berat molekul 25 kDa yang tersusun atas struktur pentagonal siklik dua paralel saling berhadapan (Frutos *et al.*, 1995).

Secara khusus ini merupakan penelitian pendahuluan yang bertujuan untuk mengidentifikasi SAP sebagai protein fase akut pada mencit yang diinokulasi *Salmonella enteritidis* dengan teknik Separasi SDS-Page.

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, berupa gambaran pita protein fase akut Serum Amiloid Protein (SAP) : Dapat diketahui saat kapan diekspresikan protein fase akut tersebut setelah diinfeksi *Salmonella enteritidis*, dimana saat itu pula peran fungsional sebagai proteksi agen patogen.

METODE PENELITIAN

Inokulasi Salmonella enteritidis Pada Mencit

Inokulasi *Salmonella enteritidis* pada mencit pertama kali dilakukan sebagai percobaan awal untuk menentukan prosedur baku guna mendapatkan dosis isolat bakteri dan waktu pengambilan serum yang tepat. Digunakan 80 ekor tikus putih (mencit) jantan berumur sekitar tiga bulan dengan berat rata-rata 25 g, merupakan hewan percobaan yang terbagi menjadi empat kelompok perlakuan, masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor mencit di inokulasi dengan bakteri *Salmonella enteritidis* 10^6 , 10^8 , 10^9 dan 10^{10} sel/ml secara intra-peritoneal. Kemudian pada 20, 32, 38 dan 44 jam setelah inokulasi dengan *S. enteritidis* dilakukan pengambilan sampel darah, selanjutnya pemeriksaan kadar protein dari serum mencit dideteksi dengan kromatografi.

Identifikasi dan Karakterisasi SAP

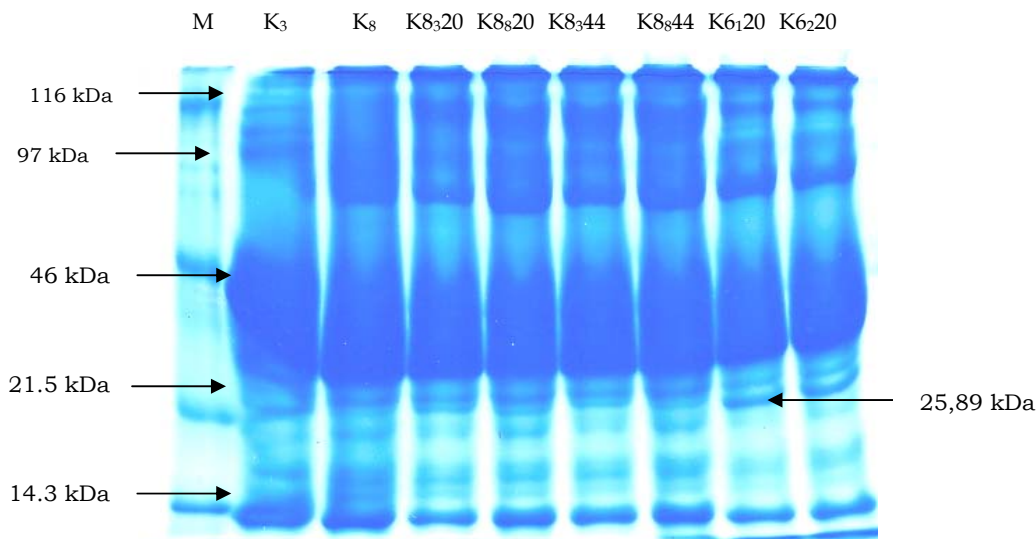
Serum Amiloid Protein yang telah diisolasi dari serum mencit setelah inokulasi dengan *Salmonella enteritidis* diidentifikasi dan karakterisasi dengan elektroforesis (SDS Page). Prosedur SDS Page diawali dengan pembuatan running gel dan dimasukkan ke dalam pelat kaca, setelah mengeras pada bagian atasnya dimasukkan stacking gel yang telah dipersiapkan. Susunan running gel dan stacking gel dibuat dengan mencampurkan Acrylamid, Tris, SDS 0,8%, Temed, APS dan aquades dalam beker gelas. Sebanyak 10 µg sampel yang ditambahkan *laemly buffers* dengan perbandingan 2 : 1 dilakukan perebusan pada 100°C selama 5 menit, setelah itu dimasukkan ke dalam kolom cetakan yang terletak pada *stacking gel* dan dilakukan *running* pada *chamber* yang telah diisi *Electrode Buffers* 1X dengan 100 volt, 40 mA. Setelah *running gel* dimasukkan ke dalam larutan pencuci yang terdiri dari methanol 25 ml, asam asetat 3,7 ml, dan Aquades ad 100 ml. Digoyang di atas sackher selama 30 menit. Dilakukan pencucian ulang dengan larutan yang sama dengan pengurangan komposisi ethanol dan penambahan asam asetat setengah dari sebelumnya selama 30 menit. Pencucian berikutnya dengan larutan glutaraldehyd 10% dan Aquades selama 30 menit. Setelah dicuci gel diwarnai dengan AgNO₃ selama 15 menit, kemudian dilakukan pencucian dengan aquades dua kali masing-masing selama 2 menit. Diberikan larutan pengembangan warna yang terdiri dari formaldehyd 3,7%, zitrone 5% dan aquades. Setelah pita-pita protein terlihat maka reaksi dihentikan dengan menambahkan asam asetat 10%. Hasil gel yang telah tampak pita-pita proteinnya disimpan dalam larutan gliserol 10% dan siap untuk didokumentasikan.

Penghitungan berat molekul dilakukan dengan membandingkan standart marker (Axelsen, 1983 yang sudah dimodifikasi).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Koleksi serum dilakukan pada kelompok mencit yang diinokulasi

dengan 10^6 dan 10^8 isolat *Salmonella enteritidis*, sedangkan waktu pengambilan serum ditentukan pada jam ke-20 dan ke-44 jam setelah inokulasi *Salmonella enteritidis*. Hasil analisis protein SAP dengan elektroforesis dapat ditunjukkan pada gambar berikut.



Gambar 1. Profil protein analisis SAP dengan SDS Page 12,5% tampak pita protein dengan berat molekul 25,89 kDa yang diduga Protein SAP.

Keterangan :

M : Marker rainbow protein

K : Kontrol tanpa inokulasi *Salmonella enteritidis*

K8 20 : Perlakuan inokulasi *Salmonella enteritidis* 10^8 dan koleksi serum pada 20 jam post inokulasi

K6 20 : Perlakuan inokulasi *Salmonella enteritidis* 10^6 dan koleksi serum pada 20 jam post inokulasi

K8 44 : Perlakuan inokulasi *Salmonella enteritidis* 10^8 dan koleksi serum pada 44 jam post inokulas

Hasil elektroforesis pada gambar 1, dengan teknik SDS Page menunjukkan adanya separasi pita protein baik pada serum kontrol maupun perlakuan, terdapat perbedaan formasi pita protein antara kontrol dengan perlakuan. Pada perlakuan dengan inokulasi *Salmonella enteritidis* 10^6 dan 10^8 serta koleksi serum pada 20 dan 44 jam post inokulasi (K620, K820 dan K844) didapatkan gambaran pita protein dengan berat molekul 25,89 kDa. Berat molekul pita protein tersebut tidak ditemukan pada kontrol, pada daerah yang sejajar

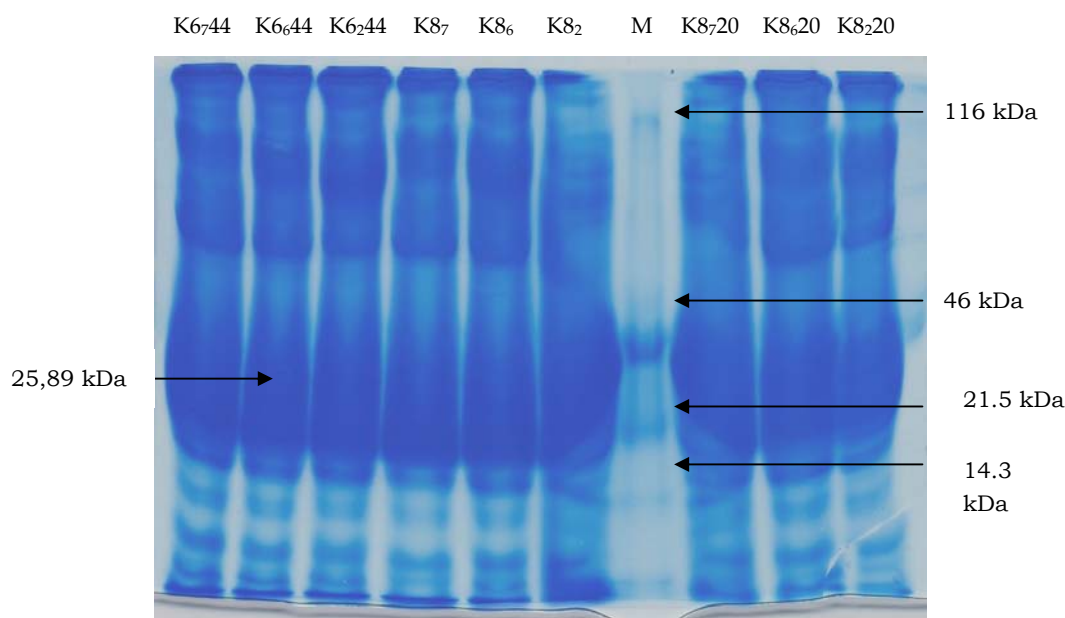
dengan pita protein perlakuan, hanya didapatkan berat molekul sebesar 21,5 kDa pada kontrol yang juga sama ditemukan pada perlakuan.

Temuan berat mulekul sebesar 25,89 kDa pada perlakuan memberikan dugaan yang kuat terhadap adanya protein fase akut Serum Amiloid Protein (SAP) yang dihasilkan pada mencit yang diinokulasi dengan *Salmonella enteritidis* 10^6 dan 10^8 serta koleksi serum pada 20 dan 44 jam post inokulasi. Hal tersebut tampaknya analog dengan hasil yang didapatkan Frutos *et al.* (1995) bahwa terdapat

satu protein fase akut yang ditemukan pada serum manusia dan mencit yang kadarnya meningkat pada infeksi dan inflamasi, terdiri dari 204 rantai asam amino yang terletak pada kromosom 1q21-23. Mempunyai ikatan non kovalen dengan berat molekul 25 kDa.

Hasil penelitian pada Gambar 2 menunjukkan perbandingan profil pita protein antara kelompok kontrol, perlakuan dengan inokulasi 10^6 pada isolasi serum 44 jam post inokulasi

dan perlakuan dengan inokulasi 10^8 pada isolasi serum 20 dan 44 jam post inokulasi. Hasil tersebut tampaknya tidak menunjukkan perbedaan profil pita protein pada masing-masing kontrol maupun perlakuan, dimana didapatkan pita protein sebesar 25,89 kDa. Munculnya protein 25,89 kDa pada kontrol diduga terjadi reaksi silang infeksi yang dapat memicu dihasilkannya fase akut protein salah satunya SAP.



Gambar 2. Profil protein analisis SAP dengan SDS Page 12,5% tampak pita protein dengan berat molekul 25,89 kDa yang diduga Protein SAP.

Keterangan :

M : Marker rainbow protein

K : Kontrol tanpa inokulasi *Salmonella enteritidis*

K8 20 : Perlakuan inokulasi *Salmonella enteritidis* 10^8 dan koleksi serum pada 20 jam post inokulasi

K6 44 : Perlakuan inokulasi *Salmonella enteritidis* 10^6 dan koleksi serum pada 44 jam post inokulasi

K8 44 : Perlakuan inokulasi *Salmonella enteritidis* 10^8 dan koleksi serum pada 44 jam post inokulasi.

Peran SAP sebagai proteksi host terhadap beberapa bakteri patogen telah ditunjukkan oleh Noursadeghi *et al.* (2000) melalui hasil penelitian invitro pada kultur bakteri, dimana SAP mampu mengadakan ikatan dengan lipopolisakarida (LPS) bakteri

Neisseria meningitidis, *Echerichia coli*, *Streptococcus pyogenes* dan *Salmonella thyphimurium*.

Induksi protein fase akut diawali dengan percobaan injeksi LPS pada murine, dimana terjadi peningkatan dan produksi berulang-

ulang sitokin proinflamasi kemudian LPS mengaktifasi komplemen pada jalur klasik dan alternatif, diawali dengan aktivasi generasi C3a dan C5a. Anafilatoksin C5a menuju ke sel target yang memperluas aktifitasnya, termasuk sintesis TNF α , IL1 β dan IL-6 oleh lekosit dimana merupakan proses amplifikasi inflamasi. Aktifitas C5a diperantarai oleh C5aR dan CD 88, Protein G *coupled 7-transmembrane-domain* protein yang diekspresikan oleh sel-sel myeloid dan juga sel-sel myeloid pada hati dan paru (Szalai *et al.*, 2000). Respon fase akut pada dasarnya merupakan manifestasi pertahanan host terhadap agen patogen, hal itu menjadi protektif tergantung dari pengerahan elemen struktural bakteri secara berulang (endotoksin, asam teikoat dan polisakarida permukaan) oleh protein fase akut seperti CRP, Lektin terikat manose dan protein terikat LPS. Di samping itu juga protein fase akut mempengaruhi inisiasi dan tipe respon imun adaptif (Suffredini *et al.*, 1999).

Serum Amiloid P komponen (SAP) secara normal didapatkan di darah dan jaringan ekstraseluler. Mempunyai ikatan molekul subunit nonkovalen sebesar 25 kDa yang tersusun atas struktur pentagonal siklik dua parallel berinteraksi saling berhadapan, bersama-sama dengan CRP merupakan perpanjangan famili protein pentraxin. SAP dan CRP mempunyai 51 % asam amino homolog. SAP terikat pada LPS bakteri gram negatif tipe halus dan kasar melalui bagian lipid A, dengan teknologi BIAcore digunakan untuk menentukan afinitas ikatan SAP dengan LPS *Salmonella enteritidis*. Infeksi oleh bakteri gram negatif seperti *H. influenzae*, *S. enteritidis* dan *S. enteritidis* dapat meningkatkan kadar SAP dari level plasma normal 30 – 50 $\mu\text{g/ml}$ sampai menjadi 2-3 kali lebih tinggi, hal tersebut sangat

penting menjadi peran yang memungkinkan untuk menjelaskan patofisiologi infeksi oleh bakteri gram negative (de Haas, *et al.*, 2000). Hal tersebut tampaknya sesuai dengan pendapat Dale (1994) bahwa pada manusia dan mencit yang mengalami infeksi dan terjadi fenomena inflamasi maka kadar protein fase akut SAA meningkat antara 100-1000 kali dan SAP 2-5 kali.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik suatu kesimpulan, bahwa telah diidentifikasi protein serum dari mencit dengan berat molekul sebesar 25,89 kDa yang diduga SAP. Protein tersebut diidentifikasi dari mencit yang diinfeksi *Salmonella enteritidis* sebesar 10^6 dan 10^8 pada koleksi 20 dan 44 jam setelah inokulasi.

Saran

Berdasarkan hasil dan kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini disarankan penggunaan metode lanjutan untuk mengkarakterisasi, mengisolasi, produksi dan uji coba baik pada kultur sel maupun pada hewan percobaan.

DAFTAR PUSTAKA

- Axelsen, N.H. 1983. *Handbook of Immunoabsorption-in-Gel Technique*. Black Well Scientific Publications. London.
- Dale, M.M., Foreman, J.C., and D.F. Tai-Ping. 1995. *Textbook of Immunopharmacology*. Third Edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 269 – 272.
- De Haas C.J.C., Van Leeuwen, E.M.M. van Boemel, T., Verhoef, J., van Kessel, K.P.M., and J.A.G. Van Strijp. 2000. Serum Amyloid P Component Bound to Gram-Negative Bacteria Prevents Lipopolysaccharide-Mediated Classical Pathway Complement

- Activation. *Infect. Immun.* 68, 1753 – 1759.
- Frutos, P.G., Hardig, Y., and B. Dahlback. 1995. Serum Amyloid P Component Binding to C4b – binding Protein. *J. Biochem and Molecular Biol. Sweden.* Vol. 270 (45): 26950-26955.
- Matsujama, S.I, Inokuchi, K., and S. Mashushita. 1984. Promotor Exchange Between OMP F and OMP C for Osmoregulated Major Membrane Protein of *E. coli* K-12. *J. Bacteriol.* 156: 1041-1047.
- Protocol online, 1996. Alpha Diagnostic International, Inc. – 5415. Email : <mailto:service@4adi.com> Web Site: <http://www.4adi.com/>. Lost Lane, San Antonio, TX 78238 USA.
- Sangwei Lu, A.R., Manges, Y. Xu., F.C., Fung, and L.W., Riley. 1999. Analysis of Virulence of Clinical Isolates of *Salmonella enteritidis* Invivo and Invitro. *Infect and Immun.* 11: 5651-5657.
- Suffredini, A.F., G. Fantuzzi, R. Badolato, J.J. Oppenheim, and N.P.O'Grady. 1999. New Insight into the Biology of the Acute Phase Response. *J. Clin. Immunol.* 19: 203.
- Szalai, A.J., Frederik, W.V.G., Yue Wang, Jerry, R.M., and J.E. Volanakis. 2000. Complement-Dependent Acute-Phase expression of C-Reactive Protein and Serum Amyloid P-Component. *J. Of Immunol.* 165: 1030-1035.
- Zeigler, K., and E.R. Enanue. 1981. Decrease in Macrophage Antigen Catabolism Caused by Ammonia And Chloroquine is Associated with Inhibition of Antigen Presentation to T-Cells. *J. Immunol.* 122: 2405-2412.