



**PROFIL SDS-PAGE *OUTER MEMBRANE PROTEIN*
Porphyromonas gingivalis
(Penelitian Observasional Analitik *in vitro*)**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi syarat-syarat untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

**Muhamad Arif
NIM. 071610101069**

**BAGIAN PERIODONSIA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2012**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk Agamaku

Orang Tuaku tercinta,

Almamater dan Indonesiaku

MOTTO

Allah menghendaki kemudahan bagimu, dan tidak menghendaki kesukaran bagimu.
Dan hendaklah kamu mencukupkan bilangannya dan hendaklah kamu mengagungkan
Allah atas petunjuk-Nya yang diberikan kepadamu, supaya kamu bersyukur.
(QS. Al Baqarah: 185)^{*)}

Believe in today because the fight isn't over yet
(Robert Cavestany)

I'm The special one
(Jose Mourinho)

*) Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. *Al Quran dan Terjemahannya*. Semarang :
PT Kumudasmoro Grafindo

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhamad Arif

NIM : 071610101069

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul :

“PROFIL SDS-PAGE *OUTER MEMBRANE PROTEIN Porphyromonas gingivalis*”
adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali jika disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 26 Januari 2012

Yang menyatakan,

Muhamad Arif

071610101069

SKRIPSI

PROFIL SDS-PAGE *OUTER MEMBRANE PROTEIN*

Porphyromonas gingivalis

Oleh :

MUHAMAD ARIF

NIM 071610101069

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Yuliana M.D. Arina, M.Kes.

Dosen Pembimbing Anggota : drg. Desi Sandra Sari, M.DSc.

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “PROFIL SDS-PAGE *OUTER MEMBRANE PROTEIN Porphyromonas gingivalis*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Kamis, 26 Januari 2012

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua,

drg. Yuliana M.D. Arina, M.Kes.

NIP 197506182000122001

Anggota I,

Sekretaris,

drg. Desi Sandra Sari, M.D.Sc.

NIP. 197512152003122005

Dr.drg. I.D.A Susilawati, M. Kes

NIP.196109031986022001

Mengesahkan

Dekan,

drg. Hj. Herniyati, M.Kes

NIP 195909061985032001

RINGKASAN

PROFIL SDS-PAGE OUTER MEMBRANE PROTEIN *Porphyromonas gingivalis*; Muhamad Arif, 071610101069: 2012: 56 halaman: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Porphyromonas gingivalis mendominasi daerah poket periodontal pada penderita *Aggressive periodontitis*. *P.gingivalis* merusak jaringan dengan interaksi langsung antara bakteri dan sel inang. Kemampuan bakteri untuk melekat pada sel inang diperantarai oleh molekul adhesi yang terdapat pada bakteri dan reseptor yang terdapat pada sel inang. Molekul adhesi bakteri bisa terletak di pili atau *outer membrane protein* (OMP). *P.gingivalis* memiliki OMP yang mampu secara langsung menembus jaringan inang. OMP memegang peranan penting dalam pertumbuhan koloni, pembentukan biofilm, dan perkembangan penyakit periodontal.

Sebagai dasar untuk mencegah terjadinya penyakit periodontal maka dilakukan pengamatan terlebih dahulu terhadap bakteri penyebab penyakit periodontal tersebut yaitu *P. gingivalis*, dalam penelitian ini yang akan diamati adalah OMP dari *P. gingivalis* ATCC 33277. Deteksi OMP *P. gingivalis* dapat digunakan sebagai indikator atau prediktor untuk perkembangan *Aggressive periodontitis*. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis profil OMP *P.gingivalis* ATCC 33277. Salah satu cara untuk mengetahui profil OMP adalah dengan metode *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE).

Sebelum mengisolasi OMP dilakukan pemotongan pili dari bakteri *P.gingivalis*. Pili dipotong dengan omnimikser kecepatan penuh selama 60 detik dengan suhu 4⁰C, diulang sampai 3 kali. Hasilnya dilakukan sentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, didapatkan supernatant yang merupakan pili bakteri dan pelletnya kemudian dapat dilakukan isolasi OMP. Pellet diresuspensi dengan PBS kemudian ditambahkan *n-octyl β-D-glucopyranoside* (NOG) dan dilakukan homogenisasi dengan vortek, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 2 x 30 menit. Supernatant dan pellet dipisahkan yang mana supernatant merupakan OMP dengan 1 kali NOG. Dilakukan penambahan NOG lagi pada pellet dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit dan didapatkan supernatant kedua yang merupakan OMP dengan 2 kali NOG. Dari hasil isolasi OMP dengan 1 kali NOG dan OMP dengan 2 kali NOG keduanya sama-sama dipresipitasi untuk didapatkan konsentrasi yang cukup pekat sebelum di uji SDS-

PAGE. Hasil SDS-PAGE OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi dibandingkan dengan OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi. Sedangkan OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi dibandingkan dengan OMP dengan 2 kali NOG tanpa presipitasi.

Berdasarkan hasil SDS-PAGE dengan pewarnaan *Perak Nitrat* ($AgNO_3$), profil OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi didapatkan sepuluh pita protein yang teridentifikasi yaitu 143 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 37 kDa, 35 kDa, 31,1 kDa, 21 kDa, dan 18 kDa sedangkan pada OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi didapatkan lima pita protein yang teridentifikasi yaitu 104 kDa, 53 kDa, 50 kDa, 48 kDa, dan 40 kDa. OMP dengan 2 kali NOG tanpa presipitasi didapatkan empat pita protein yang teridentifikasi yaitu 104 kDa, 53 kDa, 48 kDa dan 40 kDa sedangkan pada OMP ke 2 dengan presipitasi didapatkan lima pita protein yang teridentifikasi yaitu 104 kDa, 53 kDa, 50 kDa, 48 kDa, dan 40 kDa.

Profil OMP *P.gingivalis* berkisar antara 18 kDa sampai 143 kDa. Terdapat satu pita protein yaitu 40 kDa yang sama pada OMP *P.gingivalis* baik dengan satu kali pemberian NOG maupun dua kali pemberian NOG dan dengan presipitasi maupun tanpa presipitasi. Hal ini menunjukkan OMP *P.gingivalis* memiliki protein dengan berat molekul 40 kDa yang lebih banyak. Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui peranan yang lebih besar mengenai faktor virulensi terkait pita protein tertentu yang teridentifikasi terkait dengan perkembangan *Aggressive periodontitis*.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “PROFIL SDS-PAGE *OUTER MEMBRANE PROTEIN Porphyromonas gingivalis*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. drg. Yuliana M.D. Arina, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama, yang telah banyak meluangkan waktu, pikiran dan perhatian untuk memberikan arahan, masukan serta bimbingan sejak awal hingga selesainya penulisan skripsi ini,
2. drg. Desi Sandra Sari, M.D.Sc., selaku Dosen Pembimbing Anggota, yang telah banyak membantu dalam teknis penelitian, meluangkan waktu, pikiran dan perhatian untuk memberikan arahan, masukan serta bimbingan sejak awal penelitian hingga selesainya penulisan skripsi ini,
3. Dr.drg. I.D.A Susilawati, M. Kes, Terima kasih telah mengikutsertakan saya dalam proyek penelitian ini, memberikan ide, saran, masukan dan memberikan bantuan baik dalam hal teknis laboratorium maupun bahan-bahan penelitian serta berkenan menjadi sekretaris dalam ujian skripsi sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini,
4. drg. Ekiyantini Widyowati, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang senantiasa meluangkan waktu untuk mendampingi dan membimbing penulis selama menjalani pendidikan,
5. Bapakku Ali Kuswoyo dan Ibuku Sri Rahayu, terima kasih telah mengajarku lebih dari sekedar berjalan tanpa tangan kalian. You're the great parent,

6. Deshinta Puspasari, terimakasih atas cinta dan segala manfaatnya,
7. Setyo Pinardi, Amd., selaku pihak Laboratorium Mikrobiologi Fakultas kedokteran Gigi dan Seluruh staf Laboraturium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember serta Seluruh staf Laboraturium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang banyak membantu penulis pada saat melakukan penelitian,
8. Teman-teman Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,
9. Semua yang telah melihatku dengan sebelah mata. Terima kasih, kalianlah motivator yang membuatku berusaha untuk menjadi lebih baik,
10. Semua pihak yang terlibat langsung maupun tidak langsung, yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Semoga do'a, bimbingan, dan semangat yang telah diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Allah SWT. Karya tulis ini tidaklah akan pernah sempurna, karena kesempurnaan hanyalah milik Allah SWT semata. Akhirnya, penulis mengharapkan karya ilmiah ini dapat bermanfaat bagi penulis, dan pembaca.

Jember, Januari 2012

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|----------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | ii |
| HALAMAN MOTTO | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN | iv |
| HALAMAN PEMBIMBINGAN | v |
| HALAMAN PENGESAHAN | vi |
| RINGKASAN | vii |
| PRAKATA | ix |
| DAFTAR ISI | xi |
| DAFTAR TABEL | xiv |
| DAFTAR GAMBAR | xv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xvi |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 2 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 2 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 3 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA | 4 |
| 2.1 <i>Aggressive Periodontitis</i> | 4 |
| 2.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 5 |
| 2.3 <i>Outer membrane protein (OMP)</i> | 8 |
| 2.4 <i>n-octyl β-D-glucopyranoside (NOG)</i> | 10 |
| 2.5 Presipitasi Protein | 11 |

| | |
|--|-----------|
| 2.5 Elektroforesis..... | 12 |
| 2.4.1 Elektroforesis Kertas | 13 |
| 2.4.2 Elektroforesis Gel | 13 |
| 2.7 Sodium Dodechyl Sulfat-Polyacrilamide Gel Electroforesis (SDS-PAGE) | 14 |
| BAB 3. METODE PENELITIAN | 18 |
| 3.1 Jenis Penelitian | 18 |
| 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian | 18 |
| 3.2.1 Tempat Penelitian | 18 |
| 3.2.2 Waktu Penelitian | 18 |
| 3.3 Sampel Penelitian | 18 |
| 3.4 Variabel Penelitian | 18 |
| 3.3.1 Variabel bebas..... | 18 |
| 3.3.2 Variabel terikat..... | 18 |
| 3.3.3 Variabel Terkendali | 18 |
| 3.5 Definisi Operasional | 19 |
| 3.6 Alat dan Bahan Penelitian | 19 |
| 3.6.1 Bahan | 19 |
| 3.6.2 Alat..... | 20 |
| 3.7 Prosedur Penelitian | 21 |
| 3.7.1 Kultur bakteri <i>P. gingivalis</i> | 21 |
| 3.7.2 Isolasi OMP bakteri <i>P. gingivalis</i> | 21 |
| 3.7.3 Proses SDS PAGE | 22 |
| 3.7.4 Proses pewarnaan hasil SDS-PAGE dengan <i>Silver Nitrat</i> | 24 |
| 3.7.5 Perhitungan berat molekul hasil SDS-PAGE | 24 |
| 3.8 Analisis Data | 25 |
| 3.9 Alur Penelitian | 26 |

| | |
|---|-----------|
| BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN | 28 |
| 4.1 Hasil | 28 |
| 4.1.1 Hasil Kultur Bakteri <i>P. gingivalis</i> | 28 |
| 4.1.2 Profil SDS-PAGE OMP dengan 1 kali NOG | |
| terpresipitasi dan OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi | 30 |
| 4.1.3 Profil SDS-PAGE OMP dengan 2 kali NOG Tanpa | |
| Presipitasi Dan OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi | 32 |
| 4.2 Pembahasan | 34 |
| BAB 5. PENUTUP | 41 |
| 5.1 Kesimpulan | 41 |
| 5.2 Saran | 41 |
| DAFTAR PUSTAKA | 42 |
| LAMPIRAN | |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|---|---------|
| 4.1 Berat molekul OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi dan OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi..... .. | 32 |
| 4.2 Berat molekul OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi dan OMP dengan 2 kali NOG tanpa presipitasi | 34 |

DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|---|---------|
| 2.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 7 |
| 2.1 Struktur sel <i>P. Gingivalis</i> | 9 |
| 2.3 Struktur kimia <i>n-octyl β-D-gluco</i> pyranoside (NOG) | 11 |
| 2.4 Alur <i>Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)</i> | 17 |
| 3.1 Skema pembuatan sampel | 26 |
| 3.2 Skema prose SDS-PAGE | 27 |
| 4.1 Hapusan preparat <i>P.gingivalis</i> | 28 |
| 4.2 Profil SDS-PAGE OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi dan OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi..... | 31 |
| 4.3 Profil SDS-PAGE OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi dan OMP dengan 2 kali NOG tanpa presipitasi..... | 33 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|---|---------|
| A. Perhitungan berat molekul OMP | 49 |
| B. Alat dan bahan penelitian | 51 |
| C. Skema dan bahan pewarnaan <i>Silver Nitrat</i> (AgNO_3) | 56 |



PROFIL SDS-PAGE *OUTER MEMBRANE PROTEIN*
Porphyromonas gingivalis
(Penelitian Observasional Analitik *in vitro*)

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi syarat-syarat untuk menyelesaikan Program Study Kedokteran Gigi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

Muhamad Arif
NIM 071610101069

BAGIAN PERIODONSIA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2012

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Aggressive periodontitis merupakan salah satu bentuk dari penyakit periodontal yang dapat terjadi secara lokal maupun general (Novak and Novak, 2006). Penyebab *aggressive periodontitis* berasal dari akumulasi bakteri plak, akan tetapi saat ini *aggressive periodontitis* diketahui sebagai penyakit yang bersifat infeksius bila berkaitan dengan sejumlah mikroorganisme gram-negatif yang lebih dominan. Secara umum mikroorganisme gram-negatif anaerob merupakan bakteri terpenting yang menyebabkan *aggressive periodontitis* (Axelsson, 2002). Kelompok yang dominan di antara bakteri gram-negatif anaerob penyebab *aggressive periodontitis* terutama bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Hampir 85% bakteri *P.gingivalis* dan *Prevotella intermedia* mendominasi daerah poket periodontal pada penderita *aggressive periodontitis* (Botero et al.2007).

P. gingivalis merusak jaringan dengan interaksi langsung antara bakteri dan sel inang. Ketika kontak langsung dengan epitel di sulkus periodontal, *P. gingivalis* mampu menyerang berbagai jaringan *host* termasuk tulang alveolar (Noril et al, 1997). Kemampuan bakteri untuk melekat pada sel inang diperantarai oleh molekul adhesin yang terdapat pada bakteri dan reseptor yang terdapat pada sel inang. Molekul adhesi bakteri bisa terletak di pili atau *Outer Membrane Protein* (OMP) (Salyer dan Whitt,1994). *P. gingivalis* memiliki OMP yang mampu secara langsung menembus jaringan inang (Axelsson, 2002).

Outer Membrane Protein (OMP) memegang peranan penting dalam pertumbuhan koloni, pembentukan biofilm, dan perkembangan penyakit (Yoshimura et al ,2009). OMP juga merupakan faktor virulensi utama yang terkait dengan kolonisasi *P. gingivalis* di sulkus gingiva (Kobayashi et al, 2006). Peranan penting

dari OMP *P. gingivalis* yaitu memiliki aktifitas hemaglutinating dan hemolitik yang dapat membantu akuisisi hemin atau zat besi pada hemoglobin dalam eritrosit (Leslie *et al*,1998). Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Yoshimura *et al* (2009) menemukan bahwa OMP *P. gingivalis* terdiri dari porin dan OMPA-like protein.

Sebagai dasar untuk mencegah terjadinya penyakit periodontal maka dilakukan pengamatan terlebih dahulu terhadap bakteri penyebab penyakit periodontal tersebut yaitu *P. gingivalis*, dalam penelitian ini yang akan diamati adalah OMP dari *P. gingivalis*. Deteksi OMP *P. gingivalis* dapat digunakan sebagai indikator atau prediktor untuk perkembangan *Aggressive periodontitis*.

Salah satu cara untuk mengetahui profil OMP adalah dengan elektroforesis. Elektroforesis digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnikan molekul-molekul protein atau fragmen asam nukleat. Teknik elektroforesis ditentukan oleh ciri molekular ionik dan adanya muatan sebagai sifat fisik. Arah dan laju pergerakan tergantung pada spot dan intensitas muatan ionik (Rouessac, 2007). Dalam penelitian ini digunakan teknik elektroforesis gel dengan poliakrilamid yang mana merupakan larutan dari akrilamid dan bisakrilamid sebagai separasi sampel protein atau biasa disebut juga metode *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Analisa dengan metode ini tidak mempengaruhi struktur biopolymer, tetapi juga sangat sensitif dengan adanya perbedaan muatan dan berat molekul yang cukup kecil (Bachrudin, 1999).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang dapat dirumuskan suatu permasalahan yaitu bagaimana profil OMP *P.gingivalis* dengan metode SDS-PAGE.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah menganalisa profil OMP *P.gingivalis* dengan metode SDS-PAGE.

1.4 Manfaat Penelitian

- 1) Dapat memberikan informasi ilmiah mengenai OMP *P.gingivalis* sebagai faktor virulensi periodontitis,
- 2) Sebagai tambahan informasi dalam bidang Periodonsia terkait patogenesis OMP *P.gingivalis* terhadap penyakit periodontal,
- 3) Sebagai dasar penelitian lebih lanjut, yaitu setelah diketahui profil SDS-PAGE OMP *P. gingivalis*, maka hasil tersebut dapat diisolasi yang kemudian dilakukan uji hemaglutinasi untuk mengetahui titer terbesar, besar kecilnya titer ditentukan adanya aglutinasi darah merah pada pengenceran terendah, sehingga diharapkan dapat ditemukan suatu antibiotik atau vaksin untuk mencegah terjadinya penyakit periodontal.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Aggressive Periodontitis*

Aggressive Periodontitis merupakan salah satu bentuk dari penyakit periodontal yang dapat terjadi secara lokal maupun general. Tanda khas dari *Aggressive Periodontitis* lokal adalah diawali dari masa pubertas dan kerusakan tulang alveolarnya terjadi pada gigi insisivus dan molar pertama. Kerusakan tulang alveolar pada tipe general terjadi hampir pada seluruh gigi. Ciri utama dari *Aggressive Periodontitis* yang membedakannya dari periodontitis kronis adalah adanya perkembangan yang cepat dari kehilangan perlekatan dan kehilangan tulang (Novak dan Novak, 2006).

Di antara berbagai jenis bakteri yang terkait dengan perkembangan periodontitis, *P. gingivalis* diduga menjadi salah satu agen penyebab yang paling penting dari bentuk kronis penyakit *aggressive periodontitis* (Slots dan Thing, 1999). Faktor yang menyebabkan virulensi dari bakteri gram-negatif anaerob adalah fimbria, kolagenase, endotoksin dan enzim-enzim lisis lainnya. Fimbria adalah struktur fillamen permukaan sel bakteri yang berfungsi untuk perlekatan bakteri ke permukaan gigi, bakteri lain, atau sel epitel, juga untuk mengikat sel darah merah dalam aktivitas hemaglutinasi. Lipopolisakarida berada pada kapsul gram-negatif anaerob yang dapat menyebabkan bakteri ini mampu mencegah proses fagositosis oleh sel imun inang (Socransky dan Haffajee, 1992).

Sel-sel epitelium merupakan sel-sel pertama yang diserang oleh bakteri di dalam sulkus atau poket. Interaksi ini memicu tahap awal respon inflamasi dan memicu pengaktifan sel di dalam jaringan ikat dan merekrut neutrofil untuk menghancurkan bakteri. Ketika sel-sel epitel berinteraksi dengan lipopolisakarida

(LPS), OMP, PGN, dan LTA, yang merupakan produk-produk bakteri, sel-sel epitel mensekresi IL-1 β , TNF- α , IL-6, dan IL-8 (Nikolopoulos *et al.*, 2008).

2.2 *Porphyromonas gingivalis*

P.gingivalis merupakan bakteri anaerob gram negatif yang tidak berspora (*non-spore forming*) dan tidak mempunyai alat gerak (*non-motile*). bakteri gram negatif memiliki sistem membran ganda di mana membran pasmanya diselimuti oleh membran luar permeabel. Bakteri ini mempunyai dinding sel tebal berupa peptidoglikan, yang terletak di antara membran dalam dan membran luarnya (Cooper *et al*, 2007).

Bakteri ini berbentuk *coccobacilli* dengan panjang 0,5 – 2 μ m. Koloni bakteri ini bila terdapat pada agar darah tampak lembut, berkilauan dan terlihat cembung serta 1-2 mm di dalam garis tengah dan menggelap dari tepi koloni ke pusat diantara 4-8 hari. Terkadang warna koloni berubah menjadi hitam akibat produksi yang berlebih dari protohaem. Koloni yang tak berpigmen kadang juga dapat terjadi. Pertumbuhannya dipengaruhi oleh adanya protein *hydrolysates*, seperti : *trypticase*, *protease peptone* dan ekstrak *yeast*. Pertumbuhannya dapat ditingkatkan dengan adanya 0,5 – 0,8 % NaCl dalam darah (Yoshimura *at al*, 2009).

Kemampuan bakteri untuk melekat pada sel inang diperantarai oleh molekul adhesin yang terdapat pada bakteri dan reseptor yang terdapat pada sel inang (Salyer dan Whitt,1994). Molekul adhesin merupakan molekul pada komponen terluar sel yang dimiliki oleh bakteri untuk membantu perlekatan. Proses yang menyebabkan infeksi bakteri diawali dengan perlekatan, dilanjutkan dengan kolonisasi kemudian invasi (Murdjani, 2002).

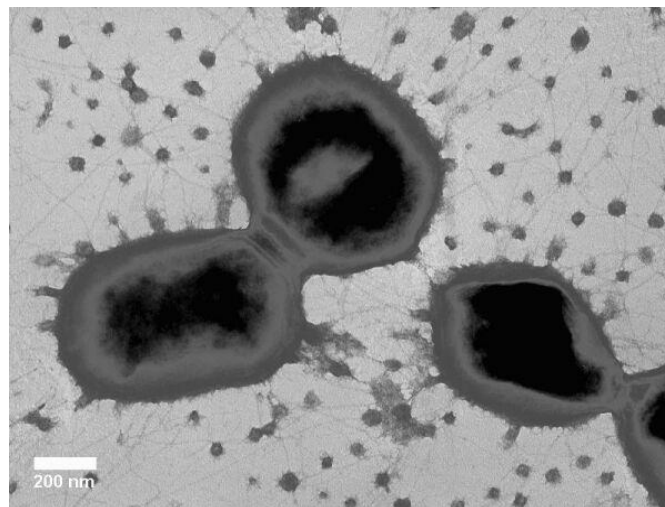
Dalam proses infeksi terjadi patogenesis hanya bila memasuki daerah dengan sistem pertahanan yang tidak normal, misalnya saat membran mukosa robek karena kerusakan jaringan secara langsung (Jawetz *et al.*, 2001). Pada saat terjadinya inflamasi, sejumlah sel *host* dan mediator pro-inflamatori akan berkumpul pada sisi yang terinfeksi. Sel-sel *host* tersebut meliputi sel *mast*, netrofil (PMN), makrofag, sel

NK, sel plasma, dan limfosit. Sel-sel *host* ini kemudian mensekresi sejumlah mediator pro-inflamatori yaitu sitokin untuk membantu melawan serangan bakteri dalam proses inflamasi (Vernino *et al.*, 2004).

Bila iritasi plak dan inflamasi terus berlanjut, integritas dari epithelium junction akan semakin rusak. Sel-sel epithelial akan berdegenerasi dan terpisah, perlekatannya pada permukaan gigi akan terlepas sama sekali. Pada saat bersamaan, epithelium junction akan berproliferasi ke jaringan ikat dan ke bawah pada permukaan akar bila serabut dentogingiva dan serabut puncak tulang alveolar rusak. Migrasi ke apikal dari epithelium junction akan terus berlangsung dan epithelium ini akan terlepas dari permukaan gigi, membentuk poket periodontal. Keadaan ini tampaknya merupakan perubahan Irreversibel. Bila poket periodontal sudah terbentuk plak berkontak dengan sementum. Jaringan ikat akan menjadi oedem, pembuluh darah terdilatasi dan trombosis dinding pembuluh pecah disertai dengan timbulnya perdarahan ke jaringan sekitarnya. Disini terlihat infiltrat inflamasi yang besar dari sel-sel plasam, limfosit dan magrofag. IgG merupakan imunoglobulin yang dominan tetapi beberapa IgM dan IgA juga dapat di temukan disini. Epitelium dinding poket mungkin tetap utuh atau terulserasi. Disini tidak terlihat adanya perbedaan karena produk-produk bakteri berdifusi melalui epitelium. Aliran cairan jaringan dan imigrasi dari PMN akan berlanjut dan agaknya aliran cairan jaringan ini ikut membantu meningkatkan deposisi kalkulus subgingiva. Penyebaran inflamasi ke puncak tulang alveolar ditandai dengan adanya infiltrasi sel-sel ke ruang-ruang trabekula, daerah-daerah resorpsi tulang dan bertambah besarnya ruang trabekula. Ada kecenderungan resorpsi tulang di imbangi oleh deposisi yang semakin menjauhi daerah inflamasi. Sehingga tulang akan *diremodelling*, namun tetap mengalami kerusakan. Resorpsi tulang dimulai dari daerah interproksimal menjadi lebar misalnya antara gigi-gigi molar, suatu karater interdental akan terbentuk dan kemudian bila proses resorpsi makin berlanjut, resorpsi akan meluas ke lateral, sehingga semua daerah puncak tulang alveolar akan teresorpsi (Quirynen *et al.*, 2006).

Patogenesis yang disebabkan oleh bakteri merupakan multifaktor protein meliputi fimbriae, *Outer Membrane Protein* (OMP), kapsular, lipopolisakarida (LPS), pilli, flagela, leukocidin, alginate, dan protease netral (Tortora *et al*, 2004). *P. gingivalis* memiliki dua jenis kegiatan yaitu hemaglutinating dan hemolitik, serta memiliki beberapa enzim yang dapat membantu akuisisi hemin atau zat besi pada hemoglobin dalam eritrosit. *P. gingivalis* memproduksi beberapa faktor virulensi diantaranya adhesins, lipopolysaccharides (LPS), hemolysins dan proteinase (Cutler *et al*, 1995; Grenier *et al*, 2000).

Faktor- faktor virulensi yang terlibat dalam kolonisasi jaringan akan dapat mengubah pertahanan jaringan host (Imamura, 2003). *P. gingivalis* adalah stimulator poten dari mediator inflamasi seperti Interleukin-1 (IL-1) dan Prostaglandin E₂ yang akhirnya dapat menyebabkan resorpsi tulang (Culter *et al*, 1995). *P. gingivalis* dapat memetabolisme asam amino dan menghasilkan sejumlah metabolit atau produk akhir, di mana metabolit tersebut bersifat toksik terhadap jaringan gingiva pada manusia. Oleh karena itu *P. gingivalis* berpengaruh terhadap perkembangan penyakit periodontal (Lamont *et al*, 1992).



Gambar 2.1 : *Porphyromonas gingivalis* (Sumber: Chen *et al*, 1994)

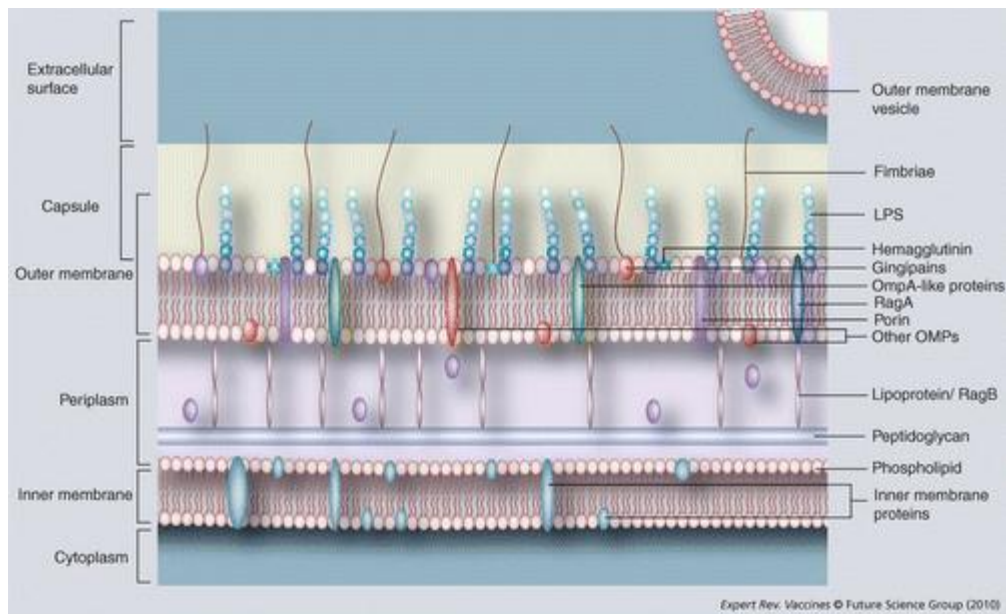
2.3 *Outer membrane protein (OMP)*

Lipid dan protein merupakan bahan penyusun utama membran. Di sebelah luarnya terdapat lapisan protein perifer (protein tepi), yang menyusun tepi luar dan dalam membran. Protein membran tersusun atas glikoprotein (protein yang bersenyawa dengan karbohidrat). Terdapat dua lapisan utama protein membran, yaitu protein integral dan protein poriferal. Protein integral umumnya merupakan protein transmembran, dengan daerah hidrofobik yang seluruhnya membentang sepanjang interior hidrofobik membran tersebut. Daerah hidrofobik protein integral terdiri atas satu atau lebih rentangan asam amino non polar yang biasanya bergulung menjadi heliks α . Ujung hidrofilik molekul ini dipaparkan ke larutan aqueous pada kedua sisi membran. Protein poriferal sama sekali tidak tertanam dalam bilayer lipid, protein ini merupakan anggota yang terikat secara longgar pada permukaan membran, sering juga pada bagian protein integral yang dibiarkan terpapar. Pada sisi bagian luarnya (ekstterior), protein membran tertentu diikat pada serabut-serabut matriks akstaseluler. Protein-protein permukaan luar memberikan ciri individual sel dan macam protein dapat berubah sesuai dengan diferensiasi sel. (Taiz dan Zeiger, 1991).

Protein membran mempunyai peran biologis yang penting, misalnya sebagai reseptor, karier, transpor, enzim dan lain-lain (Manitto, 1981). Jadi protein pada membran dikenal ada 3 jenis : protein katalis (enzim), protein pembawa atau pengangkut (carrier) dan protein struktural. Protein katalis (enzim) pada membran kebanyakan adalah enzim yang memacu hidrolisis ATP menjadi ADP dan H_2PO_3 . Enzim ini disebut ATP-ase. Selain ATP-ase pada membran dapat pula ditemukan berbagai jenis protein lainnya, Protein pembawa pada membran bergabung untuk mengangkut berbagai ion atau molekul melintasi membran. Bebarapa jenis protein pada membran yang tidak mempunyai aktifitas enzimatik dan tidak berfungsi sebagai pengangkut ion atau molekul disebut sebagai protein struktural (Lakitan, 1993).

Dinding sel bakteri gram negatif anaerob termasuk *P. gingivalis* terdiri dari dua membran, yaitu membran bagian dalam atau sitoplasmik dan OMP. OMP memegang peranan penting dalam pertumbuhan koloni, pembentukan biofilm dan perkembangan penyakit (Yoshimura *et al*, 2009).

Outer Membrane Protein (OMP) sangat penting untuk kelangsungan hidup bakteri gram negatif anaerob ketika berada di dalam makrofag dan untuk menginvasi sel eukariotik (Miller, 1991). OMP terletak pada permukaan bakteri gram negatif, yang akhir-akhir ini dianggap paling penting dalam menginduksi suatu respon imun spesifik. Penelitian Imai *et al*. (2005), menunjukkan OMP yang ditemukan pada bakteri gram-negatif anaerob adalah RagA, RagB, dan OMP *A-like protein* dimana kemampuan virulensi yang paling kuat RagB pada penderita lesi periradikuler.



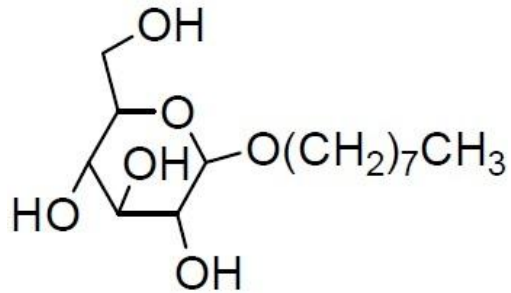
Gambar 2.2 : Struktur membran sel *P. Gingivalis* (Sumber: Holts *et al*, 1999)

Peran sistem pertahanan tubuh yang diinduksi OMP dari berbagai jenis bakteri telah banyak dipelajari (Fulop *et al*, 1996). Imunisasi dengan sel whole bakteri *P. gingivalis* atau dengan ekstrak sel atau juga dengan OMP dapat menurunkan kerusakan jaringan periodontal yang disebabkan oleh bakteri *P. gingivalis* (Tsurumi *et al*, 2003). Sebelumnya penelitian Abiko *et al*. (1990) telah berhasil mengkloning gen OMP 40 kDa dari bakteri *P. gingivalis* dan mengidentifikasi OMP 40 kDa sebagai penghambat aktifitas koagregasi.

2.4 *n*-octyl β -D-glucoopyranoside (NOG)

Lapisan ganda fosfolipid adalah struktur dasar dari membran sel. Fungsi yang paling penting dari sel meliputi transportasi zat, pertukaran energi, dan transmisi informasi. Fungsi-fungsi ini dilakukan pada membran sel dengan peran protein membran. Dalam penelitian biomolekuler tentang protein membran, protein membran perlu dilarutkan dan dimurnikan terlebih dahulu untuk mempelajari struktur dan fungsi mereka. Protein membran sel memiliki sisi ikatan hidrofobik dalam bilayers fosfolipid dan sisi ikatan hidrofilik yang menghadap ke arah lapisan air. Deterjen digunakan untuk mengisolasi molekul-molekul besar seperti protein. Deterjen berinteraksi dengan sisi hidrofobik protein, yang kemudian dilarutkan dalam lapisan air. Dengan cara ini, protein membran dapat dipisahkan.

Sangat penting untuk memilih deterjen yang tidak mengganggu aktivitas biologis protein target. *n*-octyl β -D-glucoopyranoside (NOG) adalah deterjen non ionik yang sering digunakan untuk isolasi protein membran. Struktur kimia dari NOG yaitu $C_{14}H_{28}O_6$. NOG adalah salah satu deterjen yang paling umum digunakan untuk studi protein membran. NOG memiliki sifat yang baik yang memungkinkan digunakan untuk isolasi fungsional maupun protein aktif dalam membran. Deterjen ini memiliki interaksi yang sangat kecil dengan protein membran dan dapat dengan mudah dihilangkan dengan proses dialisa (Baron, C. & Thompson, 1975).



Gambar 2.3 : Struktur kimia NOG (Sumber : Baron *et al.*,1975)

2.5 Presipitasi protein

Presipitasi protein adalah pengendapan yang terjadi karena penggumpalan yang parsial. Presipitasi disebabkan oleh berkurangnya kelarutan protein (perubahan fisik) yang terjadi karena perubahan kimia. Seperti halnya denaturasi protein, presipitasi juga disebabkan oleh faktor kimia dan fisika. Semua faktor yang terjadi pada denaturasi juga terjadi pada presipitasi protein. Semua faktor yang dapat menimbulkan denaturasi protein, juga dapat menyebabkan perubahan kelarutan protein. Dengan demikian presipitasi protein merupakan fenomena fisika yang disebabkan oleh perubahan struktur kimia. Presipitasi disebabkan oleh pengembangan molekul protein akibat *unfolding* atau membukanya heliks-heliks protein. Presipitasi juga terjadi akibat terganggunya kesetabilan koloid yang disebabkan oleh menurunnya muatan elektrostatis protein sehingga gaya gravitasi akan lebih dominan dibandingkan gaya tolak-menolak antar molekul. Kesimpulannya adalah presipitasi protein merupakan fenomena berkurangnya kelarutan suatu protein yang disebabkan oleh perubahan struktur kimia (Anna, P., 1994). Protein yang terdenaturasi akan berkurang kelarutannya. Lapisan molekul protein bagian dalam yang bersifat hidrofobik akan keluar, sedangkan bagian yang hidrofilik akan terlipat ke dalam. Pelipatan atau pembalikan terjadi bila larutan protein mendekati pH isoelektris, lalu protein akan menggumpal dan mengendap. Viskositas akan

bertambah karena molekul mengembang dan menjadi asimetrik, sudut putaran optis larutan protein juga akan meningkat (Winarno, 1992).

Penambahan pelarut organik dalam larutan encer akan mengurangi kelarutan protein dengan mengurangi konstanta dielektrik dalam medium. Pelarut organik yang dapat digunakan untuk mengendapkan protein yaitu *etanol*, *aseton*, *propan-2-ol*. Protein mudah didenaturasi oleh pelarut organik, maka dalam pengerjaannya dilakukan pada temperatur 0°C. Pelarut organik mudah terbakar, mahal dan memiliki selektivitas rendah karenanya jarang digunakan untuk pemurnian enzim dalam skala besar (Walker *et al*, 1988).

Penambahan etanol absolut berguna untuk mengendapkan plasmid karena perbedaan polaritas, etanol yang ditambahkan harus dingin agar lebih banyak lagi DNA plasmid yang mengendap. Selanjutnya untuk menghilangkan pengotor yang masih ada ditambahkan etanol 70% sehingga sisa etanol yang tersisa dapat diuapkan dengan evaporasi. Plasmid yang didapatkan berupa pellet dilarutkan kembali dengan H₂O sehingga dapat dilakukan analisis lebih lanjut dengan menggunakan elektroforesis (Gaffar, 2007).

2.6 Elektroforesis

Elektroforesis adalah teknik pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik (Westermeier, 2004). Ada juga yang menyebutkan bahwa Elektroforesis merupakan teknik untuk memisahkan molekul-molekul seperti protein atau fragmen asam nukleat pada basa berdasarkan kecepatan migrasi melewati gel elektroforesis. Teknik elektroforesis digunakan untuk memisahkan dan memurnifikasi makromolekul. Makromolekul yang dijadikan objek elektroforesis adalah protein dan asam nukleat yang memiliki perbedaan ukuran, kadar ion, dan molekul-molekul penyusunnya. Molekul-molekul tersebut diletakkan dalam di dalam medan listrik sehingga akan bermigrasi karena adanya perbedaan muatan. Molekul protein dan asam nukleat yang bermuatan negatif akan bergerak dari kutub negatif menuju kutub positif dari gel elektroforesis

(Lawrence, 1989). Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk dan ukuran. Dengan demikian elektroforesis dapat di gunakan untuk separasi makromolekul (seperti protein dan asam nukleat). Posisi molekul yang terseparasi pada gel dapat di deteksi dengan pewarnaan atau autoradiografi, atau pun dilakukan kuantifikasi dengan densitometer (Yuwono, 2005). Secara umum ada dua jenis elektroforesis :

1) Elektroforesis kertas

Elektroforesis kertas adalah jenis elektroforesis yang terdiri dari kertas sebagai fase diam dan partikel bermuatan yang terlarut sebagai fase gerak, terutama ialah *ion-ion* kompleks. Pemisahan ini terjadi akibat adanya gradasi konsentrasi sepanjang sistem pemisahan (Sulaiman *et al*, 2007). Pergerakan partikel dalam kertas tergantung pada muatan atau valensi zat terlarut, luas penampang, tegangan yang digunakan, konsentrasi *elektrolit*, kekuatan ion, pH, viskositas, dan adsorpsivitas zat terlarut (Khopkar, 2002).

2) Elektroforesis gel

Elektroforesis gel ialah elektroforesis yang menggunakan gel sebagai fase diam untuk memisahkan molekul-molekul. Awalnya elektroforesis gel dilakukan dengan medium gel kanji (sebagai fase diam) untuk memisahkan biomolekul yang lebih besar seperti protein-protein. Kemudian elektroforesis gel berkembang dengan menjadikan agarosa dan poliakrilamida sebagai gel media (Yepyhardi, 2009).

Banyak molekul biologi bermuatan listrik yang besarnya tergantung pada pH dan komposisi medium dimana molekul biologi tersebut terlarut. Bila berada dalam suatu medan listrik, molekul biologi yang bermuatan positif akan bermigrasi ke elektroda negative dan sebaliknya. Prinsip inilah yang dipakai dalam elektroforesis untuk memisahkan molekul-molekul berdasarkan muatannya. Alasan elektroforesis

digunakan dalam penelitian ini karena memiliki peran sangat penting dalam proses pemisahan molekul-molekul biologi, khususnya protein. Karena disamping metode tersebut tidak mempengaruhi struktur biopolimer, tetapi juga sangat sensitif terhadap perbedaan muatan dan berat molekul yang cukup kecil. Protein yang dialirkan dalam medium yang mengandung medan listrik maka senyawa-senyawa yang bermuatan akan bergerak dalam larutan sebagai akibat dari sifat polaritas yang berlawanan, maka mobilitas suatu molekul merupakan fungsi dari bentuk, ukuran molekul, dan besar tipe muatan (Bachrudin, 1999).

Elektroforesis untuk makromolekul memerlukan matriks penyangga untuk mencegah terjadinya difusi karena timbulnya panas dari arus listrik yang digunakan. Gel poliakrilamid dan agarosa merupakan matriks penyangga yang banyak dipakai untuk separasi protein dan asam nukleat. Elektroforesis yang dibahas di bawah ini menggunakan matriks bahan *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) (Hames, 1990; Matsudaira, 1993).

2.7 Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Metode *Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan salah satu metode untuk menganalisis protein dengan memisahkan pita-pita protein yang ada di dalam sampel berdasarkan berat molekulnya (Bachrudin, 1999). *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) diartikan sebagai proses pemisahan protein dalam sebuah gel akrilamid melalui aplikasi arus listrik (Davis *et al*, 1994).

Semua teknik elektroforesis membutuhkan arus listrik untuk menggerakkan molekul bermuatan melalui matriks atau gel. Pada SDS-PAGE diperlukan matriks yang bening untuk memisahkan molekul. Matriks yang bening ini terbuat dari polimer akrilamid dalam bentuk gel. Gel poliakrilamid merupakan larutan dari akrilamid dan bisakrilamid yang digunakan untuk separasi sampel protein.

Elektroforesis hampir selalu dilakukan dalam gel dan tidak dalam larutan. Hal ini dikarenakan gel dapat mengurangi arus listrik yang timbul akibat perbedaan suhu

yang kecil yang diperlukan agar pemisahan menjadi efektif, gel bertindak sebagai saringan molekul yang meningkatkan pemisahan (Stryer, 2000), gel juga dapat menjaga molekul yang telah terpisah supaya tidak berdifusi terlalu cepat ke dalam fase cair (Lehninger, 1982).

Penggunaan poliakrilamid mempunyai keunggulan dibandingkan dengan gel lainnya, karena tidak bereaksi dengan sampel dan tidak membentuk matrik dengan sampel, sehingga tidak menghambat pergerakan sampel yang memungkinkan pemisahan protein secara sempurna. Selain itu, gel poliakrilamida ini mempunyai daya pemisahan yang cukup tinggi. Penggunaan SDS berfungsi untuk mendenaturasi protein karena SDS bersifat sebagai deterjen yang mengakibat ikatan dalam protein terputus membentuk protein yang dapat terelusi dalam gel begitu juga mercaptoetanol.

Komponen penting yang membentuk gel poliakrilamida adalah akrilamida, bisakrilamida, ammoniumpersulfate dan TEMED (N,N,N',N'tetrametilendiamin). Akrilamida sebagai senyawa utama yang menyusun gel merupakan senyawa karsinogenik. *Ammonium persulfate* berfungsi sebagai inisiator yang mengaktifkan akrilamida agar bereaksi dengan molekul akrilamida yang lainnya membentuk rantai polimer yang panjang. TEMED berfungsi sebagai katalisator reaksi polimerisasi akrilamid menjadi gel poliakrilamid sehingga dapat digunakan dalam pemisahan protein.

Bis-akrilamida berfungsi sebagai *cross-linking* agen yang membentuk kisi-kisi bersama polimer akrilamida. Kisi-kisi tersebut berfungsi sebagai saringan molekul protein. Perbandingan antara akrilamida dengan bis akrilamida dapat diatur sesuai dengan berat molekul protein yang dipisahkan. Semakin rendah berat molekul protein yang dipisahkan, maka semakin tinggi konsentrasi akrilamida yang digunakan agar kisi-kisi yang terbentuk semakin rapat (Leber ,T.M. dan Balkwil, F.R. 1997).

Untuk memisahkan protein secara akurat berdasarkan ukurannya, akan sangat penting jika terlebih dahulu mendenaturasi protein sebelum mengisikannya dalam

gel. Untuk melakukan hal ini, perlu menggunakan loading buffer dengan dua bahan penting, yaitu *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) dan *Dithiothreitol* (DTT). *Dithiothreitol* (DTT) adalah agen pereduksi yang kuat yang memutus ikatan disulfida. Selain itu untuk mempergunakan dua agen kimia untuk mendenaturasi protein, juga perlu dilakukan pemanasan beberapa sampel hingga 95°C untuk membantu mendenaturasi protein secara sempurna dan menghasilkan molekul linier yang akan bermigrasi berdasarkan bobot molekulnya (Yepyhardi, 2009).

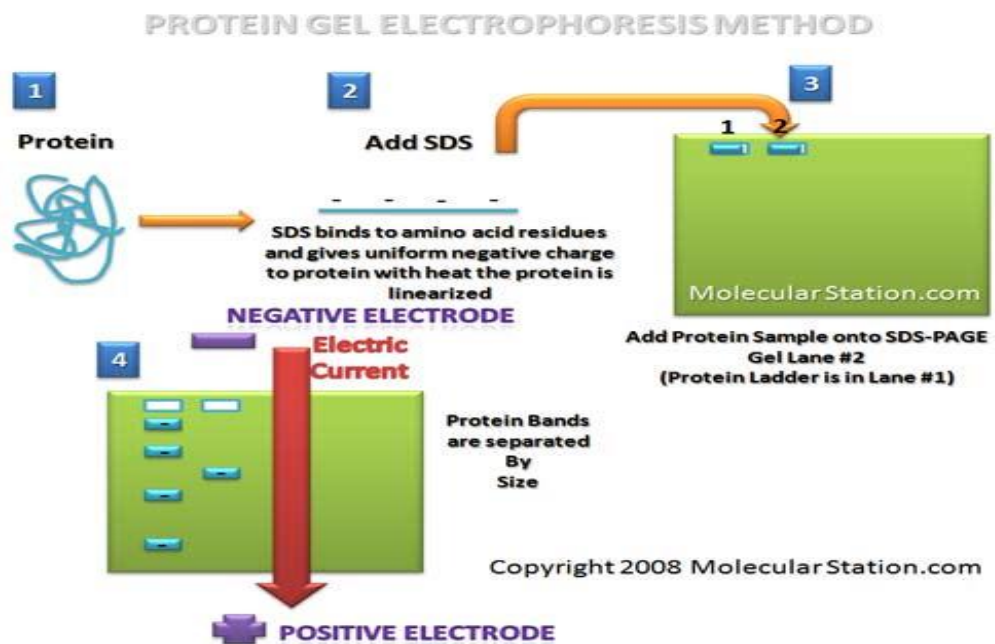
Protein marker digunakan untuk mengidentifikasi berat molekul dari campuran *polypeptida* (Hames dan Rickwood, 1990). Marker protein yang digunakan memiliki rentang beratmolekul 15 kDa - 250 kDa. Dari hasil elektroforesis terdapat sejumlah pita protein yang memiliki ketebalan berbeda-beda. Protein yang memiliki ketebalan dan intensitas warna yang lebih besar dibandingkan protein lain dan selalu ada di setiap varietas disebut protein mayor (Wijaya dan Rahman, 2005).

Molekul protein yang lebih kecil bergerak dengan cepat dalam gel, sedangkan protein dengan molekul yang lebih besar tinggal di atas berdekatan dengan titik aplikasi campuran. Molekul dengan ukuran sedang dapat bergerak dalam gel sesuai ukurannya. Pergerakan sebagian besar rantai polipeptida pada kondisi seperti ini berbanding lurus dengan logaritma massanya. Media pilihan pada elektroforesis adalah gel poliakrilamida, sebab secara kimiawi bersifat inert dan dapat dengan mudah dibentuk dari polimerisasi akrilamida. Selain itu ukuran pori dapat diatur dengan memilih berbagai konsentrasi akrilamid dan metilenbisakrilamida (reagen pengikat) pada saat polimerisasi. Elektroforesis SDS-gel poliakrilamid bersifat cepat, peka dengan kemampuan resolusi tinggi (Stryer, 2000).

Hasil SDS-PAGE akan berupa pita-pita yang mengendap, pita-pita tersebut dapat dibaca setelah dilakukan pewarnaan, pada penelitian ini pewarnaan yang dipakai adalah *Silver Nitrat* (AgNO_3), pewarnaan *Silver Nitrat* dipilih karena memiliki kepekaan yang sangat tinggi (Rabilloud, T.,dkk. 1994).

Pita-pita protein terpisahkan berdasarkan berat molekulnya. Tebal tipisnya pita yang terbentuk dari pita protein menunjukkan kandungan atau banyaknya protein

yang mempunyai berat molekul yang sama yang berada pada posisi pita yang sama. Hal ini sejalan dengan prinsip pergerakan molekul bermuatan, yakni molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik, molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang sama atau berdekatan (Soedarmadji, 1996).



Gambar 2.4 : Alur Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (Sumber: Schagger, 1987)

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik *in vitro*, yaitu suatu penelitian yang dimaksudkan untuk mengetahui bagaimana profil SDS-PAGE OMP *P. gingivalis*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Tempat pelaksanaan penelitian ini di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, dan Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya.

3.2.2 Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2011 – Juni 2011

3.3 Sample penelitian

Sampel penelitian adalah OMP dari bakteri *P. gingivalis*.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah bakteri *P. gingivalis*.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah OMP dari bakteri *P. gingivalis*.

3.4.3 Variabel Terkendali

Metode *Sodium Dodechyl Sulfat-Polyacrilamide Gel Electroforesis* (SDS-PAGE).

3.5 Definisi Operasional

3.5.1 Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Bakteri *P. gingivalis* yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari turunan ketiga hasil pembenihan buatan pada media *blood* agar biakan murni *P. gingivalis* ATCC 33277 dengan konsentrasi 3×10^6 dan *absorbansi* 0,05.

3.5.2 *Outer Membrane Protein* (OMP) dari bakteri *P. gingivalis*

Protein yang terdapat pada *outer membrane* bakteri *P. gingivalis* yang didapatkan dari hasil isolasi. OMP ini dalam bentuk cair atau supernatant.

3.5.3 *Metode Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis* (SDS-PAGE)

Merupakan salah satu metode untuk menganalisis protein dengan memisahkan pita-pita protein yang ada di dalam sampel berdasarkan berat molekulnya (Bachrudin, 1999). Sampel protein akan dibandingkan dengan Marker *PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder 2 x 250 μl*.

3.6 Bahan dan Alat

3.6.1 Bahan:

1. Bakteri *P.gingivalis* ATCC 33277
2. PBS
3. *acrylamide*
4. *Tris HCl* pH 8,8
5. SDS 10%
6. *aquadest*
7. TEMED
8. APS
9. *buthano*
10. *Tris HCl* pH 6,8
11. *Laemmli buffer*
12. *electrophoresis buffer*

13. *methanol*
14. *acetic acid*
15. *Running gel 12%*
16. *Stacking gel 5%*
17. *Glutaraldehyde 10%*
18. *Silver gel*
19. AgNO₃ 0,8 gram
20. NaOH 0.36% 21 ml
21. NH₃ 1,4 ml
22. 100 µl *zitronensaure* 5%
23. 50 µl *formaldeyide* 37%
24. *acetic acid* 10%
25. *gliserin* 10%.
26. *Ethanol*
27. *Protein marker*

3.6.2 Alat :

1. petridish
2. pisau scalpel
3. sentrifugal
4. mikroskop
5. mokropipet
6. tabung *falcon*
7. spektrofotometer
8. gelas *plate*
9. *waterbath*
10. *freezer*
11. alat incubator

3.7 Prosedur penelitian

3.7.1 Kultur bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Bakteri *P. gingivalis* murni dilakukan pembenihan pada media bifasik *blood* agar (BHI) dalam bentuk suspensi. Komposisi suspensi media *blood* agar terdiri dari 10 ml *brucella broth* ditambahkan 1 µl/ml vitamin K₁ dan 5 µl/ml hemin. Suspensi diambil sebanyak 2 ml kemudian diinokulasi bakteri *P. gingivalis* murni. Media yang sudah ditanami bakteri dimasukkan dalam *anaerobic jars* yang mengandung 10% CO₂ serta diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37⁰C selama 2x24 jam. Hasil biakan pada suspensi media BHI tersebut dipanen dan dilakukan perbanyakan pada 900 ml larutan *Braint heart Infussion Broth* (BHI-B). Bakteri *P. gingivalis* yang ada pada dasar tabung dari suspensi 2 ml diinokulasi dan ditanam dalam 900 ml larutan *Braint heart Infussion Broth* (BHI-B) yang mengandung 37 µl/ml BHI-B, 100 µl/ml vitamin K, dan 5 ml *yeast extract* kemudian dikocok kuat selama 30 menit dalam *luminar flow*. Selanjutnya dari botol tersebut dilakukan pengeraman dalam dalam *anaerobic jars* yang mengandung 10% CO₂ serta diinokulasi dalam inkubator dengan suhu 37⁰C selama 4 x 24 jam. Setelah 4x24 Jam suspensi diambil sebanyak 400 ml kemudian kuman dipanen ditambah larutan *Tri Chlor Acetid* (TCA) disentrifuse dan diambil peletnya untuk dilakukan pemotongan pili dan isolasi OMP.

3.7.2 Isolasi OMP bakteri *P. gingivalis*

Sebelum mengisolasi OMP dilakukan pemotongan pili dari bakteri *P. gingivalis*. Hasil kultur bakteri ditambahkan *triklor acetit acid* (TCA) dengan konsentrasi 3% . Setelah dikocok rata diletakkan pada suhu kamar selama 1 jam dan tiap 15 menit dikocok. Selanjutnya disentrifugasi 6.000 rpm selama 15 menit. Pelet diambil dan diresuspensi dengan 10 ml cairan PBS pH 7,4 dan disentrifugasi lagi 6000 rpm selama 15 menit. Pellet bakteri diambil ditambahkan larutan PBS 10 ml dan dimasukkan dalam *omnimikser* untuk dilakukan pemotongan pili. Pili dipotong dengan *omnimikser* kecepatan penuh selama 60 detik dengan suhu 4⁰C, diulang sampai 3 kali. Hasilnya dilakukan sentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan

12.000 rpm, didapatkan supernatant yang merupakan pilli bakteri dan pelletnya kemudian dapat dilakukan isolasi OMP.

Isolasi OMP dilakukan menurut Sumarno, dkk (1988) yang merupakan modifikasi Evan's. Modifikasinya pada bagian sampel yang digunakan yaitu bagian endapan dari perlakuan pemotongan pili pada putaran yang terakhir. Pellet diresuspensi dengan PBS pH 7,4 sampai volumenya mencapai 15 kali, kemudian ditambahkan *n-octyl β-D-glucopyranoside* (NOG) dengan volume sebanding. Dilakukan homogenisasi dengan vortek, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit. Supernatant dan pellet dipisahkan yang mana supernatant merupakan OMP dengan 1 kali NOG. Dilakukan penambahan NOG lagi pada pellet dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit dan didapatkan supernatant kedua yang merupakan OMP dengan 2 kali NOG. Cairan supernatan baik OMP dengan 1 kali NOG dan OMP dengan 2 kali NOG diambil dilakukan dialisa. Cairan dialisa pada 24 jam pertama digunakan H₂O dan pada 24 jam kedua dipakai PBS pH 7,4. OMP dengan 2 kali NOG disisakan 2 ml untuk langsung diuji SDS-PAGE tanpa melalui tahap presipitasi. Sedangkan OMP dengan 1 kali NOG maupun OMP dengan 2 kali NOG dilakukan presipitasi dengan etanol absolut dengan volume 1:1 selama 1 x 24 jam kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm dengan suhu 4⁰C selama 15 menit. Selanjutnya didapatkan palet yang siap untuk dilakukan monitoring berat dengan SDS-PAGE.

3.7.3 Proses SDS-PAGE

Menurut Rantam (2003) adapun cara kerja dari SDS-PAGE sebagai berikut:

1 Mencetak *running gel* 12%.

Bahan-bahan *running gel* 12% dicampur sampai homogen (*acrylamide* 2,5 ml, *Tris HCl* (pH 8,8) 1,2 ml, SDS 10% 1,2 ml, *aquadest* 1,1 ml, TEMED 5 µl, APS 10% 30 µl) kemudian campuran tersebut dimasukkan dalam gelas *plate* melalui dindingnya agar tidak terbentuk gelembung, sampai kira-kira satu cm dari atas. *Buthanol* ditambahkan di atasnya sampai penuh (lebih kurang 1 ml) dan dibiarkan

selama 25 menit pada suhu kamar agar gel membeku, selanjutnya sisa *buthanol* dibuang dan dibersihkan dengan PBS lalu dikeringkan.

2 Mencetak *stacking gel* 5%.

Cara pembuatan *stacking gel* sama seperti mencetak *running gel*. Bahan-bahan *stacking gel* 5% dicampur hingga homogen (*acrylamide* 0,66 ml, *Tris HCl* (pH 6,8) 0,8 ml, SDS 10% 0,8 ml, *aquadest* 0,8ml, TEMED 4 μ l, APS 10% 20 μ l) kemudian campuran tersebut dimasukkan di atas *running gel* yang telah mengeras hingga penuh. *Comb* dimasukkan dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 15-25 menit sampai *stacking gel* mengeras. Langkah terakhir yaitu melepas serta mencuci *stacking gel* dengan *electrophoresis buffer*.

3 Persiapan sampel.

Sampel sebanyak 15 μ l dicampur dengan *Laemmli buffer* dengan perbandingan 2:1 lalu dimasukkan ke dalam *appendorf* yang telah di lubangi tutupnya dengan jarum $\frac{1}{2}$ tusukan (3 lubang). Campuran tersebut dipanaskan dengan *waterbath* pada suhu 100°C selama 5 menit.

4 Elektroforesis dimulai dengan memasang gelas *plate* dan dirangkai dengan *frame* dari *bio-Rad*.. Sampel dan *marker* yang telah dibuat dimasukkan ke dalam lubang *comb*. *Marker* yang digunakan adalah *Unstained Broad Range Protein Ladder* dengan berat molekul 5 – 250 kDa. Elektroforesis dijalankan dengan tegangan 125 V dan kuat arus 40 mA. Proses ini dihentikan setelah warna biru turun (*Laemmli* turun) kurang lebih tiga sampai empat jam.

5 Pencucian terhadap hasil *running*

Gel hasil elektroforesis dimasukkan ke dalam *petridish* dan dilakukan 4 kali pencucian. Pencucian pertama menggunakan *methanol* 25 ml, *acetic acid* 3,75 ml, *aquadest*. Pencucian kedua menggunakan *methanol* 2,5 ml, *acetic acid* 3,75 ml, *aquadest*. Pencucian ketiga menggunakan *glutaraldehyde* 10 %. pencucian keempat menggunakan *aquadest* 100 ml sebanyak 3 kali pencucian. Masing-masing pencucian selama 30 menit.

3.7.4 Proses pewarnaan hasil SDS-PAGE dengan *Silver Nitrat* (AgNO_3)

1. Fiksasi hasil gel elektroforesis selama 30 menit dengan *ethanol* 12 ml, asam asetat glasial 3 ml, dan tambahkan aquades sampai volume 30 ml.
2. *Sensitizing* selama 30 menit dengan *ethanol* 9 ml, *Na-tiosulphat* 5% 1.2 ml, *Na-asetat* 2.04 gr, *glutaraldehyd* 25%, lalu ditambahkan aquades sampai volume 30 ml.
3. *Washing* selama 3x5 menit dengan aquades diatas *shaker*
4. *Silver reaction* selama 20 menit dengan *siver nitrat* 25% 3 ml, formaldehyd 37% 0.15 ml, tambahkan aquades sampai volume 30 ml.
5. *Washing* selama 2x1 menit dengan aquades
6. *Developing* selama 2x5 menit dengan NaCO_3 0.75 gr, formaldehyd 37% 6 μl , tambahkan aquades sampai volume 30 ml.
7. *Stoping* selama 10 menit dengan EDTA $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$ 0.438 gr, tambahkan aquades sampai volume 30 ml.
8. *Washing* selama 3x5 menit dengan aquades.
Simpan dalam H_2O dengan suhu 4^0C dengan *ethanol* 75 ml, *gliserol* 87% 4.5 ml, dan aquades 250 ml.

3.7.5 Metode perhitungan berat molekul hasil SDS-PAGE

Setelah seluruh sampel diuji, maka didapatkan gambaran hasil pengujian dengan metode SDS-PAGE dengan pewarnaan *silver stain* terhadap bahan metabolisme ekstraselular dari *P. gingivalis* yang berupa lembaran gel, kemudian hasil lembaran gel tersebut didokumentasikan dengan mesin pemindai. Setelah didapatkan hasil gambar dalam bentuk *soft copy*, kemudian diukur panjang *tracking* pita yaitu panjang *track* dari atas pita sampai dasar pita, jarak *tracking* tiap *band* yaitu panjang *track* dari atas pita sampai *band* yang akan dicari berat molekulnya, Pita pertama yang harus dihitung adalah pita protein *marker*, karena pada protein marker sudah diketahui berat molekulnya, sehingga digunakan sebagai panduan mencari berat molekul sampel lainnya, setelah didapatkan nilai panjang *tracking* dan panjang

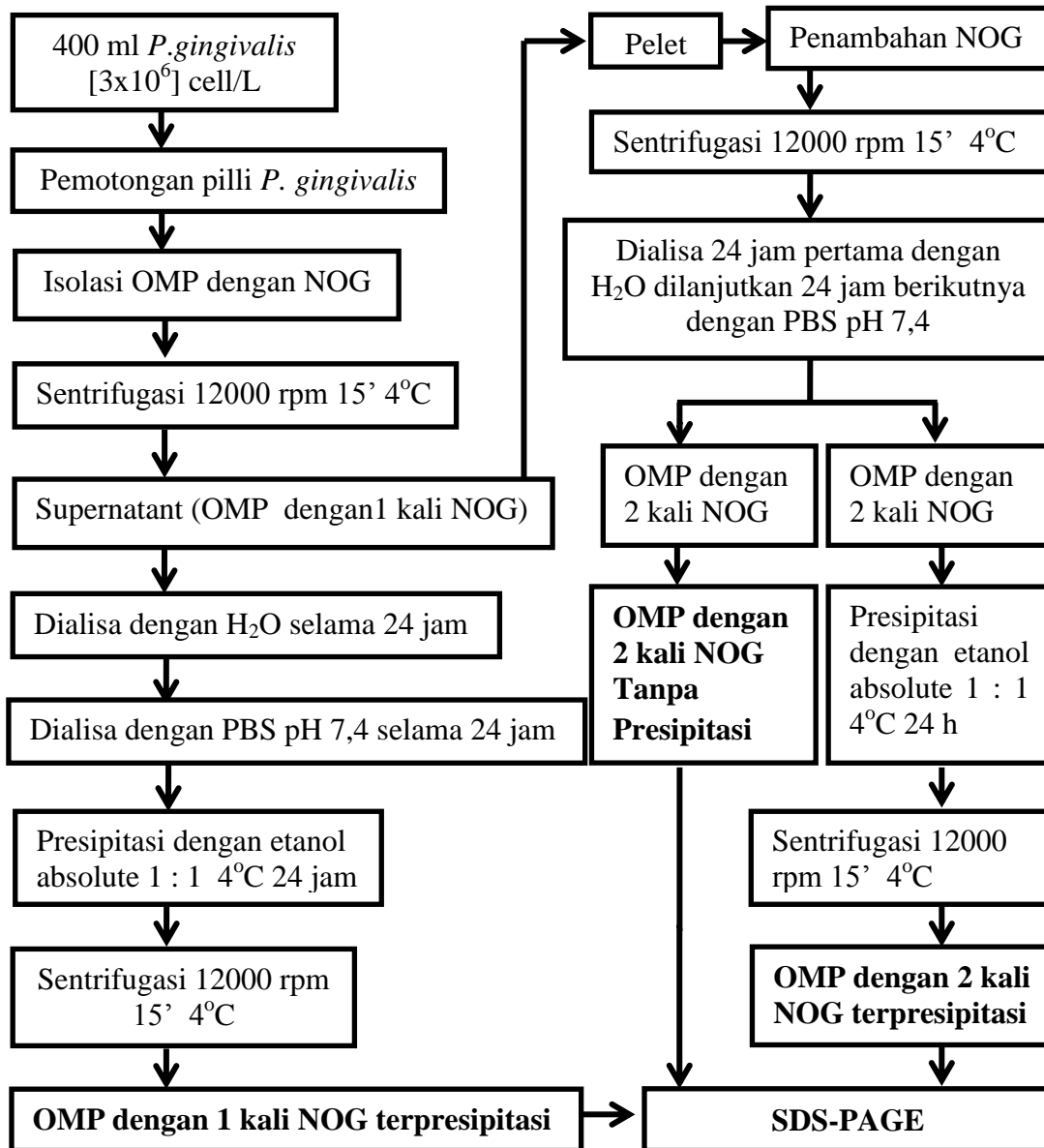
tracking, selanjutnya mencari nilai *retention factor* (rf) yaitu dengan membagi jarak tracking dengan panjang tracking, setelah didapatkan nilai (rf) maka dibuat rumus persamaan garis lurusnya, rumus inilah yang digunakan mencari berat molekul sampel yang diuji, pada rumus tersebut terdiri atas sumbu x dan sumbu y, nilai (rf) sebagai sumbu y dan sumbu x sebagai log berat molekul, untuk mendapat mendapat nilai berat molekul maka antilog berat molekul tersebut.

3.8 Analisis Data

Analisa data dalam penelitian ini menggunakan analisa data deskriptif untuk melihat profil OMP *P.gingivalis*. Hasil akan ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar.

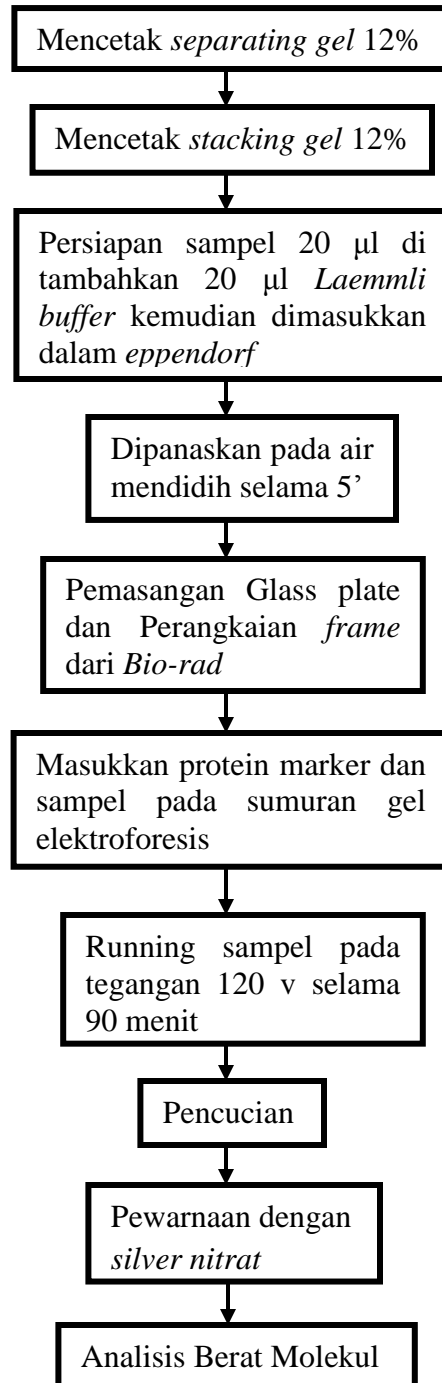
3.9 Alur Penelitian

3.9.1 Pembuatan sampel OMP *P.gingivalis*



Gambar 3.1 Skema pembuatan sampel

3.9.2 Proses SDS-PAGE



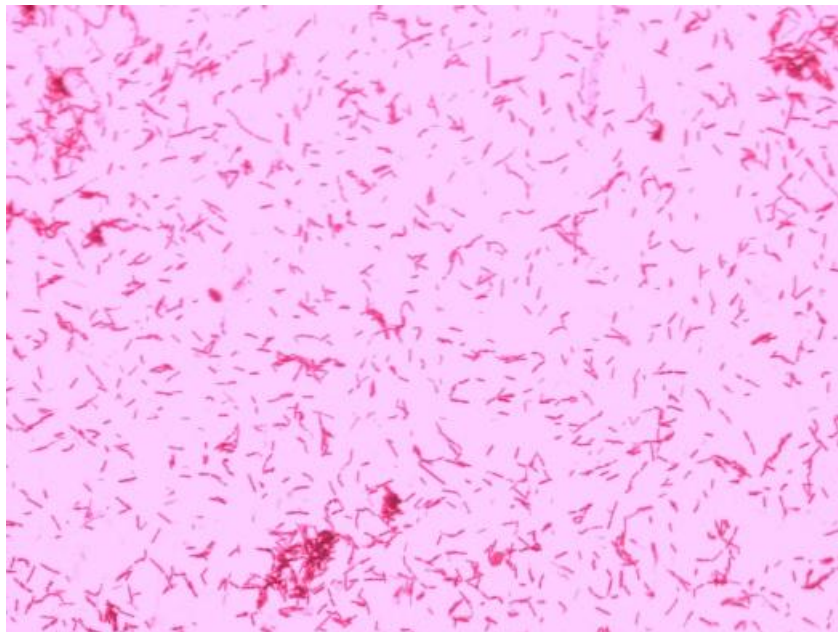
Gambar 3.2 Skema proses SDS-PAGE

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

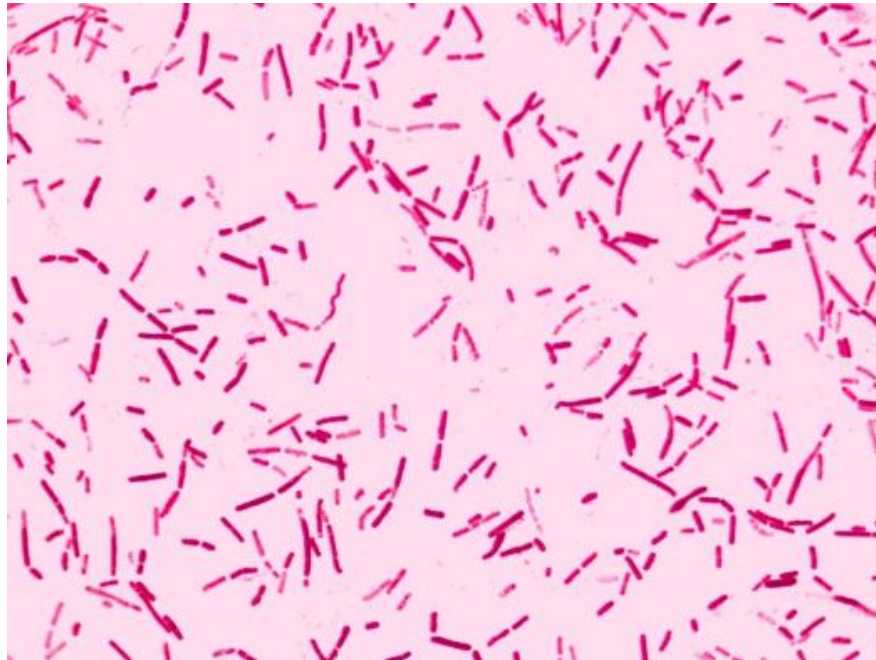
4.1 Hasil

4.1.1 Hasil Kultur Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Untuk mengidentifikasi bakteri gram negatif seperti *P.gingivalis*, sebelumnya dilakukan metode pewarnaan gram. Hasil pembiakan bakteri *P.gingivalis* dengan konsentrasi 3×10^6 dan *absorbansi* 0,05 dalam penelitian ini menunjukkan bakteri gram negatif dengan bentuk *coccobacilli* yang terlihat berwarna merah muda pada hapusan preparat. Pembiakan bakteri *P. gingivalis* yang terlihat pada hapusan preparat tidak menunjukkan adanya kontaminasi dengan bakteri lain (Gambar 4.1 dan 4.2).



Gambar 4.1 Hapusan preparat *P.gingivalis* dengan pembesaran 400x



Gambar 4.2 Hapusan preparat *P.gingivalis* dengan pembesaran 1000x

Hal ini penting dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui reaksi dinding sel bakteri melalui serangkaian pengecatan yang nantinya dapat menentukan bahwa kultur bakteri *P. gingivalis* yang dilakukan tidak terkontaminasi jenis bakteri gram positif.

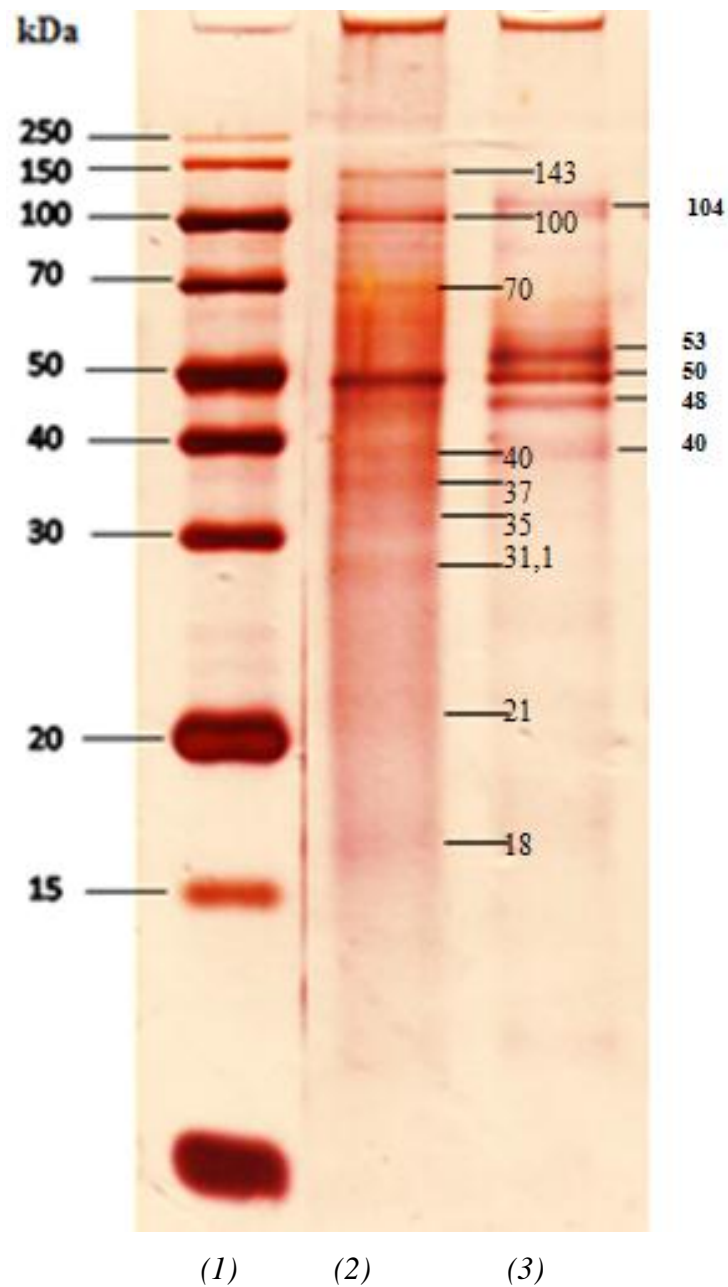
Setelah seluruh sampel diuji, maka didapatkan gambaran hasil pengujian dengan metode elektroforesis protein SDS-PAGE dengan pewarnaan *Silver Stain* (AgNO_3) terhadap OMP *P. gingivalis* yang berupa lembaran gel, kemudian lembaran gel tersebut diinterpretasikan dengan *scanner*. Setelah didapatkan hasil gambar dalam bentuk *soft copy*, kemudian diukur panjang *tracking* pita dari atas sumuran sampai dasar sumuran, jarak *tracking* tiap band dari atas sumuran sampai tiap-tiap pita yang

terdeteksi, kemudian data dihitung dengan rumus persamaan regresi linier untuk mengetahui berat molekul pada masing-masing *band* /pita protein.

Perhitungan berat molekul OMP *P.gingivalis* dengan menggunakan formula regresi linier setelah didapatkan pita protein marker dengan masing-masing berat molekul. Dari pengamatan diketahui bahwa penanda pada gel pemisah berjarak 7,2 cm, sehingga diperoleh data rf (Lampiran). Dari data tersebut apabila memasukkan data rf dan log BM dari pita-pita marker maka diperoleh kurva *quadratic*. Dari kurva log BM dengan rf marker dapat diperoleh persamaan regresi, yaitu $y = -0,5003x + 1,1899$ dengan nilai $R^2 = 0,9024$ (Gambar 4.4). Pergerakan sebagian besar rantai polipeptida pada kondisi seperti ini berbanding lurus dengan logaritma massanya (Stryer, 2000). Dari persamaan regresi ini, maka diperoleh berat molekul pita yang dihasilkan oleh sampel OMP *P.gingivalis*.

4.1.2 Profil SDS-PAGE OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi dan OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi

Profil protein OMP dapat dianalisis dengan menggunakan metode SDS-PAGE. Pada penelitian ini ditunjukkan hasil SDS-PAGE OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi dan OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi. OMP dengan 1 kali NOG merupakan supernatan yang didapatkan pada saat tahap isolasi OMP dengan satu kali pemberian NOG, sedangkan OMP dengan 2 kali NOG didapatkan dari palet sisa OMP dengan 1 kali NOG yang dilakukan pemberian NOG ulang. Kedua sampel baik OMP dengan 1 kali NOG maupun OMP dengan 2 kali NOG dilakukan presipitasi terlebih dahulu sebelum di uji dengan SDS-PAGE.



Gambar 4.3 Profil SDS-PAGE dari (1) Protein Marker, (2) OMP *P.gingivalis* dengan 1 kali NOG terpresipitasi dan (3) OMP *P.gingivalis* dengan 2 kali NOG terpresipitasi

Tabel 4.1 Berat molekul OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi dan OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi

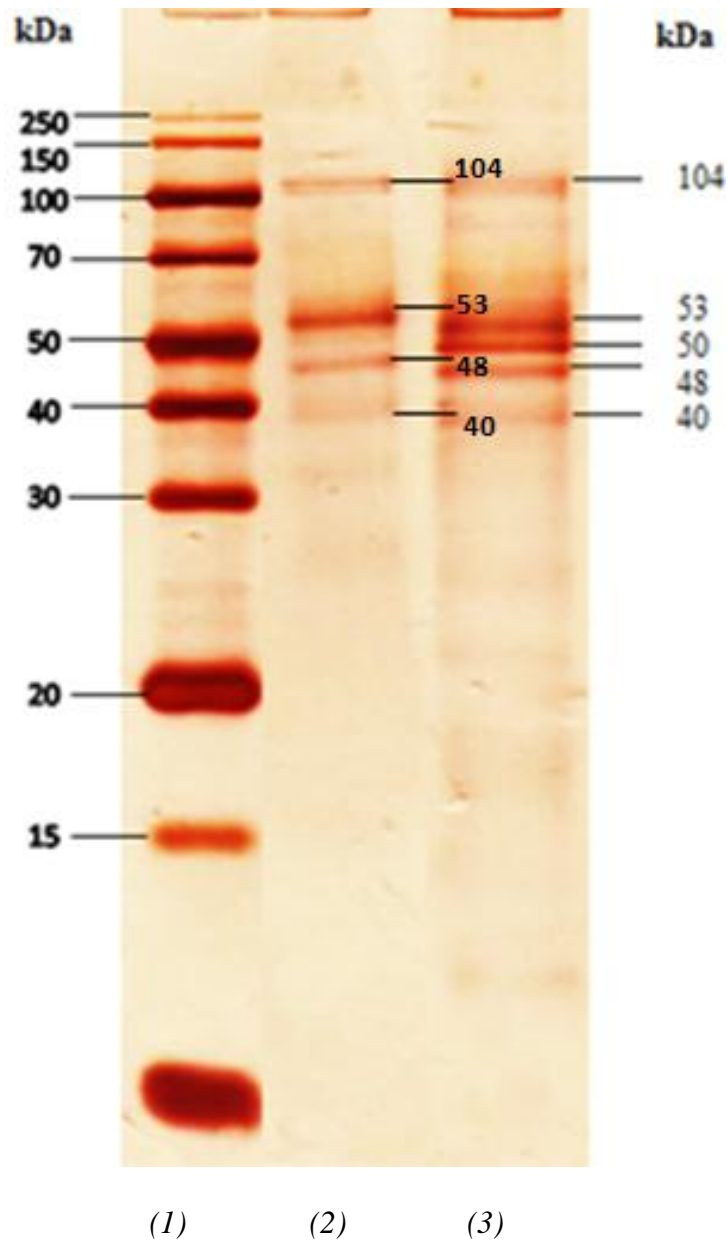
| OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi (kDa) | OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi (kDa) |
|--|--|
| 143 | 104 |
| 100 | 53 |
| 70 | 50 |
| 50 | 48 |
| 40 | 40 |
| 37 | - |
| 35 | - |
| 31,1 | - |
| 21 | - |
| 18 | - |

Berdasarkan hasil SDS-PAGE dengan pewarnaan *silver* ($AgNO_3$), profil OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi didapatkan sepuluh pita (*band*) protein yang teridentifikasi yaitu 143 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 37 kDa, 35 kDa, 31,1 kDa, 21 kDa, dan 18 kDa sedangkan pada OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi didapatkan lima pita (*band*) protein yang teridentifikasi yaitu 104 kDa, 53 kDa, 50 kDa, 48 kDa, dan 40 kDa (Gambar 4.3).

4.1.3 Profil SDS-PAGE OMP dengan 2 kali NOG Tanpa Presipitasi dan OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi

Penelitian ini juga menunjukkan hasil SDS-PAGE OMP dengan 2 kali NOG tanpa presipitasi dan OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi. Presipitasi dilakukan mengingat bahwa teknik SDS-PAGE membutuhkan sampel protein yang cukup pekat. Artinya dengan melakukan presipitasi terlebih dahulu pada sampel akan didapatkan konsentrasi protein yang cukup pekat. Presipitasi menjadi alasan pembanding pada penelitian ini dengan tujuan mengetahui seberapa besar pengaruhnya terhadap hasil SDS-PAGE. OMP dengan 2 kali NOG dipilih sebagai

obyek pembandingan dengan alasan OMP dengan 2 kali NOG dianggap memiliki kandungan protein yang lebih stabil.



Gambar 4.4 Profil SDS-PAGE dari (1) protein marker, (2) OMP *P.gingivalis* dengan 2 kali NOG Tanpa Presipitasi dan (3) OMP *P.gingivalis* dengan 2 kali NOG terpresipitasi

Tabel 4.2 Berat molekul OMP dengan 2 kali NOG Tanpa Presipitasi dan OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi

| Berat Molekul OMP ke 2 tanpa presipitasi (kDa) | Berat Molekul OMP ke 2 dengan presipitasi (kDa) |
|--|---|
| 104 | 104 |
| 53 | 53 |
| - | 50 |
| 48 | 48 |
| 40 | 40 |

Berdasarkan hasil SDS-PAGE dengan pewarnaan *Silver Nitrat* ($AgNO_3$), profil OMP dengan 2 kali NOG Tanpa Presipitasi didapatkan empat pita (*band*) protein yang teridentifikasi yaitu 104 kDa, 53 kDa, 48 kDa dan 40 kDa sedangkan pada OMP dengan 2 kali NOG dengan presipitasi didapatkan lima pita (*band*) protein yang teridentifikasi yaitu 104 kDa, 53 kDa, 50 kDa, 48 kDa, dan 40 kDa (Gambar 4.4).

4.2 Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil OMP *P.gingivalis* melalui uji SDS-PAGE. Dari hasil pewarnaan hapusan preparat pada gambar 4.1 dan gambar 4.2 terlihat bakteri *P. gingivalis* dengan bentuk batang. Dengan pewarnaan gram, koloni bakteri nampak berwarna merah muda menandakan bahwa *P. gingivalis* merupakan bakteri gram negatif dan tidak ditemukan adanya kontaminasi bakteri gram positif pada kultur turunan ke tiga dari *P.gingivalis* murni ATCC 33277. Bakteri gram negatif adalah bakteri yang tidak mempertahankan zat warna kristal violet pada waktu proses pewarnaan Gram sehingga akan berwarna merah muda bila diamati dengan mikroskop (Madigan *et al.*, 2006). Hal ini dikarenakan bakteri gram negatif (seperti *P.gingivalis*) memiliki sistem membran ganda di mana membran plasmanya diselubungi oleh membran luar permeabel. Bakteri ini mempunyai dinding sel tebal berupa peptidoglikan, yang terletak di antara membran dalam dan membran luarnya

yang dapat menyebabkan lunturnya warna biru saat disiram *etanol* pada pewarnaan gram (Cooper dan Hausman, 2007).

Pengamatan profil protein dalam penelitian ini menggunakan metode elektroforesis. Metode karakterisasi protein dengan menggunakan SDS-PAGE umumnya didasarkan pada berat molekul protein. Karakterisasi protein ini menggunakan metode elektroforesis karena tidak mempengaruhi struktur bipolimer dan sensitif terhadap berat molekul yang cukup kecil (Bachrudin, 1999). Pada penelitian ini identifikasi profil protein OMP berdasarkan berat molekul relatifnya telah dilakukan preparasi protein menggunakan teknik SDS-PAGE dengan menentukan perbedaan letak pita pada gel dibandingkan dengan *marker* protein, yang diperkirakan berat molekul relatif protein berkisar antara 10 -250 Kilo Dalton (Sutiman *at al*, 1989).

Berdasarkan hasil SDS-PAGE dengan pewarnaan *Silver Nitrat (AgNO₃)*, profil OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi menunjukkan hasil yang lebih variatif yaitu 143 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 37 kDa, 35 kDa, 31,1 kDa, 21 kDa, dan 18 kDa dibandingkan dengan profil OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi yang hanya terdeteksi lima pita protein yaitu 104 kDa, 53 kDa, 50 kDa, 48 kDa, dan 40 kDa. OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi yang didapatkan dari hasil isolasi OMP dengan satu kali pemberian NOG sedangkan OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi didapatkan dari hasil pengulangan pemberian NOG pada palet OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi yang mana keduanya sama-sama dilakukan presipitasi. OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi menunjukkan hasil pita protein yang lebih sedikit terdeteksi daripada OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi. OMP dengan berat molekul 37 kDa, 35 kDa, 31,1 kDa, 21 kDa, dan 18 kDa hanya muncul pada sampel OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi. Hal ini dikarenakan ada kemungkinan protein yang terdeteksi pada hasil SDS-PAGE OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi merupakan sisa dari protein yang masih terdapat dalam palet OMP dengan 1 kali NOG dan protein dengan berat molekul 37 kDa, 35 kDa, 31,1 kDa, 21 kDa, dan 18 kDa kemungkinan sudah terisolasi semua pada tahap isolasi

dengan pemberian NOG pertama sehingga tidak didapatkan OMP dengan berat molekul 37 kDa, 35 kDa, 31,1 kDa, 21 kDa, dan 18 kDa pada sampel OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi.

Dari hasil SDS-PAGE juga nampak bahwa sampel OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi menghasilkan pita protein yang lebih banyak dibandingkan sampel OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi. Hal ini menandakan bahwa pemberian NOG dapat mempengaruhi konsentrasi OMP sehingga akan berpengaruh pada hasil SDS-PAGE. Pada konsentrasi deterjen yang rendah seperti NOG, molekul deterjen akan mengikat membran. Deterjen melarutkan protein membran dengan meniru mekanisme lingkungan lipid bilayer. Deterjen mengandung senyawa yang dapat menurunkan tegangan permukaan melalui interaksi hidrofobik. Daerah hidrofobik membran protein biasanya tertanam dalam lapisan membran lipid bilayer. Lapisan molekul deterjen mengelilingi daerah hidrofobik ini. Sedangkan daerah hidrofiliknya akan terpapar media cair dari deterjen. Hal inilah yang membuat membran protein larut.

Profil OMP dengan 2 kali NOG tanpa presipitasi didapatkan empat pita (*band*) protein yang teridentifikasi yaitu 104 kDa, 53 kDa, 48 kDa dan 40 kDa sedangkan pada OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi didapatkan lima pita (*band*) protein yang teridentifikasi yaitu 104 kDa, 53 kDa, 50 kDa, 48 kDa, dan 40 kDa (Tabel 4.2). Perbedaan hasil SDS-PAGE antara OMP dengan 2 kali NOG tanpa presipitasi dan OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi terletak pada OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi yang memiliki jumlah pita protein yang lebih banyak daripada OMP dengan 2 kali NOG tanpa presipitasi. Protein dengan berat molekul 50 kDa tidak nampak pada sampel tanpa presipitasi. Selain itu pada sampel OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi menghasilkan gambaran pita protein yang lebih jelas daripada sampel OMP ke 2 tanpa presipitasi. Hal ini dikarenakan presipitasi dengan etanol absolut dapat meningkatkan konsentrasi protein dalam sampel menjadi lebih pekat. Penambahan pelarut organik seperti etanol pada sampel protein akan menurunkan Kd (Konstanta Dielektrik) pelarut/air yang dapat meningkatkan tarikan

antara molekul-molekul bermuatan dan memfasilitasi interaksi elektrostatik protein. Selain itu pelarut organik ini juga akan menggantikan beberapa molekul air di sekitar daerah *hidrofob* dari permukaan protein yang berasosiasi dengan protein sehingga menurunkan konsentrasi air dalam larutan dengan demikian kelarutan protein akan menurun dan memungkinkan terjadinya pengendapan. Selain itu etanol absolut akan menurunkan tekanan dielektrika air sehingga polaritas pelarut menurun, protein yang lebih polar menjadi tidak larut dalam pelarut kurang polar, sehingga akan mengendap dan menjadi lebih pekat (Walker dkk., 1988). Konsentrasi yang cukup pekat inilah yang nantinya akan mempengaruhi migrasi protein pada SDS-PAGE.

Tebal tipisnya pita yang terbentuk dari pita protein menunjukkan kandungan atau banyaknya protein yang mempunyai berat molekul yang sama yang berada pada posisi pita yang sama. Hal ini sejalan dengan prinsip pergerakan molekul bermuatan, yakni molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik, molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang sama atau berdekatan (Soedarmadji, 1996). Hasil berupa pita-pita protein yang mengendap sesuai dengan berat molekulnya semakin kebawah berat molekulnya semakin kecil (Hames, 1990, Matsudaira, 1993, Davis *et al.*, 2003). Dari hasil pengamatan antara sampel OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi, OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi dan OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi didapatkan pita protein dengan nilai berat molekul berturut-turut 18 kDa, 21 kDa, 31,1 kDa, 35 kDa, 37 kDa, 40 kDa, 48 kDa, 50 kDa, 53 kDa, 70 kDa, 100 kDa, 104 kDa, dan 143 kDa. Pita- pita protein yang terdeteksi berdasarkan berat molekulnya dalam sampel OMP *P.gingivalis* strain ATCC 33277 merupakan jenis-jenis protein yang terdapat pada *outer membran P.gingivalis* yaitu berkisar antara 18 kDa sampai 143 kDa. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ebersole dan Steffen (1995) yang mengidentifikasi berat molekul OMP *P.gingivalis* berturut-turut dari 10 kDa sampai 120 kDa. Monica *et al* (2007) yang juga menyebutkan berat moleku OMP *P.gingivalis* ATCC 33277 berkisar antara 15 kDa sampai 128 kDa.

Dari ketiga sampel OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi, OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi dan OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi didapatkan pita protein dengan nilai berat molekul sama yaitu sebesar 40 kDa. Artinya protein dengan nilai berat molekul sama tersebut kemungkinan merupakan protein yang jumlahnya lebih banyak pada sampel OMP *P.gingivalis* yang mana meskipun ketiganya memiliki perbedaan pada tahap perlakuan pemberian NOG maupun presipitasi, pita protein dengan nilai berat molekul 40 kDa masih tetap muncul. Ada beberapa pendapat yang dikemukakan oleh banyak peneliti salah satunya Wijaya & Rahman (2005) mengatakan bahwa protein yang memiliki ketebalan dan intensitas warna yang lebih besar dan selalu ada di setiap varietas dibandingkan dengan protein yang lain disebut protein mayor. Namun dalam hal ini belum dapat dipastikan apakah OMP dengan berat molekul 40 kDa merupakan protein mayor yang terdapat pada *outer membran P.gingivalis* ATCC 33277.

Sebuah penelitian yang dilakukan Hiratsuka *et al* (1992) menyebutkan OMP yang memiliki berat molekul 40 kDa diproduksi oleh *P. gingivalis* (40-kDa OMP) merupakan faktor virulensi utama yang terlibat dalam kegiatan *coaggregation P.gingivalis*. Selanjutnya Shibata *et al* (2003) juga menyebutkan OMP yang memiliki berat molekul 40 kDa telah ditunjukkan menjadi protein yang dapat mengikat hemin. OMP dengan berat molekul 40 kDa berada baik pada permukaan sel vesikel dan ekstraseluler dan ditemukan pada banyak strain *P.gingivalis* (Haratsuka *et al.*, 1992; Saito *et al.*, 1997; Abiko *et al.*,1997; Hamajima *et al.*, 2007). Studi sebelumnya telah menunjukkan bahwa antibodi monoklonal (Abs) terhadap OMP 40 kDa *P.gingivalis* memberikan efek penghambatan pada aktivitas *coaggregation P.gingivalis* dan memiliki aktivitas *complement-mediated* terhadap bakterisidal (Hiratsuka *et al.*, 1992; Saito *et al.*,1997; dan Shibata *et al.*, 2003). Selanjutnya, antibodi monoklonal (Abs) terhadap OMP 40-kDa memberikan perlindungan terhadap kehilangan tulang yang disebabkan oleh *P. gingivalis* pada tikus (Hamajima *et al.*, 2007). Hasil studi ini menunjukkan bahwa induksi antibody spesifik OMP 40 kDa *P. gingivalis* di mukosa oral adalah pendekatan logis untuk pencegahan *P. gingivalis* infeksi.

Masuknya atau invasi bakteri atau produk bakteri ke jaringan periodontal diperkirakan penting bagi proses terjadinya penyakit (Nisengard *et al.*, 2006). Proses yang menyebabkan terjadinya infeksi bakteri diawali dengan perlekatan, kemudian dilanjutkan dengan kolonisasi kemudian invasi. Molekul adhesi bakteri bisa terletak di pili atau *Outer Membrane Protein* (OMP) (Salyer dan Whitt, 1994).

Bila terjadi serangan bakteri, tubuh akan meresponnya dengan reaksi inflamasi sebagai mekanisme pertahanan awal (respon imun alami). Faktor-faktor virulensi yang terlibat dalam kolonisasi jaringan akan dapat mengubah pertahanan jaringan host (Imamura, 2003). OMP memegang peranan penting dalam pertumbuhan koloni, pembentukan biofilm, dan perkembangan penyakit (Yoshimura *et al.*, 2009). OMP juga merupakan faktor virulensi utama yang terkait dengan kolonisasi *P. gingivalis* di sulkus gingiva (Kobayashi *et al.*, 2006).

Pada saat terjadinya inflamasi, sejumlah sel *host* dan mediator pro-inflamatori akan berkumpul pada sisi yang terinfeksi. Sel-sel *host* tersebut meliputi sel *mast*, netrofil (PMN), makrofag, sel NK, sel plasma, dan limfosit. Sel-sel *host* ini kemudian mensekresi sejumlah mediator pro-inflamatori yaitu sitokin untuk membantu melawan serangan bakteri dalam proses inflamasi (Vernino, 2004).

Sitokin merupakan molekul biologik aktif sebagai mediator inflamatori yang berperan sebagai pembawa sinyal antar sel-sel. Apabila sitokin dihasilkan dalam jumlah yang cukup terhadap stimulus imun, sitokin berfungsi sebagai imun protektif, dan sebaliknya apabila sitokin dihasilkan melebihi kebutuhan (hipersensitivitas), maka sitokin akan bertindak sebagai non-imun protektif. Dalam hal ini, sitokin akan mempengaruhi sejumlah faktor yang terlibat dalam destruksi jaringan periodonsium (Nikolopoulos *et al.*, 2008).

Apabila sel-sel *host* dan sejumlah mediator tersebut tidak mampu melawan serangan bakteri, maka respon imun adaptif akan teraktivasi. Dalam hal ini, makrofag sebagai sel penyaji antigen (APC) akan memproses antigen yang akan disajikan sebagai suatu molekul pada permukaan sel bersama dengan protein MHC sehingga limfosit T akan teraktivasi dan IFN- γ dihasilkan selama adanya antigen spesifik sel-

sel T tersebut. Pada keadaan yang tidak terkendali (reaksi hipersensitivitas), proses inflamasi yang dikatakan sebagai mekanisme pertahanan tubuh, bahkan dapat berbalik menjadi sesuatu yang merugikan tubuh. Apabila proses inflamasi ini terus berlanjut dan kadar keempat sel sitokin (IL-1, IL-6, TNF- α , dan IFN- γ) meningkat pada jaringan periodonsium (Nikolopoulos *et al.*, 2008). *P. gingivalis* adalah stimulator poten dari mediator inflamasi seperti Interleukin-1 (IL-1) dan Prostaglandin E₂ yang akhirnya dapat menyebabkan resorpsi tulang (Culter *et al.*, 1995). Apabila proses inflamasi ini terus berlanjut dan kadar keempat sel sitokin (IL-1, IL-6, TNF- α , dan IFN- γ) meningkat pada jaringan periodonsium, maka keempat sel-sel sitokin ini akan menstimulasi RANKL dan M-CSF dan menunjukkan adanya peningkatan proses inflamasi dan destruksi jaringan periodonsium. Keadaan yang tidak terkendali ini akan semakin memperparah kondisi kerusakan jaringan periodontal bahkan mengarah kepada kehilangan gigi (Nikolopoulos *et al.*, 2008).

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai karakteristik spesifik protein dengan berat molekul tertentu untuk dapat mengetahui peranan lebih jauh terkait faktor virulensi *P.gingivalis*.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil karakterisasi OMP *P.gingivalis* ATCC 33277 dengan SDS-PAGE, dapat disimpulkan bahwa:

- 5.1.1 Profil OMP *P.gingivalis* memiliki rentang berat molekul antara 18 kDa sampai 143 kDa. Profil SDS-PAGE OMP *P.gingivalis* yang memiliki konsentrasi tinggi adalah protein dengan berat molekul 48 kDa, 50 kDa, 53 kDa, dan 100 kDa.
- 5.1.2 Protein dengan berat molekul 40 kDa dalam OMP *P.gingivalis* kemungkinan jumlahnya lebih banyak karena selalu muncul baik pada isolasi OMP dengan 1 kali NOG maupun 2 kali NOG.
- 5.1.3 Presipitasi dapat mempengaruhi konsentrasi OMP *P.gingivalis* menjadi lebih pekat.

5.2 Saran

- 5.2.1 Pita protein hasil SDS-PAGE yang tampak terlihat tebal dan selalu muncul dapat diteliti lebih lanjut mengenai karakter spesifik protein yang ada dalam pita tersebut dan manfaatnya.
- 5.2.2 Diperlukan tahap presipitasi pada sampel protein sebelum dilakukan SDS-PAGE untuk meningkatkan konsentrasi sampel menjadi lebih pekat.
- 5.2.3 Perlu adanya penelitian lebih lanjut terhadap pita protein tertentu yang teridentifikasi untuk mengetahui peranan yang lebih besar mengenai faktor virulensi *P.gingivalis* terkait dengan penyakit periodontal.

DAFTAR BACAAN

- A. Cooper, R. Reimann, and D. Cronin. 2007. *About Face 3: The Essentials of User Interface Design*. John Wiley & Sons, Inc.
- Abiko, Y. M., Hayakawa, H., Aoki, Kikuchi, T., Shimatake, H. H., Takiguchi . 1990 Cloning of a *Bacteroides gingivalis* outer membrane protein gene in *Escherichia coli*. *Arch Oral Biol*. Vol.35:689-695.
- Abiko, Y.N., Ogura, U., Matsuda, K., Yanagi, dan H. Takiguchi. 1997. A human monoclonal antibody that inhibits the coaggregation activity of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immune* 65:3966 -3969.
- Anna, P. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Axelsson,. P. 2002. *Diagnosis and risk prediction of periodontal disease*. Quintessence Publishing Co. Inc: 204-214.
- Baron, C. and Thompson, T. E. 1975. *Biochim. Biophys. Acta* 382, 276-285.
- Botero, J.E., Contreras, A., Lafaurie, G., Jaramillo, A., Betancourt, M., Arce, R.G., 2007. Occurrence of Periodontopathic and Superinfecting Bacteria in Chronic And Aggressive Periodontitis subject in a Colombians Population. *J Periodontol*. Vol.78:696-704.
- Bachrudin, Z. 1999. *Petunjuk Laboratorium: Isolasi, Identifikasi, dan Pewarnaan Protein*. Yogyakarta: PAU Bioteknologi UGM.

- Chen, F., Duncan, Margaret, Dewhirst, Tsute. 1994. *Genome Project*. Department of molecular genetics. Boston: The Forsyth institute.
- Cooper, G.M., Hausman, R.E. 2007. *The Cell: A Molecular Approach*. 4th ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Cutler, C.W., Chalmer, J.R., Genco, C.A. 1995. Pathogenic strategies of the oral anaerob *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol.* Vol.3: 45–51.
- Davis, P.H., dan Heywood, V.H. 2003. *Basic Methods in Molecular Biology*. 2nd Ed. Connecticut: Appleton & Lange Gehrig JSN, Willmann DE. Foundation of Periodontics for the Dental Hygienist. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Fulop, M., Manchee, R., Titball, R. 1996. Outer membrane antigens in the induction of protective immunity against *Francisella tularensis* strains of different virulence. *Immunol Med Microbiol.* Vol.13: 245-247.
- Grenier, D., Mayrand, D., Kuramitsu, H.K., Ellen, R. 2000. *Periodontitis as an ecological imbalance*. In *Oral Bacterial Ecology*. The Molecular Basis. Horizon Scientific Press: Wymondham, UK: Horizon Scientific Press Wymondham.
- Hamajima, S., M. Maruyama, T. Hijiya, H. Hatta, dan Y. Abiko. 2007. Egg yolk-derived immunoglobulin (IgY) against *Porphyromonas gingivalis* 40-kDa outer membrane protein inhibits coaggregation activity. *Arch. Oral Biol* 52: 697 -704.
- Hames, B.D., and Rickwood. 1990. *A Practical Approach: Gel electrophoresis protein*. Huntington: Robert E Krieger Publishing Company.
- Hiratsuka, K., Y. Abiko, M. Hayakawa, T. Ito, H. Sasahara, dan H. Takiguchi. 1992. Role of *Porphyromonas gingivalis* 40-kDa outer membrane protein in the aggregation of *P. gingivalis* vesicles and *Actinomyces viscosus*. *Arch. Oral Biol* 37: 717 -724.

- Holt, S.C., Kesavalu, L., Walker, S., Genco, C.,A. 1999. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*. Vol.20: 168–238.
- Imai, M., Murakami, Y., Nagano, K., Nakamura, H., Yoshimura, F. 2005. Major outer membrane proteins from *Porphyromonas gingivalis*: strain variation, distribution, and clinical significance in perirecicular lesion. *Eur J oral sci med*. Vol.113(5): 391-99.
- Imamura, T. 2003. in novel gingipain of periodontal disease pathogenic. *J Periodontol*. Vol.74: 111-8.
- Jawetz, M., Adelberg's. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Cetakan I edisi 23. Alih Bahasa: Huriwati Hartanto dkk. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG.
- Khopkar, S.M. 2002. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Kobayashi, T., Kaneko, S., Tahara, T., Hayakawa, M., Abiko, Y., Yoshie, H. 2006. Antibody Response to *Porphyromonas gingivalis* Hemagglutinin A and Outer Membrane Protein in *Chronic Periodontitis*. *J periodontol*. Vol.77(3): 364-369.
- Lakitan, Benyamin. 1993. *Dasar-dasar fisiologi tumbuhan*. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta. Hal. 7-17.
- Lamont, R.J., Oda, D., Persson, R.E., Persson, G.R. 1992. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. *Oral Microbiol Immunol*. Vol. 7 : 364–367.
- Lawrence, E. 1989. *Henderson's dictionary of biological terms*. 10th ed. New York: John Will & Sons.
- Leber, T.M., and Balkwil. 1997. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal. Biochem.*, 249: 24-28

- Lehninger, L. A. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia*, alih bahasa oleh Thenawidjaja, M. 144-146. Jakarta : Erlangga.
- Leslie, C. 1998, *Topley Wilson's Microbiology and microbial infection : Systematic bacteriology* 9th ed. New York: Oxford University Press, Inc.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. B. 2003. *Biology of Microorganism, 10th Edition*. Southern Illinois University Carbondale, Pearson Education, Inc.
- Manitto, Paulo. 1981. *Biosintesis Produk Alami*. IKIP Semarang. Hal. 158.
- Matsudaira, P. 1993. *A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*. 2nd Ed. California: Academic Press, Inc.
- Miller, S.I. 1991. Macrophage-specific modulators of *Salmonella* virulence. *Mol. Microbiol.* Vol.5 (9): 2073–2078.
- Murdjani. 2002. *Identifikasi dan Patologi Bakteri Vibrio alginolitycus pada ikan Kerapu Tikus*. Disertasi. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya.
- Nikolopoulos, G., K., Dimonu, N., L., Hamodrakas, S., J., Bagos, P., G. 2008. *Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 417 cases and 4590 controls. J Clin Periodontol* 1-14
- Nisengard, Jennifer, E., John, F., Ferguson, Emily Hinz, John, S., Isaacson, Rory Gauthie. 2006. *Technological Advancements: Seismic Refraction on the Pajarito Plateau*, Northern New Mexico. 71st Annual Society for American Archaeology Meetings in San Juan, Puerto Rico
- Noril, Y., Ozaki, K., Nakae, H., Matsuo, T., Ebisu, S. 1997. Immunohistochemistry experimental study of localized *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, and *Viscivus actinomyces* in periodontal pocket. *J Periodontol.* Vol.32: 598-607.

- Novak, K., and Novak, M.J. 2006. *Aggressive Periodontitis* in Newman, M.G., Takei, H.H., Klokkevold, P.R., *Clinical Periodontology* 10th Ed. Philadelphia: WB Saunders.
- Quirynen, M., Teughels, W. & van Steenberghe, D. 2006. Impact of antiseptics on one-stage, full-mouth disinfection. Letter to the editor. *Journal of Clinical Periodontology* 33,49–52.
- Rantam, Fedik A. 2003. *Metode Immunologi*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Rouessac Francis and Annick Rouessac. 2007. *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*. Second Edition. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.
- Saito, S., K. Hiratsuka, M. Hayakawa, H. Takiguchi, dan Y. Abiko. 1997. Inhibition of *Porphyromonas gingivalis* colonizing factor between *Actinomyces viscosus* ATCC 19246 by monoclonal antibodies against recombinant 40-kDa protein outer membrane. *Gen. Pharmacol* 28: 675 -680.
- Salzer, A.A., And Whitt, D.D.1994. *Bacterial pathogenesis*. Washington DC: ASM press.
- Shibata, Y., K. Hiratsuka, M. Hayakawa, T. Shiroza, H. Takiguchi, Y. Nagatsuka, dan Y. Abiko. 2003. A 35-kDa co-aggregation factor is a protein that binds hemin in *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 300: 351 -356.
- Slots, J., and Ting, M. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* human periodontal disease: occurrence and treatment. *J Periodontol* Vol.20: 82-121.
- Socransky, S.S., and Haffajee, A.D., 1992, The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. *J Periodontol*. Vol.63:322-31.

- Stryer, Lubert. 2000. *Biokimia Vol I*. Edisi 4. Jakarta: EGC.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., Suhardi. 1996. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Penerbit Liberty.
- Sulaiman, Hardi, A., dan Kundari, N.A. 2007. Pemisahan dan karakterisasi spesi senyawa kompleks ytrium-90 dan sstronsium-90 dengan elektroforesis kertas. *JFN*. Vol.1 (2): 34-38.
- Sutiman, B. Sumitro, Sri Rahayu, Fatiyah, Sri Widyarti Esti. 1989. *Diktat Kuliah dan Praktikum. Kursus Teknik-teknik dasar Analisis Protein dan DNA*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Taiz, Lincoln dan Zeiger Eduardo. 1991. *Plant physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.* Californis. pp. 9-15.
- Tortora, G. J. 2004. *Microbiology an Introduction. International Edition. Publication Benjamin Cummings, Pearson Education, San Fransisco.* 441.
- Tsurumi, Y., Hayakawa, M., Shibata, Y., Abiko, Y., 2003. Production of antibody against a synthetic peptide of *Phorpyromonas gingivalis* 40 kDa outer membrane protein. *J oral sci.* Vol.45(2):111-116.
- Vernino AR. 2004. *Etiologi penyakit periodontal*. In: Fedi PF, Vernino AR, Gray JL, *Silabus periodonti*. eds.4thed. Alih Bahasa. Amaliya. Jakarta: EGC,:13-20
- Walker, J. M., and Gingold, E. B.1988. *Molecular Biology and Biotechnology*, 2nd. The Royal Society of Chemistry. London: Burlington House. 303-304.
- Westermeier. 2004. *Electrophoresis in Practice: A Guide to Theory and Practice*. New Jersey: John Wiley & Sons inc.

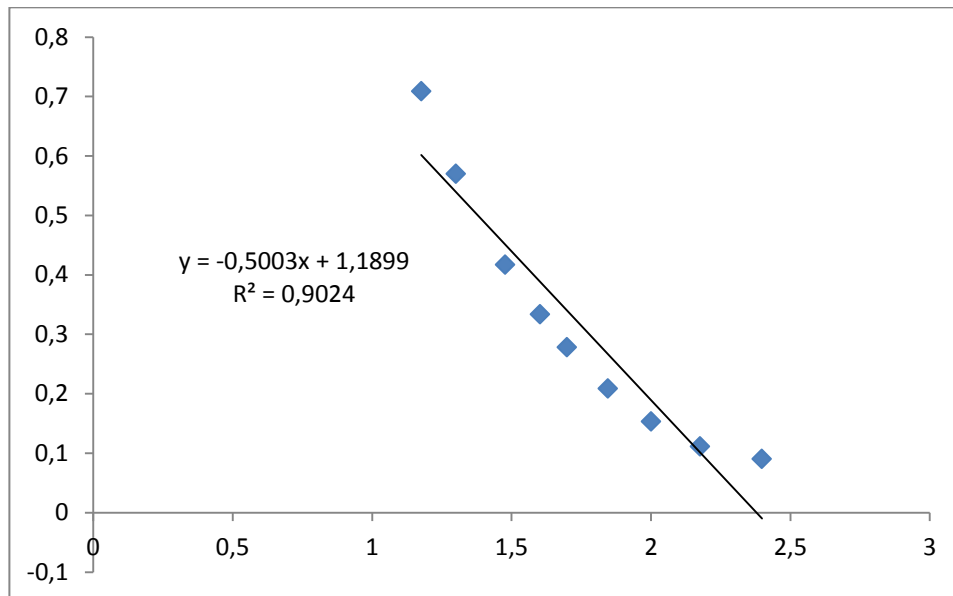
- Wijaya, S.K.S., & Rohman, L. 2005. *Fraksinasi dan Karakterisasi protein Utama Biji Kedelai*. Jember: Fakultas MIPA Universitas Jember.
- Winarno, F. G., 1992. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Penerbit Gramedia.
- Yepyhardi. 2009. *Elektroforesis; Pintu Gerbang Penelitian Biologi Molekular*. Jakarta: UI-Press.
- Yoshimura, F., Murakami, Y., Nishikawa, K., Hasegawa, Y., Kawaminami, S. 2009, Surface Components of *Porphyromonas Gingivalis*. *J Periodontol*. Vol.44: 1-12.
- Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekuler*. Jakarta: Erlangga

LAMPIRAN A. Perhitungan berat molekul

Tabel 1 : Sampel *protein marker*

| BM (kDa) | Jarak tracking | log BM | rf |
|-------------|-------------------|-------------|-------------|
| 250 | 0,65 | 2,397940009 | 0,090277778 |
| 150 | 0,8 | 2,176091259 | 0,111111111 |
| 100 | 1,1 | 2 | 0,152777778 |
| 70 | 1,5 | 1,84509804 | 0,208333333 |
| 50 | 2 | 1,698970004 | 0,277777778 |
| 40 | 2,4 | 1,602059991 | 0,333333333 |
| 30 | 3 | 1,477121255 | 0,416666667 |
| 20 | 4,1 | 1,301029996 | 0,569444444 |
| 15 | 5,1 | 1,176091259 | 0,708333333 |

Setelah nilai rf diketahui didapatkan rumus persamaan linier :



$Y = -0,5003X + 1,1899$, dengan nilai $R^2 = 0,9024$. Nilai Log Berat molekul sebagai sumbu x dan nilai rf sebagai sumbu y.

Tabel 2 : Sampel OMP dengan 1 kali NOG terpresipitasi

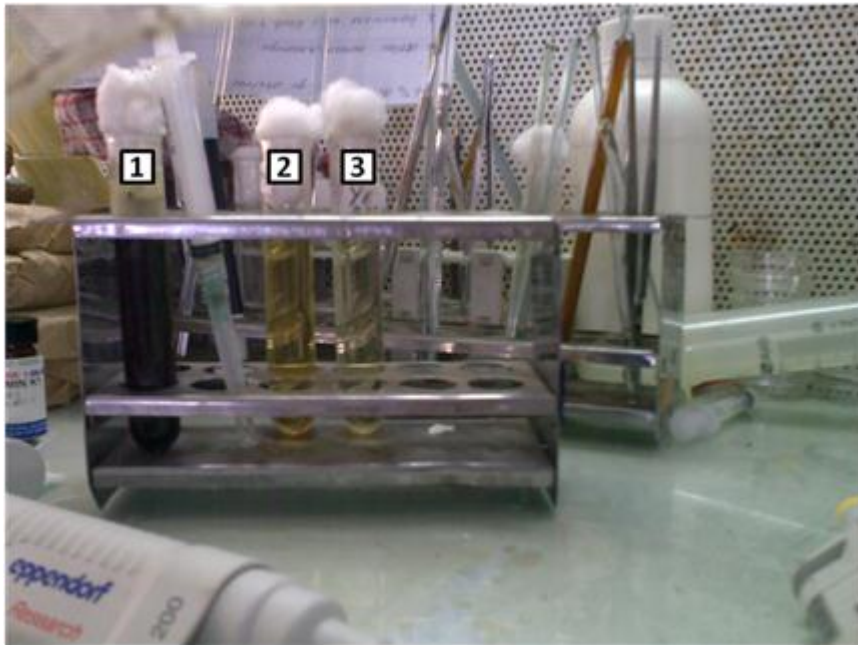
| BM (kDa) | Jarak tracking | log BM | rf |
|---------------------|---------------------------|---------------|-------------|
| 143 | 0,8 | 2,156284007 | 0,111111111 |
| 100 | 1,35 | 2,003597841 | 0,1875 |
| 70 | 1,5 | 1,96195616 | 0,208333333 |
| 50 | 2,45 | 1,698225509 | 0,340277778 |
| 40 | 2,8 | 1,601061585 | 0,388888889 |
| 37 | 2,9 | 1,573300464 | 0,402777778 |
| 35 | 3 | 1,545539343 | 0,416666667 |
| 31,1 | 3,19 | 1,492793213 | 0,443055556 |
| 21 | 3,8 | 1,323450374 | 0,527777778 |
| 18 | 4 | 1,267928132 | 0,555555556 |

Tabel 3 : Sampel OMP dengan 2 kali NOG terpresipitasi

| BM (kDa) | Jarak tracking | log BM | rf |
|---------------------|---------------------------|---------------|-------------|
| 104 | 1,3 | 2,017478402 | 0,180555556 |
| 53 | 2,35 | 1,72598663 | 0,326388889 |
| 50 | 2,45 | 1,698225509 | 0,340277778 |
| 48 | 2,5 | 1,684344949 | 0,347222222 |
| 40 | 2,8 | 1,601061585 | 0,388888889 |

Tabel 4 : Sampel OMP dengan 2 kali NOG tanpa presipitasi

| BM (kDa) | Jarak tracking | log BM | rf |
|---------------------|---------------------------|---------------|-------------|
| 104 | 1,3 | 2,017478402 | 0,180555556 |
| 53 | 2,25 | 1,753747751 | 0,3125 |
| 48 | 2,5 | 1,684344949 | 0,347222222 |
| 40 | 2,8 | 1,601061585 | 0,388888889 |

LAMPIRAN B. Gambar Alat dan Bahan penelitian

Gambar B.1 Bahan membuat suspensi *Porphyromonas gingivalis* (1) vitamin K, (2) BHI, (3) hemin



Gambar B.2 Media tempat kultur *Porphyromonas gingivalis* terdiri dari BHI, vit.k, dan hemin



Gambar B.3 Media *P. gingivalis* terdiri dari BHI, vit.k, dan hemin yang telah ditumbuhi bakteri *P. gingivalis*



Gambar B.4 *P.gingivalis* murni



Gambar B.5 Spektrofotometer



Gambar B.6 Laminar Flow



Gambar B.7 Anaerobic Jar



Gambar B.8 Inkubator



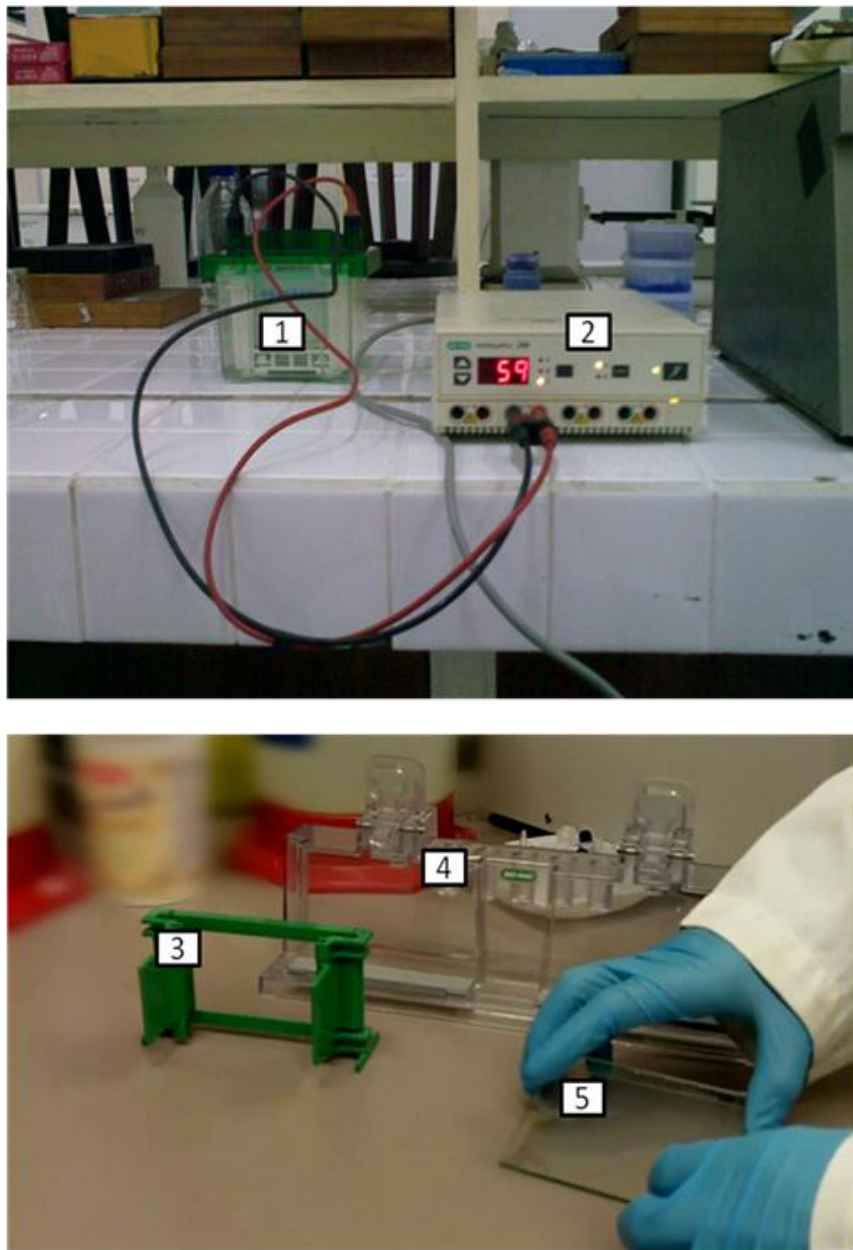
Gambar B.9 Mikroskop binokuler



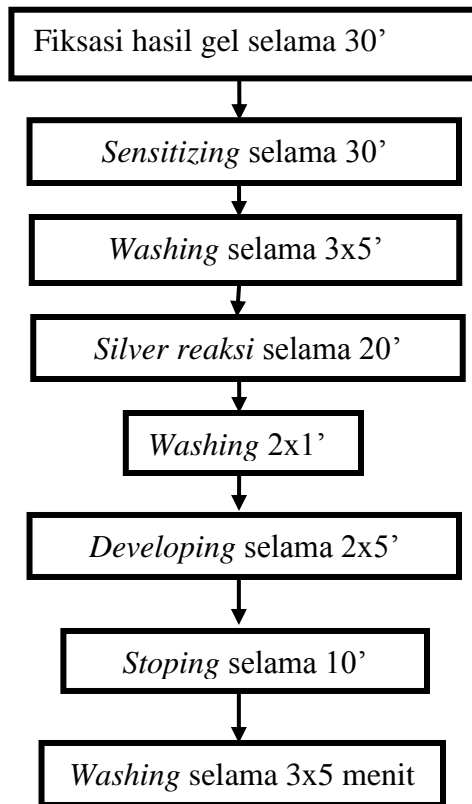
Gambar B.10 : Sentrifus 12000 rpm



Gambar B.11 : Omnimixer



Gambar B.12 Seperangkat alat elektroforesis terdiri dari (1) kotak *comb*, (2) *power supply*, (3) *casting frame*, (4) *casting stand*, (5) *glass plate*

LAMPIRAN C. Skema dan bahan pewarnaan *Silver Nitrat* (AgNO_3)

Gambar B.13 Skema proses pewarnaan hasil SDS-PAGE dengan *Silver Nitrat* (AgNO_3)



Gambar B.13 Bahan –bahan pewarnaan *Silver Nitrat* (AgNO_3) terdiri dari : (1) asam asetat glasial, (2) Natrium tiosulfat, (3) silver nitrat