ANALISIS PROFIL PROTEIN *Staphylococcus aureus MULTIDRUG RESISTANCE* (MDR) DENGAN SDS-PAGE

Manuscript

Ani Mar'atus Solikhah
G1C014042

PROGRAM STUDI D IV ANALIS KESEHATAN

FAKULTAS ILMU KEPERAWATAN DAN KESEHATAN

UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SEMARANG

2018

http://repository.unimus.ac.id

PERNYATAAN PERSETUJUAN

Manuscipt dengan judul

ANALISIS PROFIL PROTEIN *Staphylococcus aureus MULTIDRUG RESISTANCE* (MDR) DENGAN SDS-PAGE

Telah diperiksa dan disetujui untuk dipublikasikan

Semarang, September 2018

Pembimbing I

Dr. Sri Darmawati, M.Si
NIK. 28.6.1026.040

Pembimbing II

Muhammad Evy Prastiyanto, M.Sc
NIK. 28.6.1026.297

http://repository.unimus.ac.id

SURAT PERNYATAAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama	: Ani Mar'atus Solikhah
NIM	: G1C014042
Fakultas/Jurusan	: FIKKES / DIV Analis Kesehatan
Jenis Penelitian	: Skripsi
Judul	: Analisis Profil Protein Staphylococcus aureus Multidrug Resistance (MDR) Dengan SDS-PAGE
Email	: ani125maraa@gmail.com

Dengan ini menyatakan bahwa saya menyetujui untuk :

1. Memberikan hak bebas *royalty* kepada Perpustakaan Unimus atas penulisan skripsi saya, demi pengembangan ilmu pengetahuan.
2. Memberikan hak menyimpan, mengalih mediakan/mengalih formatkan, mengelola dalam bentuk pangakalan data (database), mendistribusikannnya, serta menampilkannya dalam bentuk *softcopy* untuk kepentingan akademis kepada Perpustakaan Unimus, tanpa perlu meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta.
3. Bersedia dalam menjamin untuk menanggung secara pribadi tanpa melibatkan pihak Perpustakaan Unimus, dari semua bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran hak cipta dalam karya ilmiah ini.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan semoga dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Semarang, September 2018

Yang Menyatakan

Ani Mar'atus Solikhah

http://repository.unimus.ac.id

ANALISIS PROFIL PROTEIN *Staphylococcus aureus MULTIDRUG RESISTANCE* (MDR) DENGAN SDS-PAGE

Ani Mar'atus Solikhah[1], Sri Darmawati[2,3*], Muhammad Evi Prastiyanto[2]

[1]*Program Studi DIV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang*
[2]*Laboratorium Bakteriologi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang*
[3]*Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang*

Info Artikel

Keywords

Staphylococcus aureus, MDR, MRSA, Profil Protein, SDS-PAGE

Abstrak

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui profil total protein MRSA, *S.aureus* ATCC, *S.aureus* MDR 202 dan MDR 204 . Penelitian ini menggunakan 4 strain yaitu MRSA, *S.aureus* ATCC, *S.aureus* MDR 202 dan MDR 204 didapatkan dengan mengisolasi protein *S.aureus* dengan metode sonikasi, kemudian diseparasi dengan SDS PAGE 12%. Hasil analisa profil total protein menunjukkan jumlah pita protein yang bervariasi antara 28-32 pita protein dan dengan berat molekul yang bervariasi pula 15-180 kDa merupakan berat molekul yang dominan muncul pada *S.aureus* MRSA, *S.aureus* ATCC, dan *S.aureus* MDR. Bakteri strain MRSA didapatkan protein mayor 4 dan protein minor 26 pita. Pada strain ATCC didapatkan protein mayor 4 dan protein minor 24 pita. Sedangkan pada strain MDR 202 didapatkan protein mayor 5 dan protein minor 24 pita. Pada strain MDR 204 didapatkan protein mayor 6 dan protein minor 28 pita. Hasil ini menunjukkan adanya variasi dari spesies yang sama.

Pendahuluan

Penyakit infeksi merupakan penyakit yang menjadi masalah kesehatan di seluruh dunia termasuk Indonesia. Hal ini menjadi penyebab utama meningkatnya angka *morbidity* dan *mortalyti* (Purnomo dkk, 2012). Penyakit infeksi disebabkan oleh mikroba diantaranya virus, jamur, dan bakteri (Wadapurka *et al*., 2012). Bakteri menjadi penyebab utama terjadinya penyakit infeksi (Dibahl, 2014). Salah satu penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri adalah infeksi nosokomial. Prevalensi infeksi nosokomial pada negara berkembang bervariasi antara 5,7% -19,1%, dengan rata-rata lebih dari 10% angka kejadian (WHO, 2010). Di Indonesia pada tahun 2014, angka kejadian penyakit infeksi nosokomial disebabkan bakteri mencapai 148.703 kasus (Kemenkes RI, 2015).

Berdasarkan data WHO tahun 2002, 8,7% penyakit infeksi nosokomial disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*). Bakteri *S.aureus* merupakan flora normal yang terdapat pada tubuh manusia, akan tetapi bila melebihi jumlah normalnya pada tubuh manusia mengakibatkan bakteri tersebut bersifat patogen. Masuknya bakteri *S.aureus* ke dalam tubuh manusia dapat melalui luka yang terbuka, lingkungan Rumah Sakit, peralatan medis maupun non medis (Anies, 2006).

Penanganan yang dilakukan dalam mengatasi penyakit infeksi secara cepat yaitu dengan antibiotik. Penggunaan antibiotik yang tidak sesuai aturan menyebabkan bakteri menjadi resisten. Resistensi bakteri terhadap antibiotik merupakan ketidak mampuannya suatu antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Resistensi antibiotik memiliki pengaruh paling besar terhadap kesehatan manusia, setidaknya 2 juta orang

***Coresponding Author :**
Sri Darmawati
Pendidikan Diploma IV Analis Kesehatan, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang Indonesia 50273
E-mail: ciciekdarma@unimus.ac.id

http://repository.unimus.ac.id

mengalami infeksi oleh bakteri resisten terhadap antibiotik dan 23.000 orang meninggal setiap tahunnya akibat langsung dari infeksi tersebut (Frieden, 2013). Menurut Rossolini (2014) salah satu bentuk dari resitensi antibiotik yang cukup meresahkan adalah munculnya resistensi bakteri *S. aureus* terhadap antibiotik golongan *penicillin* atau *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Namun dalam perkembangannya muncul juga resisten terhadap golongan quinolon, aminoglikosida, tetrasiklin bahkan vaskomisin (Wang, 2007). *Multidrug-resistant* (MDR) merupakan suatu keadaan dimana bakteri resisten terhadap minimal terhadap satu jenis antibiotik dari ≥ 3 golongan antibiotik (Magiorakos dkk, 2012).

Resistensi *S.aureus* terhadap antibiotik disebabkan karena adanya gen penyandi resisten. Adanya beberapa gen penyandi sifat resisten *S.aureus* telah teridentifikasi diantaranya, gen *mecA* (metisilin/oxacillin), gen *blaZ* (penisilin), gen *aacA-D* (aminoglikosida), gen *tetK* dan *tetM* (tetrasiklin) (Hammad dkk, 2012). Berdasarkan Penelitian yang dilakukan oleh Ermawan tahun 2017, tentang profil protein bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) membuktikan adanya hubungan antar suatu protein dengan resistensi terhadap antibiotik didapatkan hasil berat molekul sebesar 84 KDa pada MRSA dan sebesar 13 KDa berat molekul pada *non MRSA*. Adanya penebalan pita pada *S.aureus* tipe *non MRSA* dan terpecah pada MRSA, karena adanya paparan antibiotik yang berlebihan, sehingga menyebabkan resisten antibiotik. Belum dilaporkan penelitian tentang profil protein terhadap *S.aureus multidrug resistant* di Indonesia. Oleh karena itu perlu di ketahui profil total protein pada *S.aureus* MDR isolat di wilayah Semarang .

Bahan dan Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah SDS-PAGE, dengan tahapan penelitian berupa uji resistensi antibiotik, isolasi protein *S.aureus* dan analisa protein dengan SDS-PAGE.

1. Peremajaan Strain bakteri *S.aureus*

Strain bakteri diuji dari laboratorium mikro UNIMUS Isolat bakteri *S.aureus* pada media BAP diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Subkultur isolat *S. aureus* akan tumbuh bewarna kuning dan menghasilkan zona jernih disekitar koloni (β-hemolisa). Koloni diuji sifat bioloisnya dengan uji katalase, oksidase, koagulase dan MSA. Setelah itu dimasukan ke NaCl fisiologis sampai kekeruhan menyerupai standar Mc. Farland 0,5%. Suspensi koloni tersebut dipipet 100 µl kemudian diratakan pada media MHA. Ditunggu 10-15 menit, letakan antibiotik antara lain Sulphametoxazole, Fosfomysin, Oxacilin, Vancomysin, Gentamisin, Tetracycline. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Dilakukan uji resistensi terhadap berbagai macam antibiotik disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Data uji resisiten strain *S.aureus*

No	Sampel	Antibiotik Resisten
1	MRSA	Gentamisin, Oxacilin, Tetracycline
2	*S.aureus* MDR 202	Benzylpenicillin, Amoxicillin, Carbencillin, Ticarcillin, Aziocillin, Meziocillin, Piperacillin, Tetracycline
3	*S.aureus* MDR 204	Benzylpenicillin, Amoxicillin, Carbencillin, Ticarcillin, Aziocillin, Meziocillin, Piperacillin, Tetracycline

2. Isolasi Protein *S.aureus*

Kultur bakteri selanjutnya disentrifus dingin pada suhu 4^0C dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan cara disuspensikan menggunakna PBS 1x pH 7,4 pencucian dilakukan sebanyak 3 kali, kemudian pencucian terakhir pelet diresuspensikan dalam 500 ml PBS dengan pH 7,4. Suspensi bakteri di masukkan dalam wadah berisi air es, kemudian dilakukan sonikasi 6 - 8 kali dalam

http://repository.unimus.ac.id

waktu 4 menit dengan waktu tenggang 30 detik pada suhu 4^0C. Hasil suspensi bakteri yang sudah di sonikasi kemudian disentrifus pada suhu 4^0C dengan kecepatan 12000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh adalah protein terlarut sel yang siap diukur konsentrasi proteinnya menggunaka reagen biorad protein assay. Pengukuran konsentrasi protein, dilakukan pembuatan blanko 1000 µL, menggunakan 800 µL H_2O ditambah 200 µL reagen biorad protein assay. Kemudian untuk sampel menggunakan protein terdapat pada *S.aureus* yang diambil sebanyak 2 µL lalu ditambahkan H_2O 798 µL dan reagen biorad sebanyal 200 µL, lalu dihomogenkan dan diinkubasi selama 5 menit, kemudian dibaca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595nm untuk mendapatkan konsentrasi total protein.

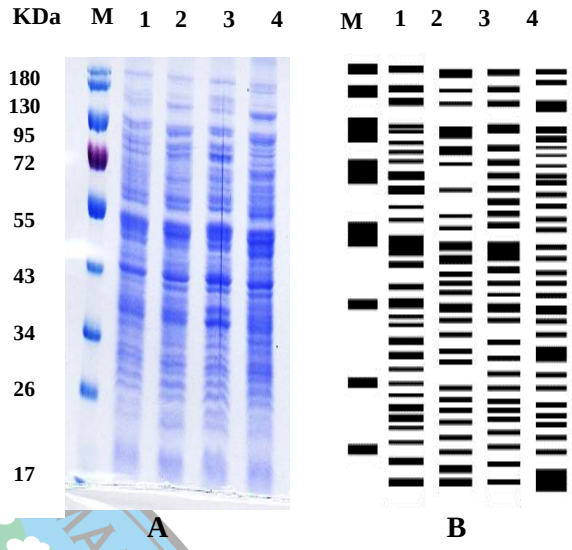
3. Analisa Protein dengan SDS-PAGE

Dimasukkan spating gel pada glas plat, tunggu hingga polimerisasi. masukkan stacking gel diatas separating gel dengan cepat kemudian dimasukkan sisir diatasnya secara berlahan. Setelah terjadinya polimerasi dimasukkan kedalam alat elektroforesis. Running buffer dimasukkan kedalam chamber, kemudian pipet sampel dimasukkan sumuran yang telah disediakan masing-masing sebanyak 25 µL, alat tersebut kemudian dihubungkan denga aliran listrik dengan tegangan 100 volt, setelah *bromophenol blue* mencapai dasar stacking gel tegangan ditambah menjadi 200 volt, aliran listrik setelah *bromophenol blue* mencapai dasar separating gel. Kemudian gel dikeluarkan dan dimasukkan kedalam larutan pewarna dengan 0,1% *Commasie Brilliant Blue R-250* selama 30-60 menit hingga pita protein terwarnai.

Hasil

Hasil uji resistensi 3 sampel *S.aureus* menunjukkan resistensi terhadap berbagai antibiotik dan mempunya sifat fisiologis yang berbeda pada sampel *S.aureus* MDR 202 Uji Urea negatif (-) dan pada sampel S.aureus MDR 204 positif (+).

Hasil profil protein dari bakteri MRSA, *S.aureus* ATCC, *S.aureus* MDR 202 dan MDR 204, setelah diseparasi dengan menggunakan SDS-PAGE 12% menunjukkan hasil sesuai dengan Gambar 1.



Gambar 1. (A). Hasil SDS-PAGE 12% : M. Marker 17-180 KDa ; Sampel 1. MRSA; 2. ATCC; 3. MDR (202); 4. MDR (204). (B). Visualisasi SDS-PAGE 12% bakteri *S.aureus* MRSA, ATCC, MDR 202, dan MDR 204 pada isolat PUS.

Berdasarkan Gambar 1. diketahui bahwa Jumlah Sub Unit Protein Pada 4 strain *S.aureus* disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Jumlah Sub Unit Protein pada 4 strain *S.aureus*

Sub Unit Protein	*S.aureus* MRSA	*S.aureus* ATCC	*S.aureus* MDR 202	*S.aureus* MDR 204
Mayor	4	4	5	6
Minor	26	24	24	26
Jumlah pita	30	28	29	32

Menunjukkan dari 4 strain yaitu *S.aureus* MRSA, *S.aureus* ATCC, *S.aureus* MDR 202, dan *S.aureus* MDR 204, diketahui memiliki jumlah pita protein yang berbeda-beda antara 28-32 pita protein dengan berat molekul (BM) yaitu 15-180 KDa. Hasil ini menunjukkan adannya kespesifikan dari spesies yang sama namun memiliki pita protein yang berbeda.

http://repository.unimus.ac.id

Diskusi

Pada penelitian ini menggunakan metode sonikasi dengan frekuensi tinggi guna mendapatkan protein yang terdapat di dalam sel. Sonikasi frekuensi tinggi merupakan metode yang banyak digunakan untuk menghancurkan sel dan organela pada bakteri. Gelombang suara dengan frekuensi tinggi adalah metode yang efektif untuk merusak sel pada mikroorganisme. Efesiensi perusakan sel dipengaruhi oleh kekuatan yang dipakai pada instrument, durasi pemaparan dan volume material proses. Pendinginan untuk mencegah terjadinya peningkatan panas (Koolman & Roehm 2005), jika terlalu panas maka protein yang didapat akan mengalami kerusakan. Elektroforesis SDS-PAGE merupakan teknik pemisahan yang memisahkan rantai polipeptida pada protein berdasarkan kemampuannya bergerak dalam medium konduksi yang biasanya merupakan larutan buffer dan berdasarkan beratmolekul yang bermuatan dibawah pengaruh medan listrik (Tanjung & Kusnadi 2014). Protein dapat terpisah karena adanya proses pemanasan. Molekul-molekul dari protein akan bermigrasi dari kutub negatif menuju kutub positif dengan adanya aliran listrik. Pemisahan molekul protein berdasarkan tingkat migrasi dan berat molekulnya (Wibowo, 2010). Semakin tinggi berat molekulnya maka akan semakin lambat migrasi menuju kutub positif sehingga nilai tertinggi berat molekulnya berada diatas.

Hasil penelitian menunjukkan profil protein bakteri *S.aureus* dengan jumlah pita protein yang berbeda-beda antara lain pada strain MRSA dengan jumlah 30 pita protein. Pada strain kedua Non MRSA dengan jumlah 28 pita protein. Sedangkan pada strain ketiga MDR 202 dengan jumlah 29 pita protein. Pada strain keempat MDR 204 dengan jumlah 32 pita protein. Strain MRSA, Non MRSA, MDR 202 dan MDR 204 menunjukkan jumlah pita protein yang berbeda-beda antara lain 28 – 32 pita dengan Berat Molekul 15 – 180 kDa, dengan berat molekul tertinggi pada strain MRSA, Non MRSA, MDR 202 dan MDR 204 yaitu 180 kDa, dan Berat Molekul terendah 15 kDa terdapat pada *S.aureus* strain MDR 204. Adanya penebalan pita pada *S.aureus* strain MDR 204 dan terpecah pada *S.aureus* strain Non MRSA, karena disebabkan oleh paparan antibiotik yang berlebih, sehingga menyebabkan resisten bakteri terhadap antibiotik. Dan terjadinya resistensi karena berbagai hal antara lain : mutasi DNA, Transformasi, Konjugasi dan adanya suatu gen penyandi resisten. Proses tersebut merupakan mekanisme resistensi mikroba terhadap antibiotik yang dapat merubah struktur dari komponen bakteri (Ermawan, 2017).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Chambers (1997) menyatakan bahwa Berat Molekul (BM) *S.aureus* strain MRSA dan Non MRSA adalah 75-45 kDa, adanya perubahan ekspresi band protein *S.aureus* MRSA dengan Non MRSA disebabkan karena adanya suatu sisipan suatu elemen DNA berukuran antara 20 – 100 kb yang disebut dengan *Staphylococcus Cassette chromosome mec* (SCCmec). Dengan adanya sisipan elemen tersebut, maka ekspresi protein pada bakteri *S.aureus* ikut berubah. SCCmec merupakan gen penyandi PBP2 menjadi PBP2a, karena PBP2a memiliki afinitas yang sangat rendah sehingga ekspresi band protein sangat tipis. Menurut Darmawati (2005) menyatakan bahwa adanya perbedaan sub unit protein tersebut disebabkan karena perbedaan genetik dari isolat yang berbeda, karena protein merupakan refleksi dari genom sehingga pada strain yang berbeda dan genetik berbeda pula maka refleksi protein yang dihasilkan juga akan berbeda.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang Profil Total Protein pada 4 strain bakteri *S.aureus* (*S.aureus* MRSA, *S.aureus* ATCC, *S.aureus* MDR 202 dan *S.aureus* MDR 204), hasilnya dapat disimpulkan bahwa dari hasil SDS-PAGE 12% dijumpai adanya jumlah pita protein yang bervariasi antara 28 – 32 pita protein dengan Berat Molekul (BM) yang bervariasi pula 15 – 180 KDa dan adanya perbedaan ekspresi pita protein pada *S.aureus*

http://repository.unimus.ac.id

MRSA, *S.aureus* ATCC, *S.aureus* MDR 202 dan *S.aureus* MDR 204.

Daftar Pustaka

Anies, 2006. Manajemen Berbasis Lingkungan. Jakarta, Gramedia.

Darmawati, S. & Haribi, R., 2005. Analisis Protein Pilli *Salmonella typhi* Isolat RS.Kariadi Dengan Elektroforesis SDS-PAGE. Jurnal Litbang Universitas Muhammadiyah Semangat, 2(3),pp. 1-4.

Ermawan, 2017. Profil Total Protein *Staphylococcus aureus (Methycillin-Resisten Staphylococcus aureus).*

Frieden, T., 2013. The Threat of Antibiotic Resistance, dalam: *Antibiotic Resistance Threats in The United States*. US Departement of Health and Human Services, United States.

Hammad, A. M., Watanabe, W., Fujii, T., and Shimamoto, T., 2012. *Occurrence and characteristics of methicillin-resistant andsusceptible Staphylococcus aureus and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-toeat raw fish*. Int. *J. Food Microbiol*. 156(3),286-289.

Koolman, J. & Roehm, K.., 2005. *Color Atlas of Biochemistry 2nd edition revised and enlarged.*

Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B.,Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., dkk., 2012. *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrugresistant bacteria: an international expert proposal for interim standard*.

Purnomo, Sri Wisnu Andaru, Prabowo. 2012. Hubungan Tingkat Pengetahuan Perawat Tentang *Universal Precaution* Dengan Pelaksanaan *Universal Precaution* Di Instalasi Rawat Inap RSUD Majenang. Yogyakarta: Universitas Respati Yogyakarta.

Rucha M. Wadapurkar, Shilpa, M.D, Anil Kumar S. Katti, M.B. 2012. *Sulochana. In silico drug design for Staphylococcus aureus and development of host-pathogen interaction network.*

Tanjung, Y.L.R. & Kusnadi, J., 2014. Biskuit Bebas Gluten dan Bebas Kasein Bagi Penderita Autis. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(1), pp.11-12.

http://repository.unimus.ac.id