

# KADAR PROTEIN *Klebsiella pneumoniae* HASIL PEMANASAN 65°C

Irawan Sugoro\*, Devita Tetriana

Badan Tenaga Nuklir Nasional

\*Corresponding author: irawans@batan.go.id

## Abstract

*Klebsiella pneumoniae* is one of a coliform bacteria that causing mastitis. This disease were founded in dairy cows and can be prevented by vaccination. The research has been conducted to determine the inactive times, the protein concentration and profile of *K. pneumoniae* which inactivated by heating of 65°C as material of mastitis vaccine. The cells culture inactivated by the different times, i.e. 0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes. The inactive times was determined by the drop test method, whereas the protein concentration of cells were determined by Lowry method. The results showed that the inactive times occurred after 30 minute, and has a significant different on the protein concentration of bacteria cells that inactivated by the different times.

**Keywords:** Vaccine, protein, *Klebsiella pneumoniae*, heating 65°C

---

## PENDAHULUAN

Salah satu faktor yang mempengaruhi produktivitas sapi perah adalah faktor kesehatan. Penyakit yang sering menyerang ternak perah dan erat kaitannya dengan air susu ini antara lain mastitis. Mastitis adalah suatu peradangan pada tetanus ambing yang dapat disebabkan oleh mikroorganisme, zat kimia, luka termis ataupun luka karena mekanis. Peradangan ini menyebabkan penurunan kualitas dan produksi susu (Fox & Mc Sweeney, 1998).

Penyakit mastitis, salah satunya dapat disebabkan oleh bakteri dari jenis koliform. Bakteri koliform banyak menginfeksi ambing sapi karena banyak terkandung di dalam feses. Bakteri yang berasal dari feses dapat masuk ke ambing melalui lubang atau kanal puting saat pemerahan atau ketika sapi duduk di lantai kandang (Hogan & Smith, 2002).

Cara yang biasa dilakukan untuk mengobati penyakit mastitis adalah dengan pemberian antibiotik. Pengobatan ini dapat menimbulkan resistensi pada mikroba dan adanya residu pada susu, sehingga perlu mencari alternatif lain untuk mencegah penyakit ini (Kirk *et. al.*, 1994). Salah satunya adalah pembuatan vaksin. Sampai saat ini, sebagian besar vaksin yang beredar di Indonesia berasal dari impor dengan kisaran

pasar 60-70%. Oleh karena itu, upaya pengembangan bahan vaksin di dalam negeri memiliki nilai strategis dan peluang bisnis (Soeripto, 2002). Ketergantungan akan vaksin impor dapat berakibat pada menurunnya cadangan devisa negara dan juga dapat memungkinkan masuknya penyakit hewan melalui kontaminasi agen penyakit pada vaksin yang diimpor. Hal yang lebih berbahaya lagi adalah timbulnya efek mutasi pada vaksin aktif yang dapat mengakibatkan terjadinya penyakit baru (Mellenberger, 1997; Ruegg, 2001).

Penelitian ini menggunakan bakteri *Klebsiella pneumoniae* hasil isolasi dari susu sapi perah berasal dari Garut yang terinfeksi mastitis yang telah terseleksi (Sugoro, 2004). Isolat ini mendominasi setiap sampel susu yang terinfeksi mastitis dengan level berbeda. Isolat *K. pneumoniae* yang berhasil diisolasi sebanyak 12 strain dan yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain *K. pneumoniae* dari level mastitis positif 3 (isolat K3) atau mastitis akut. Isolat ini memiliki tingkat resistensi antibiotik tinggi (Sugoro & Tetriana, 2007).

Pembuatan vaksin dapat dilakukan dengan menggunakan metode konvensional, yaitu dengan pemanasan, radiasi atau kimia. Pada penelitian ini akan digunakan metode

pemanasan untuk inaktivasi sel bakteri dengan suhu 65°C. Pemilihan suhu tersebut didasarkan pada penelitian vaksin *Brucella abortus* oleh Sanakkalaya *et al.* (2005). Dipilihnya metode pemanasan karena memiliki keuntungan dalam hal mudah dan murah dalam proses pembuatannya dibandingkan metode lainnya. Kualitas bahan vaksin salah satunya ditentukan oleh keberadaan antigen, yaitu protein pada sel bakteri. Terdapat kemungkinan inaktivasi sel bakteri *K. pneumoniae* dengan pemanasan akan menyebabkan perubahan pada jumlah dan struktur protein.

Berdasarkan uraian di atas maka tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan waktu pemanasan untuk inaktivasi sel bakteri *K. pneumoniae* dan mengetahui pengaruh waktu inaktivasi pemanasan terhadap kandungan protein ekstraseluler dan intraseluler dari isolat bakteri *K. pneumoniae*.

## MATERIAL DAN METODE

Bakteri yang digunakan adalah *Klebsiella pneumoniae* (isolat K3) dari Laboratorium Pernakan-BATAN. Bahan yang digunakan adalah *Tryptic Soy Broth* (TSB) Pronadisa<sup>®</sup>, *Tryptic Soy Agar* (TSA) Pronadisa<sup>®</sup>, aseton, NaCl 0,85%, larutan Lowry I (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4,9 ml dalam NaOH 0,1 N), larutan Lowry II (Folin dan akuadest (1:1) dan standar BSA. Alat utama yang digunakan adalah inkubator *shaker* (SM 25<sup>®</sup>), Sonikator (Branson<sup>®</sup> 2210) dan Spektrofotometer (WPA & Ultrospec 100 pro Amersham Biosciences<sup>®</sup>).

### Pembuatan Kurva Tumbuh Bakteri *Klebsiella pneumoniae* untuk Penentuan Fase Mid Log

Kultur bakteri berumur 24 jam dalam TSA miring, diinokulasikan sebanyak 3 ose ke dalam medium TSB dan diinkubasi pada suhu kamar dan agitasi pada 120 rpm selama 1 hari untuk memperoleh kultur inokulum. Kandungan sebanyak 10 % v/v (10<sup>6</sup> sel/ml) dari kultur inokulum diinokulasikan ke dalam 30 ml medium TSB dan diinkubasi pada suhu kamar dan agitasi pada 120 rpm. Pencuplikan dilakukan pada menit ke-0, 30, 60, 120, 180, 240 dan 300 untuk pengukuran absorbansi

dengan menggunakan spektrofotometer pada  $\lambda_{660\text{nm}}$ . Kultur pada fase eksponensial dihitung jumlah selnya dengan teknik *droptest* dalam medium TSA di cawan petri. Caranya, dilakukan pengenceran pada kultur fase eksponensial, lalu diinokulasikan sebanyak 10  $\mu\text{l}$  ke dalam medium TSA. Selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 1 hari, dan diukur nilai absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer pada  $\lambda_{660\text{nm}}$ .

### Inaktivasi Bakteri *K. pneumoniae* dengan Pemanasan

Kultur pada fase mid log disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm dan suhu 1°C selama 10 menit. Kemudian kultur dibilas dengan NaCl 0,85% sebanyak 2 kali. Supernatan yang diperoleh diencerkan hingga diperoleh jumlah sel 10<sup>12</sup> sel/ml dan ditempatkan di tabung inkubasi (yellow) sebanyak 5 ml. Selanjutnya dipanaskan dalam inkubator selama 0, 5, 10, 15, 30, 45 dan 60 menit. Kultur hasil pemanasan kemudian dihitung jumlah selnya dengan teknik *droptest* untuk uji inaktivasi.

### Pengukuran Protein Sel Bakteri *K. pneumoniae* dengan Metode Lowry

Kultur hasil pemanasan diukur kandungan protein ekstraseluler dan intraseluler. Sampel untuk mengetahui kandungan protein ekstraseluler langsung menggunakan kultur hasil pemanasan, sedangkan untuk protein intraseluler diketahui dengan didapatkannya jumlah protein total. Jumlah protein total didapatkan dengan cara dipecah terlebih dahulu dengan melarutkan kultur hasil pemanasan ke dalam aseton (1:9) dan disonikasi selama 10 menit. Sampel sebanyak 1 ml ditambahkan 5 ml larutan Lowry I dan dibiarkan selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 0,5 ml larutan Lowry II dan dibiarkan selama 30 menit. Dibaca dengan spektrofotometer pada  $\lambda_{750\text{nm}}$ . Absorbansi yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar BSA untuk diketahui kadar protein.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kurva Tumbuh Sel Bakteri *K. pneumoniae*

Hasil kurva tumbuh menunjukkan hanya terdapat dua fase pertumbuhan yaitu fase logaritma dan fase stasioner (Gambar 1). Fase logaritma terjadi hingga menit ke-200, dan setelah itu langsung memasuki fase stasioner. Pertumbuhan bakteri ini dapat dilihat dari perubahan nilai absorbansi yang didapat setelah dilakukan pengukuran pada menit yang berbeda. Kurva pertumbuhan bakteri terdiri dari suatu periode awal yang tampaknya tanpa pertumbuhan (fase kelambatan atau fase adaptasi) diikuti oleh suatu periode pertumbuhan yang cepat (*fase log*), kemudian mendatar (*fase stasioner*) dan akhirnya diikuti oleh suatu penurunan populasi sel hidup (fase kematian). Pada kurva ini, tidak terdapat fase adaptasi (*lag phase*). Hal ini terjadi karena sebelumnya bakteri yang digunakan telah ditumbuhkan pada medium yang sama, sehingga bakteri tersebut tidak memerlukan adaptasi terlebih dahulu pada medium pertumbuhannya. Oleh karena itu, pada kurva tumbuh tersebut fase adaptasinya tidak teramati (Tri dkk., 2008). Adanya interaksi positif antar sel mikroba dan berlimpahnya nutrisi menyebabkan kecepatan pertumbuhan sel mikroba menjadi lebih tinggi (Suriawiria, 2005).

Kurva tumbuh ini digunakan untuk menentukan fase mid log. Fase mid log merupakan suatu fase pertumbuhan dimana terjadi kecepatan pembelahan tertinggi. Fase ini diperlukan karena pada fase inilah nantinya akan dilakukan pemanasan terhadap sel bakteri. Fase ini terjadi pada menit ke-150, dengan kecepatan pertumbuhan berdasarkan nilai absorbansi adalah 0,0037/menit. Fase mid log digunakan karena sel-sel bakteri dalam kondisi aktif melakukan metabolisme.

### Penentuan Waktu Inaktivasi Sel *K. pneumoniae* dengan Pemanasan

Pemanasan pada suhu 65°C dengan waktu yang berbeda pada kultur bakteri menunjukkan adanya penurunan jumlah sel yang hidup sebanding dengan bertambahnya waktu (Gambar 2). Waktu yang diperlukan untuk menginaktivasi sel bakteri *K. pneumoniae* yaitu setelah 30 menit. Kondisi

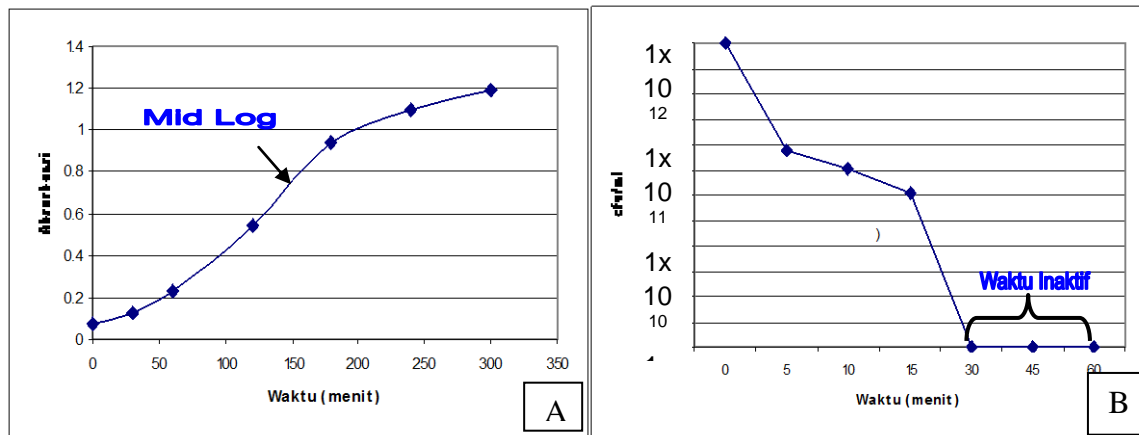
inaktif dapat terjadi karena terganggunya metabolisme sel yang menyebabkan sel bakteri tidak mampu bereplikasi atau hilangnya kemampuan membelah diri. Metabolisme sel diatur oleh enzim yang komponen utamanya adalah protein.

Kebanyakan protein merupakan suatu enzim yang berfungsi sebagai katalisator, yang bersifat sangat peka terhadap perubahan lingkungannya. Aktivitas protein banyak tergantung pada struktur dan konformasi molekul protein yang tepat. Apabila konformasi protein berubah, salah satunya oleh perubahan suhu, maka aktivitas biokimiawinya berkurang. Perubahan konformasi alamiah menjadi suatu konformasi yang tidak menentu merupakan suatu proses yang disebut denaturasi. Proses denaturasi ini biasanya dapat berlangsung secara reversibel ataupun tidak reversibel. Protein akan mengalami koagulasi apabila dipanaskan pada suhu 50°C atau lebih (Walsh dan Headon, 1997).

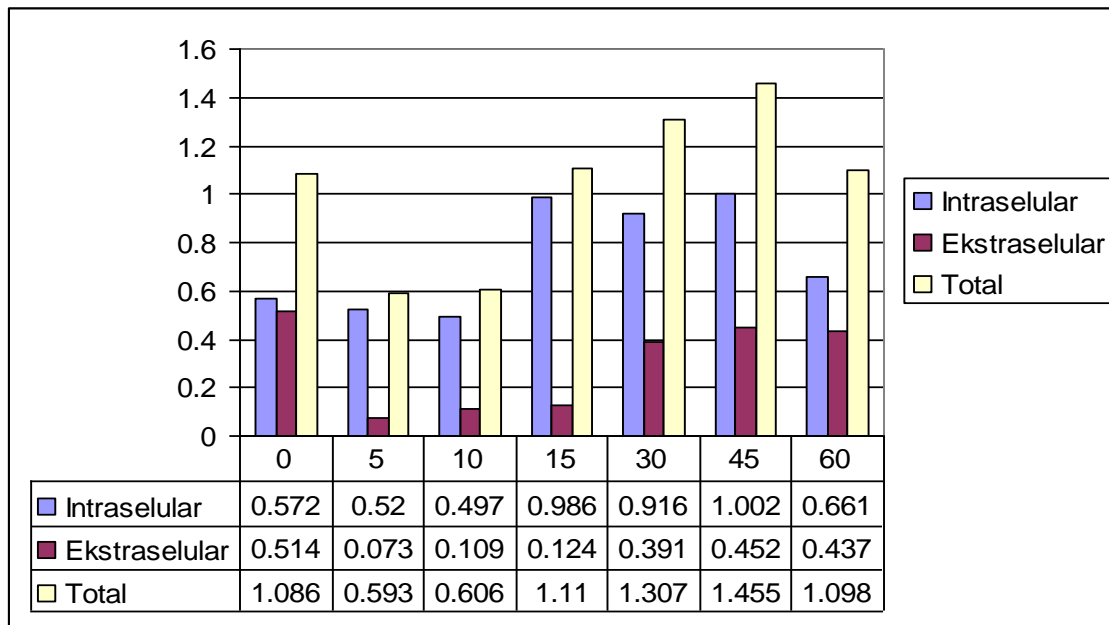
Akibat penting dari denaturasi protein adalah protein yang bersangkutan hampir selalu kehilangan aktivitas biologinya. Denaturasi protein dapat diakibatkan bukan hanya oleh panas, tetapi juga oleh pH ekstrim oleh beberapa pelarut organik seperti aseton (Stryer, 2000). Uji langsung memperlihatkan bahwa jika protein mengalami denaturasi, tidak ada ikatan kovalen pada kerangka rantai polipeptida yang rusak. Hal ini berakibat deret asam amino khas protein tersebut tetap utuh setelah denaturasi. Namun demikian, aktivitas biologinya hampir semua protein menjadi rusak (Ophardt, 2003).

### Pengukuran Kadar Protein Sel *K. pneumoniae* dengan Metode Lowry

Protein merupakan komponen utama dalam semua sel hidup, dan merupakan komponen terbesar setelah air. Protein mempunyai peranan yang sangat penting. Fungsi utamanya sebagai zat pembangun atau pembentuk struktur sel dan mempunyai fungsi khusus, yaitu enzim (Seidman dan Mowery, 2006). Gambar 3 menunjukkan adanya perbedaan konsentrasi protein *K. pneumoniae* akibat pemanasan. Hasil statistik



**Gambar 1.** Kurva pertumbuhan bakteri *K. pneumoniae* dalam medium TSB yang diinkubasi pada suhu ruang dan diagitasi pada 120 rpm (A) serta kurva jumlah sel bakteri *K. pneumoniae* terhadap waktu inaktivasi dengan pemanasan (B)



**Gambar 2.** Histogram kadar protein *K. pneumoniae* terhadap waktu pemanasan pada suhu 65°C

menunjukkan bahwa adanya perbedaan nyata kadar protein intraseluler hasil pemanasan selama 15, 30, dan 45 menit terhadap kontrol (0 menit). Terjadi pula perbedaan nyata kadar protein ekstraseluler hasil pemanasan selama 5, 10 dan 15 menit terhadap kontrol. Kemudian pada kadar protein total, terjadi perbedaan nyata hasil pemanasan selama 15, 30, 45 dan 60 menit terhadap kontrol. Kadar protein ekstraseluler cenderung lebih rendah daripada protein intraseluler. Hal ini disebabkan pembentukan protein ekstraseluler tergantung dari protein intraseluler yang berupa enzim-enzim pembentuk protein ekstraseluler.

Kadar protein intraseluler mengalami penurunan hingga pemanasan selama 10menit, lalu kembali meningkat pada pemanasan selama 15 hingga 45menit, sedangkan pada pemanasan selama 60 menit kembali menurun. Pada protein ekstraseluler, kadar menurun pada pemanasan selama 5 menit, lalu meningkat pada pemanasan selama 10 hingga 45 menit. Meningkatnya kadar protein disebabkan inaktivasi dengan pemanasan hanya merusak kemampuan membelah diri bakteri, sedangkan sintesis protein tetap dapat berlangsung karena lisosom sebagai tempat sintesis protein tidak

dirusak. Sintesis protein yang terjadi memungkinkan dihasilkannya *Heat Shock Protein* (HSP) dengan adanya pemanasan, sehingga menyebabkan meningkatnya kadar protein pada sel bakteri.

HSP adalah satu kelompok protein yang jumlahnya meningkat bila sel-sel diberi perubahan suhu atau tekanan lain. Peningkatan ini diatur secara transkripsional. Pengaturan dramatis dari HSP ini kebanyakan diinduksi oleh *Heat Shock Faktor* (HSF), yang merupakan salah satu kunci terhadap tanggapan kejutan panas (*Heat Shock Response*) (Ang dkk, 1991).

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil di atas maka dapat disimpulkan bahwa waktu pemanasan yang diperlukan untuk menginaktivasi sel bakteri *K. pneumoniae* adalah lebih dari 30 menit. Waktu pemanasan mempengaruhi kandungan protein intraselular dan ekstraselular sel bakteri *K. pneumoniae*. Kadar protein intraselular sel lebih besar dibanding protein ekstraselular.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ang, D., Liberek., K., Skowyra., D., Zylitz, M. & Georgeopoulos, C. (1991). Biological Role and Regulation of The Universally Conserved Heat Shock Proteins. *J Biol Chem.* 266. 24233-24236 (akses 02 April 2008, pukul 15.30 WIB)
- Fox, P. F. & McSweeney, P. L. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London: Blackie Academic and Professional.
- Goldman, B. (2002). Heat Shock Proteins Vaccine Potential: from Basic Science Breakthroughs to Feashible Personalized Medicine. *Journal*. [http://www.antigenics.com/whitepapers/HSP\\_potential.html](http://www.antigenics.com/whitepapers/HSP_potential.html) (akses 02 April 2008, pukul 14.20)
- Hogan, J., and K. L. Smith. 2002. *Coliform Mastitis*. Ohio, U.S.A.: The Ohio State University, Wooster.
- Kirk, J. H., De Graves. F., & Tyler, J. (1994). Recent Progress in: Treatment and Control of Mastitis in Cattle. *JAVMA* 204. 1152-1158 (akses 13 Desember 2007, pukul 17.10).
- Mellenberger, R. (1997). Vaccination against Mastitis. *J Dairy Sci.* 60(6). 1016-1021 (akses 3 Desember 2007 pukul 11.20 WIB)
- Ruegg, P. L. (2001). *Evaluating the Effectiveness of Mastitis Vaccines*. University of Wisconsin-Madison.
- Sanakkalaya, N., Sokolovska, A., Gulain, J., Hogenesch, H., Sriranganthan, N., Boyle, S., Schurig, G., & Vemulapalli, R. (2005). Induction of antigen specific Th1-type Immune Responses by Gamma Irradiated recombinant *Brucella abortus* RB51. *Clinical and diagnostic laboratory immunology, American Society for Microbiol.* 12(12).
- Seidman, L., & J. Mowery. (2006). Chapter 2: Protein Structure. *Article*. <http://matcmadison.edu>. (akses 07 Agustus 2008, pukul 14.10 WIB)
- Soeripto. (2002). Pendekatan konsep kesehatan hewan melalui vaksinasi. *J Litbang Pertanian*, 21(2) (akses 6 Februari 2008, pukul 14.00 WIB)
- Stryer, L. (2000). *Biochemistry*, Four Edition. Alih Bahasa Indriati P. H. Jakarta: EGC.
- Sugoro, I. (2004). Pengontrolan Penyakit Mastitis dan Manajemen Pemerahan Susu. *Artikel*. PATIR-BATAN. Jakarta.
- Suriawiria, U. (2005). *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Penerbit Papas Sinar Sinanti.
- Susilorini, T. (2006). *Produk Olahan Susu*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Tetriana, D., & Sugoro. I. (2007). Vaksin Radiasi Coliform Mastitis. *Laporan Penelitian*. PATIR-BATAN.
- Tri, T. S., Nastiti, S. J., & Sutaningsih, A. E. (2008). *Mikrobiologi Umum*. Yogyakarta: Universitas Atma Jaya.
- Walsh, G., & Headon, D. R. (1997). *Protein Biotechnology*. New York: John Wiley and Sons.