

Profil Protein *Escherichia coli* Hasil Inaktivasi Iradiasi Gamma Sebagai Bahan Vaksin Mastitis

¹S. Hermanto*, ²I. Sugoro, ¹Ikmalia

¹Program Studi Kimia FST UIN Syaif Hidayatullah Jakarta

²Pusat Aplikasi Tenaga Isotop dan Radiasi - BATAN

Shmt75@yahoo.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil protein *Escherichia coli* hasil iradiasi gamma sebagai bahan vaksin mastitis inaktif. Kultur sel (10^8 sel/ml) diinaktivasi dengan dosis radiasi sebesar 600, 700, 800, 900 dan 1000 Gy. Kultur sel dianalisis kandungan protein intraselular dan ekstraselular dengan metode Lowry. Profil protein dianalisis dengan menggunakan SDS-PAGE dengan konsentrasi gel 10% dan standar berat molekul kisaran 10 – 220 kDa. Hasil percobaan menunjukkan bahwa tidak terjadi perubahan kadar protein intraselular dan ekstraselular secara signifikan dengan semakin tingginya dosis iradiasi, demikian pula dengan jumlah pita protein, tetapi intensitas setiap pita menunjukkan adanya perbedaan. Perbedaan intensitas protein tertinggi terjadi pada dosis 900 dan 1000 Gy. Hal ini menunjukkan bahwa iradiasi gamma mampu menginaktivasi sel bakteri tetapi tidak merusak protein secara total sebagai salah satu bahan antigen vaksin.

Kata kunci : Vaksin, Protein, *Escherichia coli*, dan iradiasi gamma

Abstract

The experiment has been conducted to study the profile of *Escherichia coli* protein which was irradiated by gamma rays as inactive mastitis vaccine. Cells culture (10^8 cells/ml) was irradiated with doses 600, 700, 800, 900 and 1000 Gy. The cell culture was analyzed for total intracellular and extracellular protein by Lowry method. The protein profile was analyzed by SDS-PAGE with 10% gel concentration and standard of molecular weight was 10 – 220 kDa. The results showed that the total intracellular and extracellular protein unaffected significantly with increasing of doses and so do the protein bands, but the intensity of bands was different. The highest intensity occurred on doses 900 and 1000 Gy. This result showed that the gamma irradiated could be inactivated the bacteria cell but couldn't change the protein totally as one of vaccine antigen.

Key words : Vaccine, protein, *Escherichia coli* and gamma irradiated.

1. PENDAHULUAN

Susu merupakan komoditas utama pada usaha ternak sapi perah rakyat. Produksi susu dapat terganggu apabila kondisi ambing (kelenjar susu) bagian dalam dari susu sapi perah mengalami peradangan akibat infeksi oleh mikroba yang dikenal sebagai mastitis. Ada 3 faktor penyebab yang mempermudah terjadinya mastitis, yaitu kondisi sapi sebagai inang, kondisi lingkungan yang buruk dan mikroorganisme sebagai agen penyebab penyakit (Ikmalia, 2008).

Penyakit mastitis dapat disebabkan oleh

bakteri coliform, seperti *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, dan masih banyak lagi. Selama ini pengobatan penyakit mastitis banyak dilakukan melalui pemberian antibiotik yang dampaknya bisa menimbulkan resistensi pada mikroba dan adanya residu pada susu. Dengan demikian perlu dicari alternatif lainnya untuk mencegah penyakit tersebut. Salah satu alternatif pencegahan penyakit mastitis yang sedang dikembangkan saat ini adalah melalui pemberian vaksin. Vaksin digunakan untuk mencegah masuknya mikroorganisme patogen yang merugikan, sehingga cara ini banyak

digunakan oleh para peternak sapi (Ruegg P., 2001).

Sampai saat ini, sebagian besar vaksin masih diimpor dengan kisaran pasar 60 – 70 %. Oleh karena itu upaya pengembangan bahan vaksin di dalam negeri memiliki nilai strategis dan peluang bisnis. 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 lebih berbahaya lagi adalah timbulnya efek mutasi pada vaksin aktif yang dapat mengakibatkan terjadinya penyakit baru (Tetriaana dan Sugoro, 2007).

Vaksin dapat diperoleh dengan cara konvensional, baik secara kimia maupun pemanasan. Alternatif lainnya dengan menggunakan radiasi sinar gamma untuk menginaktivasi sel bakteri. Metode inaktivasi dengan sinar gamma memiliki efektifitas dalam peningkatan respon imun dibandingkan dengan teknik konvensional, seperti pemanasan (Arifin, M., 2006).

Dalam percobaan ini digunakan bakteri *E. coli* hasil isolasi dari susu sapi perah yang terinfeksi mastitis. Percobaan sebelumnya menunjukkan, bahwa isolat bakteri ini dapat diinaktivasi dengan radiasi gamma pada kisaran dosis 600 – 1000 Gy (Tetriaana dan Sugoro, 2007). Salah satu bagian sel bakteri yang berperan sebagai faktor virulensi adalah protein (Gibco, 2000). Melalui teknik iradiasi ini diharapkan bakteri *E. coli* sebagai organisme patogen penyebab penyakit mastitis dapat dilemahkan, sedangkan protein yang berperan sebagai faktor virulensinya diharapkan tetap utuh. Atas dasar hal tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kandungan dan profil protein bakteri *E. coli* hasil inaktivasi sinar gamma sebagai bahan vaksin mastitis inaktif.

2. METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Isolat bakteri *E. coli* S1 diperoleh dari susu sapi lokal yang terinfeksi mastitis dan sudah dikultivasi di Laboratorium Nutrisi, Kesehatan dan Reproduksi ternak, Pusat Aplikasi Tenaga Isotop dan Radiasi (PATIR) BATAN Pasar Jumat Jakarta Selatan.

Bahan yang digunakan terdiri dari Media NB (*Nutrient Broth*), Media NA (*Nutrient Agar*), larutan Akrilamid 10%, buffer elektroforesis TEMED (N,N,N',N'-*Tetramethylethylenediamine*), Ammonium persulfat dan *commasie brilliant blue R-250* untuk staining protein.

Peralatan yang digunakan terdiri dari Sonikator Branson 2210, autoclave, Spektrofotometer Genesys, Sentrifuge Hitachi CR21G II, Gamma Chamber 4000A, Mini protean Gel Electrophoresis, Atto.

Iradiasi *Escherichia coli* dengan Sinar Gamma

Kultur pada fase mid log disentrifugasi 10.000 rpm dan dibilas dengan aquades steril sebanyak 2 kali. Supernatan yang diperoleh diencerkan hingga diperoleh jumlah sel 10^8 sel/ml dan ditempatkan di dalam vial gelas sebanyak 10 ml. Selanjutnya diiradiasi gamma dengan dosis 600, 700, 800, 900 dan 1000 Gy di Iradiator *Gamma Chamber 4.000 A* dengan laju dosis 108,959 krad/jam (Machi, S., 2002). Kultur hasil iradiasi kemudian dihitung jumlah selnya dengan metode *droptest* untuk uji inaktivasi (Hall, E.J., 1994).

Pengukuran Protein Sel *E. coli* dengan Metode Lowry

Kultur hasil iradiasi diukur kandungan protein ekstraselular dan intraselularnya. Untuk mengetahui kandungan protein ekstraselular langsung menggunakan kultur hasil iradiasi, sedangkan untuk protein intraselular dipecah terlebih dahulu dengan melarutkan kultur hasil iradiasi ke dalam aseton (1 : 1) dan disonifikasi selama 15 menit. 1 ml sampel ditambahkan ke dalam 5 ml larutan Lowry I dan dibiarkan selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,5 ml larutan Lowry II dan dibiarkan selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 700 nm (Murray, P., 1990).

Karakteristik Profil Protein Bakteri *E. coli*

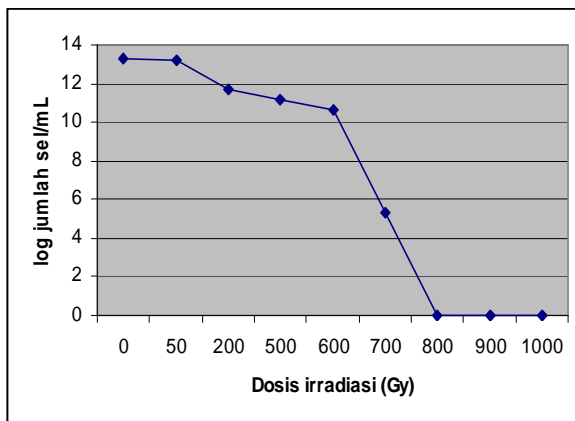
Profil protein dianalisis dengan menggunakan metode elektroforesis satu dimensi SDS-PAGE dengan sistem buffer Laemmli dan konsentrasi gel poliakrilamid 10% (Hames B.D., 1998). Kultur hasil iradiasi sebanyak 20 µl ditambahkan 10 µl

aseton dan disonikasi selama 15 menit. Kemudian ditambahkan buffer sampel Laemli sebanyak 20 µl dan dipanaskan selama 15 menit dalam air mendidih. Setelah itu disentrifugasi pada 8000 rpm selama 5 menit. Sebanyak 5 µl filtrat sampel dan standar dimasukkan ke dalam kolom gel dan dielektroforesis pada kondisi 200 V dan 40 mA selama ± 100 menit. Gel diwarnai dengan *commassie R-250* (BioRad) selama 1 jam lalu didestaining dengan *destaining solution commassie R-250* (BioRad) selama 24 jam. Hasil yang diperoleh dianalisis lebih lanjut untuk menentukan jumlah dan profil protein dengan menggunakan program Lab Image.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Inaktivasi sel *E. coli* dengan iradiasi Sinar Gamma

Hasil iradiasi sel *E. coli* dengan sinar gamma yang dilakukan pada dosis 0 Gy – 1000 Gy dengan laju dosis 1089,59 Gy/jam menunjukkan terjadinya penurunan jumlah sel yang sebanding dengan meningkatnya dosis iradiasi (Gambar 1). Dosis optimum iradiasi yang diperlukan untuk menginaktivasi sel *E. coli* berkisar antara 800 – 1000 Gy.

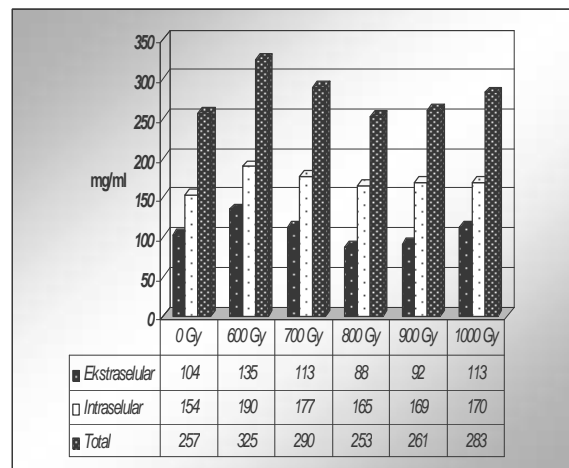


Gambar 1. Hasil iradiasi sinar gamma terhadap sel *E. coli*.

Kondisi inaktif terjadi karena terganggunya metabolisme sel yang menyebabkan sel bakteri tidak mampu bereplikasi akibat adanya efek iradiasi. Hal ini kemungkinan terjadi karena iradiasi dapat menyebabkan kerusakan genetik atau rusaknya struktur DNA/kromosom sel bakteri (Ramamoorthy, S., 2006).

Perubahan Kadar Protein

Iradiasi dengan dosis berbeda pada kultur bakteri menunjukkan adanya perubahan kadar protein total, ekstra dan intraseluler, tetapi tidak menimbulkan kerusakan yang signifikan (Gambar 2). Kadar protein tertinggi terjadi pada dosis iradiasi 600 Gy, dengan jumlah protein total 325 mg/mL, sedangkan yang terendah terjadi pada dosis iradiasi 800 Gy dengan kadar protein 253 mg/mL. Perbedaan kadar protein ini diduga karena dosis yang diberikan tidak terlalu besar dan sifat acak dari kerusakan yang ditimbulkan oleh iradiasi sinar gamma yang dapat mempengaruhi level ekspresi protein baik intraseluler maupun ekstraseluler (Benneth, C., et al., 2002).



Gambar 2. Kandungan protein bakteri *E. coli*.

Suatu materi hidup seperti sel, bila terkena sinar gamma akan mengalami kerusakan secara langsung atau tidak langsung. Efek langsung adalah terjadinya pemutusan ikatan senyawa-senyawa penyusun sel. Efek tidak langsung terjadi karena materi sel terbanyak adalah air yang apabila terkena sinar gamma akan mengalami hidrolisis dan menghasilkan radikal bebas. Radikal bebas inilah yang akan mempengaruhi sistem metabolisme atau menyebabkan kerusakan materi sel (Hall, E.J, 1994).

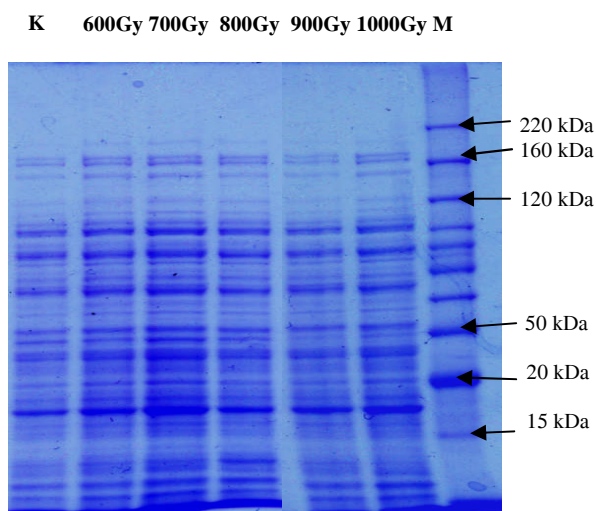
Profil protein *E. coli* Inaktif

Hasil elektroforesis protein *E. coli* inaktif menunjukkan pola dan intensitas yang relatif tidak berbeda (Gambar 3). Hal ini berarti bahwa iradiasi gamma tidak merusak total

antigen protein dan memperkuat hasil analisis kandungan protein sebelumnya. Protein dari sel *E.coli* yang diiradiasi dan tidak diiradiasi memiliki jumlah pita sebanyak 35 buah dengan berat molekul berkisar 15 – 220 kDa.

Intensitas yang nyata berbeda, terjadi pada dosis 600, 700, 900 dan 1000 Gy, sedangkan pada dosis 800 Gy tidak tampak perbedaan nyata. Perubahan intensitas (konsentrasi) protein dapat disebabkan oleh kerusakan yang diakibatkan oleh iradiasi sinar gamma, baik pada struktur maupun ikatan proteinnya. Perubahan struktur dapat diakibatkan oleh denaturasi maupun degradasi protein (Sanakayala, N., *et.al.*, 2005).

Penelitian yang dilakukan oleh Vuckovic M. 2005, menyebutkan bahwa pengaruh iradiasi sinar gamma terhadap stabilitas protein tidak terlalu signifikan pada dosis iradiasi di bawah 1000 Gy. Kerusakan protein pada dosis ini hanya terjadi pada struktur natif yang akan terdenaturasi akibat pengaruh energi iradiasi. Namun demikian pada dosis yang lebih tinggi (di atas 2000 Gy) protein akan terdegradasi dengan munculnya fragmen-fragmen yang lebih pendek akibat terputusnya ikatan peptida (Vuckovic M., 2005).



Gambar 3. Profil protein *E. coli* hasil iradiasi sinar gamma (K = kontrol positif 0 Gy, M = marker)

Berdasarkan hasil elektroforesis protein isolat *E. coli* yang diiradiasi hingga dosis 1000 Gy terlihat bahwa iradiasi gamma tidak menyebabkan kerusakan protein yang signifikan. Hal ini terlihat dari munculnya pita-pita protein dengan pola yang relatif tidak

berbeda pada kisaran bobot molekul 15 – 220 kDa. Demikian juga dengan hasil analisa Lab Image yang menunjukkan nilai signifikansi 0,996 atau 99,6% data menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan (H_0 ditolak). Dengan demikian inaktivasi bakteri *E.coli* melalui iradiasi sinar gamma pada dosis di bawah 1000 Gy berpotensi besar dalam pembuatan vaksin, dimana keuntungan vaksin ini adalah memberikan imunitas humoral yang tinggi bila booster diberikan, tidak menyebabkan mutasi atau reversion (Ramamoorthy, S., 2006), dapat digunakan untuk pasien immuno-defisiensi, cocok digunakan untuk daerah tropis tetapi vaksin jenis ini membutuhkan biaya yang lebih tinggi karena membutuhkan booster (Gafar A., 2006).

4. KESIMPULAN

Iradiasi sinar gamma hingga dosis 1000 Gy mampu menginaktivasi sel bakteri *E.coli* dengan komposisi dan profil protein yang tidak mengalami perubahan yang signifikan (Signifikansi 0,996).

DAFTAR PUSTAKA

1. Arifin, M., (2006), *Pengaruh Vaksin Radiasi Fascioliosis Terhadap Ternak Ruminansia*, Jurnal Gakuryoku Vol. II, Bogor.
2. Benneth, C., Thatcher, S., Tolman-Hulsberg, J., Powers, M., Milwardm H., Nielsen, D., And Teng, D.H.F., (2002), *Comparison Of Gamma-Irradiated And Triazol-Treated RNA Viruses Using The Joint Biological Agent Identification And Diagnostic*, Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT.
3. Gaffar, A., (2006), *Parasitology : Blood And Tissue*, Download From : <http://www.Med.Sc.Edu:85/Parasitology/Blood-Proto.Html>, University Of South California.
4. Gibco Invitrogen Corporation, (2000), *Effectiveness Of Inactivation By Gamma Irradiation For Powder Trypsin Products*, Grand Island, USA.
5. Hall, E.J., (1994), *Radiobiology For The Radiobiologist*, Lippincott Williams And Walkin, Philadelphia,

6. Hames, B.D., (1998), *Gel Electrophoresis of Proteins*, Oxford University Press., New York, USA.
7. Ikmalia, (2008), Skripsi Sarjana Kimia, Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
8. Machi, S., (2002), *Nuclear Techniques Serve Mankind*, Japan Atomic Industrial Forum (JAIF), Inc.
9. Murray P. Deutscher, (1990), *Methods in Enzymology Vol. 182, Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc., San Diego, California, USA.
10. Ramamoorthy, S., Lindsay, D.S., Schurig, G, Boyle, S.M., Duncan,R.B., Vemulapalli,R., And Srirangathan, S., (2006), *Vaccination With Gamma-Irradiated Neospora Caninum Tachyzoites Protects Mice Against Acute Challenge With N.Caninum*, J. Eukaryot. Microbiol. 53(2); 151-156.
11. Ruegg, P., D.V.M., M.P.V.M., (2001), *Evaluating the Effectiveness of Mastitis Vaccines*, University of Wisconsin – Madison Square, USA.
12. Sanakayala, N., Sokolovska, A., Gulain, J., Hogenesch, H., Srirangathan, N., Boyle, S, Schurig, G., And 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 Microbiology.
13. Smith, N.C., (1992), *Concepts And Strategies For Anti-Parasite Immunoprophylaxis And Therapy*, Int. J. For Parasite 22; 1047.
14. Tetriana, D., Sugoro, I., (2007), *Aplikasi Teknik Nuklir dalam Bidang Vaksin*, Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi (PATIR) BATAN.
15. Vuckovic, M., et. al., (2005), *Gamma-Radiation Induced Damage of Protein In The Thick Fraction of Egg White*, Vinca Institute of Nuclear Sciences Serbia and Montenegro JSCS-3365. UDC 54-78.