

## Isolasi Dan Berat Molekul Protein OMP Kuman Salmonella Pullorum Isolat Lapangan

### Isolation and Measurement Molecule Weight Outer Membrane Protein (OMP) of Salmonella Pullorum Field Isolate

Hasutji Endah Narumi, Sri Chusniati

Fakultas Kedokteran Hewan UnairKampus  
C Unair, Jl Mulyorejo Surabaya 60115  
Telp. 031-5992785 Fax.031-5993015  
email :ichus\_fkh@unair.ac.id

#### Abstract

Pullorum disease use to be called Bacillary white diarrhoea disease and it is one of contagious bacterial disease in Poultry. The disease is an acute and it is highly fatal to young chicks during the first few day of life. In the adult there may be also be chronic cases and it is changeable as carrier. This research was done in 4 steps: (1) isolation, identification and purification of Salmonella pullorum field isolate, (2) isolate of Salmonella pullorum Outer Membrane Protein (OMP), (3) measurement of OMP and (4) measurement weight molecule of OMP. The result showed that isolation, identification and purification from faeces of chick was pure Salmonella pullorum. The soluble OMP was found 20 ml (1973,4 µg/ml). The molecule weight were showed by the band on SDS-Page: 40 kDa, 29 kDa, 25 kDa, 19 kDa, 9 kDa, 4 kDa and 1 kDa. The measurement of molecule weight used standard marker (2,4,6,14,21,30 and 46 kDa). According to Wolfgang et al (1992), the molecule of antigenically gram negative was 20 to 45 kDa, where as molecule weight of E.coli protein was around 35 kDa.

Keywords: Salmonella pullorum, Outer Membrane Protein, SDS-PAGE

#### Pendahuluan

Kuman Salmonella pullorum merupakan penyebab penyakit Berak Kapur (Bacillary White Diarrhoea = BWD) yang terutama menyerang ayam dengan menimbulkan kerugian ekonomi cukup tinggi (Aiy Ling, 1998). Infeksi kuman Salmonella pullorum pada ayam petelur mengakibatkan produksi telur turun sampai 20-30%. Telur yang terinfeksi mengandung kuman dan kemungkinan tidak menetas karena embrio mati atau rusak. Infeksi pada anak ayam bersifat akut dan dapat berakibat fatal, sedangkan pada ayam dewasa bersifat kronis dan jarang menimbulkan kematian (Anonimus, 1981 dan Darrel W. Trampel 2001).

Upaya pemerintah untuk menanggulangi penyakit terutama pada tindakan pencegahan dan melakukan uji pullorum dengan cara *Rapid Whole Blood*

*Test* (RWBT) atau *Rapid Serum Test* (RST). Uji ini hanyalah sebagai deteksi mencari reaktor positif dan bukan pencegahan (Hagan, 1994 dan Tabbu, C.R 2000).

Widjajanto, (2000) telah melakukan penelitian dengan membuat Bakterin (vaksin inaktif), namun hasilnya tidak memuaskan. Dilanjutkan Widjajanto, (2001) yaitu melakukan isolasi protein *Outer Membrane Protein* (OMP) kuman *Salmonella pullorum* ternyata berhasil, sehingga perlu dilanjutkan penelitian lanjut dengan mengukur berat molekul protein OMP.

#### Materi dan Metode Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kuman *Salmonella pullorum* yang diisolasi dari salah satu peternakan dengan gejala klinis berak kapur. Media yang digunakan SSA dan bahan uji Biokimia serta alat alat SDS-PAGE termasuk untuk

elektroforesis dan pengukuran kadar protein dengan spektrofotometer.

**Penelitian ini terdiri dari 4 tahap:**

Tahap I: Isolasi kuman *Salmonella pullorum*, sampel tinja di tanam pada media SSA dan sebagian dibuat pewarnaan Gram. Koloni tumbuh, kemudian dilakukan uji biokimiawi (TSIA, SIM, Simmon's Citrat Agar dan gula-gula). Selanjutnya di kultur sebagai stok kuman.

Tahap II: Isolasi protein OMP kuman *Salmonella pullorum*. Stok kuman dibuat suspensi dengan penambahan PBS steril. Kemudian dilakukan ultrasonikasi dan disentrifus 10.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dipakai untuk isolasi protein.

Tahap III: Pengukuran Kadar Protein OMP. Suspensi protein OMP yang diperoleh diukur kadar proteinnya dengan spektrofotometer dengan larutan standard *Bovine Serum Albumine* (BSA) 1%. Sehingga diperoleh kadar protein per mililiter.

Tahap IV: Pengukuran Berat Molekul. Dengan menggunakan metoda SDS-PAGE kadar gel 10%.

Hasil elektroforesis diperoleh gambaran protein berupa band (pita) dengan berat molekul tertentu dengan disetarakan pada pita marker. Selanjutnya dihitung berat molekulnya.

**Hasil dan Pembahasan**

Isolasi dan identifikasi kuman dari sampel telah dilakukan kultur pada media SSA, pewarnaan Gram dan uji Biokimiawi diperoleh hasil sebagai berikut :

|                |                                                                                                                                             |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pewarnaan Gram | : batang, Gram negatif                                                                                                                      |
| Media SSA      | : koloni bulat, halus dan tepi rata, tak berwarna                                                                                           |
| Media TSIA     | : bagian <i>slant</i> (miring) warna merah, bagian tegak warna kuning, Gas positif, H <sub>2</sub> S positif (B/A, gas +, H <sub>2</sub> S) |
| Media SIM      | : non motil, indol-, H <sub>2</sub> S+                                                                                                      |

Gula-gula : glukose+, sukrose-, laktose-, maltose+, mannose+

Media Urea : negatif

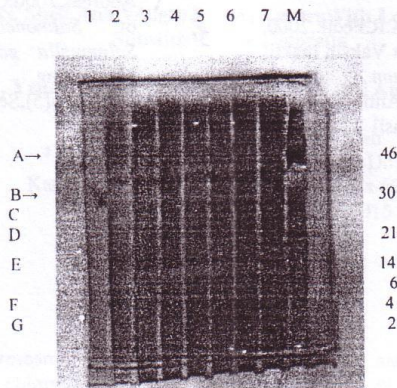
Simmon Citrat Agar : negatif

Berdasarkan atas hasil tersebut diatas, dapat ditarik kesimpulan bahwa kuman tersebut adalah *Salmonella pullorum* (*S. pullorum*). Hasil tersebut sesuai dengan Jackson (1981) dan Hofstad (1986). Oleh karena itu kuman tersebut dapat digunakan sebagai sample untuk pengambilan protein OMP.

Pada tahap berikutnya, dilakukan pemecahan dinding sel untuk mendapatkan protein dengan ultrasonikator : Pemakaian dengan alat ultrasonikator dilakukan modifikasi dengan cara 3 menit jalan, 2 menit berhenti, dan diulang sebanyak 3 kali dengan frekuensi 20 KHZ. Hasilnya diperoleh suspensi yang mengandung kuman dimana telah pecah membrane luar selnya.

Dalam upaya isolasi protein OMP, digunakan metode Matsuyama yang telah dimodifikasi dengan melakukan ultra sentrifugasi berulang dan temperature rendah (4°C). Hal ini dilakukan mengingat alat yang digunakan relatif sudah berumur tua, sehingga penggunaan dengan kecepatan normal (38 rpm/menit) hasilnya kurang baik. Oleh karena itu pada penelitian ini kecepatan dinaikkan sampai 40.000 rpm dalam waktu 20 menit dengan suhu 4°C. Modifikasi ini juga mengikuti Suzana (1992) yang menyatakan bahwa untuk melakukan isolasi komponen membran luar supaya hasilnya baik, hendaknya mengatur suhu dan cara sentrifugasi sejak awal perlakuan. Hasilnya adalah suatu protein soluble yang sesuai dengan penelitian Widjajanto (2001) dan untuk mengetahui lebih lanjut perlu diukur kadarnya.

Hasil pengukuran kadar protein soluble (protein OMP) kadar protein (Protein OMP) dengan spektrofotometer memakai standart BSA 1% diperoleh kadar protein sebesar 1.973,4 ug/ml. Kadar protein sebesar ini sudah cukup baik untuk pengukuran berat molekul.



Gambar 1. Hasil elektroforesis Pengukuran Berat Molekul dengan Metode SDS-PAGE.

Keterangan: M=marker 1-7 = sampel

Pengukuran berat molekul dengan metode SDS-PAGE. Perhitungan berat molekul hasil elektroforesis disesuaikan dengan standart marker, menunjukkan adanya pita yang bervariasi antara 2 kDa sampai 45 kDa. Hasil ini mirip dengan pendapat Wolfgang (1992) bahwa kuman Gram negatif memiliki berat molekul protein sebesar 30 kDa sampai 45 kDa yang pada *E.coli* memiliki berat molekul 35 kDa. Kisaran berat molekul protein OMP kuman *Salmonella pullorum* menurut standart marker terdapat pada daerah 6, 14, 21, 30 dan 46 kDa.

Hasil pengukuran berat molekul dalam penelitian ini sesuai dengan pita (*band*) yang terbaca adalah sebagai berikut : sample 1 sampai 7 dengan pita A = 40 kDa, B=29 kDa, C=25 kDa, D=19 kDa, E=9 kDa, F=4 kDa dan G=1 kDa. Sehubungan berat molekul protein tersebut, maka untuk mengetahui bagaimana sifat Protein OMP kuman *Salmonella pullorum* isolat lapangan ini kiranya perlu tindakan lanjut dengan melakukan penelitian sifat antigenik atau imunogeniknya.

#### Kesimpulan:

Dari hasil penelitian diatas dapat ditarik kesimpulan bahwa telah dapat dilakukan isolasi protein OMP dari kuman *Salmonella pullorum* isolat lapangan dan berat molekul berkisar antara 2 kDa sampai 45 kDa, dengan standard marker terdapat pada daerah 6,14,21,30 dan 46 kDa.

#### Daftar Pustaka

- Anonimus.1981.PenyakitPullorum.Pedoman Pengendalian Penyakit Menular.Jilid I.Cetakan ke-2.Direktorat Kesehatan Hewan.Direktorat Jenderal Peternakan.Departemen Pertanian RI.
- Aiy Ling.1998. Penentuan LD<sub>50</sub> dan ID<sub>50</sub> *Salmonella pullorum* pada anak Ayam Petelur yang di Infeksi Secara Oral dan Pengaruhnya Terhadap Gambaran Patologi Anatomi. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Darrel W.Trampel.2001. Pullorum Disease. Iowa State University. October 16.www.pullorum.com.4 December 2004.
- Hagans,W and D.W.Brunners.1994. Infectious Disease of Domestic Animals.7<sup>th</sup> Ed.Comstock Publishing Associated. Cornell University Press. Ithaca.London.

- Tabbu,C.R.2000. Penyakit Ayam dan Penanggulangannya.Vol. 1. Cetakan ke-1. Penerbit Yayasan Kanisius. Yogyakarta.
- Widjajanto,S.,A.Sadik dan A.R.Fedik.2000. Studi Awal Laboratoris Vaksin Inaktif *Salmonella pullorum* dengan Pengukuran Titer Antibodi Post Vaksinal.Laporan Hasil Penelitian

- Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM)-Unair.
- Wolfgang,R.M.,Billy and J.B. Andreas.2000.Competitive Exclusion of *Salmonella enteritidis* by *Salmonella gallinarum* in Poultry. J.Emerging Infectious Dis.Vol.6(5).Sept-Oct:443-448.

elektroforesis dan pengukuran kadar protein dengan spektrofotometer.

**Penelitian ini terdiri dari 4 tahap:**

Tahap I: Isolasi kuman *Salmonella pullorum*, sampel tinja di tanam pada media SSA dan sebagian dibuat pewarnaan Gram. Koloni tumbuh, kemudian dilakukan uji biokimiawi (TSIA, SIM, Simmon's Citrat Agar dan gula-gula). Selanjutnya di kultur sebagai stok kuman.

Tahap II: Isolasi protein OMP kuman *Salmonella pullorum*. Stok kuman dibuat suspensi dengan penambahan PBS steril. Kemudian dilakukan ultrasonikasi dan disentrifus 10.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dipakai untuk isolasi protein.

Tahap III: Pengukuran Kadar Protein OMP. Suspensi protein OMP yang diperoleh diukur kadar proteinnya dengan spektrofotometer dengan larutan standard *Bovine Serum Albumine* (BSA) 1%. Sehingga diperoleh kadar protein per mililiter.

Tahap IV: Pengukuran Berat Molekul. Dengan menggunakan metoda SDS-PAGE kadar gel 10%.

Hasil elektroforesis diperoleh gambaran protein berupa band (pita) dengan berat molekul tertentu dengan disetarakan pada pita marker. Selanjutnya dihitung berat molekulnya.

**Hasil dan Pembahasan**

Isolasi dan identifikasi kuman dari sampel telah dilakukan kultur pada media SSA, pewarnaan Gram dan uji Biokimiawi diperoleh hasil sebagai berikut :

|                |                                                                                                                                             |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pewarnaan Gram | : batang, Gram negatif                                                                                                                      |
| Media SSA      | : koloni bulat, halus dan tepi rata, tak berwarna                                                                                           |
| Media TSIA     | : bagian <i>slant</i> (miring) warna merah, bagian tegak warna kuning, Gas positif, H <sub>2</sub> S positif (B/A, gas +, H <sub>2</sub> S) |
| Media SIM      | : non motil, indol-, H <sub>2</sub> S+                                                                                                      |

Gula-gula : glukose+, sukrose-, laktose-, maltose+, mannose+

Media Urea : negatif

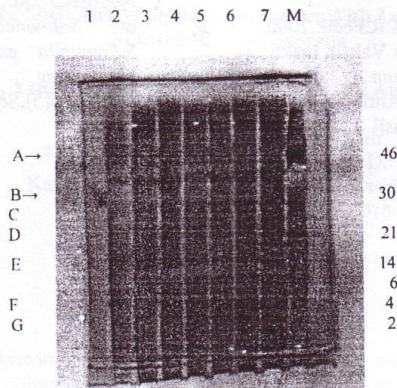
Simmon Citrat Agar : negatif

Berdasarkan atas hasil tersebut diatas, dapat ditarik kesimpulan bahwa kuman tersebut adalah *Salmonella pullorum* (*S. pullorum*). Hasil tersebut sesuai dengan Jackson (1981) dan Hofstad (1986). Oleh karena itu kuman tersebut dapat digunakan sebagai sample untuk pengambilan protein OMP.

Pada tahap berikutnya, dilakukan pemecahan dinding sel untuk mendapatkan protein dengan ultrasonikator : Pemakaian dengan alat ultrasonikator dilakukan modifikasi dengan cara 3 menit jalan, 2 menit berhenti, dan diulang sebanyak 3 kali dengan frekuensi 20 KHZ. Hasilnya diperoleh suspensi yang mengandung kuman dimana telah pecah membrane luar selnya.

Dalam upaya isolasi protein OMP, digunakan metode Matsuyama yang telah dimodifikasi dengan melakukan ultra sentrifugasi berulang dan temperature rendah (4°C). Hal ini dilakukan mengingat alat yang digunakan relatif sudah berumur tua, sehingga penggunaan dengan kecepatan normal (38 rpm/menit) hasilnya kurang baik. Oleh karena itu pada penelitian ini kecepatan dinaikkan sampai 40.000 rpm dalam waktu 20 menit dengan suhu 4°C. Modifikasi ini juga mengikuti Suzana (1992) yang menyatakan bahwa untuk melakukan isolasi komponen membran luar supaya hasilnya baik, hendaknya mengatur suhu dan cara sentrifugasi sejak awal perlakuan. Hasilnya adalah suatu protein soluble yang sesuai dengan penelitian Widjajanto (2001) dan untuk mengetahui lebih lanjut perlu diukur kadarnya.

Hasil pengukuran kadar protein soluble (protein OMP) kadar protein (Protein OMP) dengan spektrofotometer memakai standart BSA 1% diperoleh kadar protein sebesar 1.973,4 ug/ml. Kadar protein sebesar ini sudah cukup baik untuk pengukuran berat molekul.



Gambar 1. Hasil elektroforesis Pengukuran Berat Molekul dengan Metode SDS-PAGE.

Keterangan: M=marker 1-7 = sampel

Pengukuran berat molekul dengan metode SDS-PAGE. Perhitungan berat molekul hasil elektroforesis disesuaikan dengan standart marker, menunjukkan adanya pita yang bervariasi antara 2 kDa sampai 45 kDa. Hasil ini mirip dengan pendapat Wolfgang (1992) bahwa kuman Gram negatif memiliki berat molekul protein sebesar 30 kDa sampai 45 kDa yang pada *E.coli* memiliki berat molekul 35 kDa. Kisaran berat molekul protein OMP kuman *Salmonella pullorum* menurut standart marker terdapat pada daerah 6, 14, 21, 30 dan 46 kDa.

Hasil pengukuran berat molekul dalam penelitian ini sesuai dengan pita (*band*) yang terbaca adalah sebagai berikut : sample 1 sampai 7 dengan pita A = 40 kDa, B=29 kDa, C=25 kDa, D=19 kDa, E=9 kDa, F=4 kDa dan G=1 kDa. Sehubungan berat molekul protein tersebut, maka untuk mengetahui bagaimana sifat Protein OMP kuman *Salmonella pullorum* isolat lapangan ini kiranya perlu tindakan lanjut dengan melakukan penelitian sifat antigenik atau imunogeniknya.

#### Kesimpulan:

Dari hasil penelitian diatas dapat ditarik kesimpulan bahwa telah dapat dilakukan isolasi protein OMP dari kuman *Salmonella pullorum* isolat lapangan dan berat molekul berkisar antara 2 kDa sampai 45 kDa, dengan standard marker terdapat pada daerah 6,14,21,30 dan 46 kDa.

#### Daftar Pustaka

- Anonimus.1981.PenyakitPullorum.Pedoman Pengendalian Penyakit Menular.Jilid I.Cetakan ke-2.Direktorat Kesehatan Hewan.Direktorat Jenderal Peternakan.Departemen Pertanian RI.
- Aiy Ling.1998. Penentuan LD<sub>50</sub> dan ID<sub>50</sub> *Salmonella pullorum* pada anak Ayam Petelur yang di Infeksi Secara Oral dan Pengaruhnya Terhadap Gambaran Patologi Anatomi. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Darrel W.Trampel.2001. Pullorum Disease. Iowa State University. October 16.www.pullorum.com.4 December 2004.
- Hagans,W and D.W.Brunners.1994. Infectious Disease of Domestic Animals.7<sup>th</sup> Ed.Comstock Publishing Associated. Cornell University Press. Ithaca.London.

- Tabbu,C.R.2000. Penyakit Ayam dan Penanggulangannya.Vol. 1. Cetakan ke-1. Penerbit Yayasan Kanisius. Yogyakarta.
- Widjajanto,S.,A.Sadik dan A.R.Fedik.2000. Studi Awal Laboratoris Vaksin Inaktif *Salmonella pullorum* dengan Pengukuran Titer Antibodi Post Vaksinal.Laporan Hasil Penelitian

- Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM)-Unair.
- Wolfgang,R.M.,Billy and J.B. Andreas.2000.Competitive Exclusion of *Salmonella enteritidis* by *Salmonella gallinarum* in Poultry. J.Emerging Infectious Dis.Vol.6(5).Sept-Oct:443-448.