
DOSIS INAKTIF DAN KADAR PROTEIN *Klebsiella pneumonia* K5 HASIL IRADIASI GAMMA

I. Sugoro¹, Y. Windusari², dan D. Tetriana³

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, BATAN, Jakarta¹
Jurusan Biologi – Universitas Sriwijaya²
PTKMR – BATAN, Jakarta³

ABSTRAK

DOSIS INAKTIF DAN KADAR PROTEIN *Klebsiella pneumonia* K5 HASIL IRADIASI GAMMA. Tujuan dari percobaan ini adalah untuk mengetahui dosis inaktif dan kadar protein sel bakteri *Klebsiella pneumonia* K5 hasil iradiasi gamma. Tahapan percobaan adalah iradiasi kultur bakteri dengan dosis 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1.000 dan 1.500 Gy (laju dosis 1089,59 Gy/jam). Penentuan dosis inaktif diketahui dengan metode *drop test* dan kadar protein diukur dengan metode *Lowry*. Hasil percobaan menunjukkan bahwa dosis inaktif sel bakteri *K. pneumoniae* adalah antara 600 Gy – 1.500 Gy. Iradiasi dengan dosis berbeda pada kultur bakteri menunjukkan adanya perubahan konsentrasi protein sel bakteri yang tidak menentu dan adanya pengaruh yang nyata dosis radiasi terhadap kandungan protein.

Kata kunci : *Klebsiella pneumonia* K5, iradiasi gamma, inaktif, protein.

ABSTRACT

INACTIVE DOSES AND PROTEIN CONCENTRATION OF *Klebsiella pneumonia* K5 GAMMA IRRADIATED. An experiment has been conducted to determine the inactive doses and the protein concentration of *Klebsiella pneumonia* K5 which has been irradiated by gamma rays. The experiment was done by irradiating of cells culture at doses of 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1.000 and 1.500 Gy (doses rate is 1089,59 Gy/hours). The inactive dose was determined by the drop test method and the protein concentration of cells were determined by Lowry method. The results showed that the inactive doses occurred at 600 – 1500 Gy. The different irradiation doses of cell cultures showed the effect of gamma irradiation on the protein concentration was random and has a significant effect on the protein concentration.

Key words : *Klebsiella pneumonia* K5, gamma irradiated, inactive, protein.

PENDAHULUAN

Klebsiella pneumonia merupakan salah satu bakteri coliform yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia dan hewan. Bakteri ini menginfeksi saluran pernapasan terutama paru-paru, *nasal mucosa atrophy* dan *rhinoscleroma*. Selain itu dapat pula menginfeksi saluran kemih pada manusia usia lanjut dan kelenjar susu pada hewan. Sumber utama penyebaran bakteri ini adalah feces, diikuti dengan kontak melalui bahan yang terkontaminasi (1). *K. pneumoniae* merupakan bakteri Gram-negatif, non-motil, tak berkapsul, memfermentasi laktosa, anaerobik fakultatif, selnya berbentuk batang, dan dapat ditemukan sebagai flora normal di mulut, kulit dan usus pada manusia atau hewan (2).

Penyakit yang ditimbulkan oleh *K. pneumoniae* dapat diatasi dengan menggunakan berbagai macam antibiotik, tetapi cara pengobatan tersebut dapat menimbulkan resistensi pada beberapa strain *K. pneumoniae* dan adanya residu anti biotik, sehingga perlu mencari alternatif lain untuk mencegah penyakit ini. Salah satunya adalah dengan pemberian vaksin (3). Vaksin merupakan suatu suspensi mikroorganisme yang telah dimatikan atau dilemahkan sehingga tidak akan menimbulkan penyakit dan dapat merangsang pembentukan kekebalan/antibodi bila diinfeksi (4).

Pembuatan vaksin dapat dilakukan dengan cara konvensional, baik secara kimia maupun pemanasan. Alternatif lainnya dengan menggunakan iradiasi gamma untuk menginaktivasi sel bakteri. Metode inaktivasi dengan sinar gamma memiliki efektivitas dalam peningkatan respon imun dibandingkan dengan cara pemanasan (5). Harus diperhatikan bahwa vaksin dari bakteri yang dilemahkan dengan iradiasi gamma memiliki risiko tinggi saat diinfeksi ke manusia atau hewan sehat. Risiko yang dimaksud adalah bahwa bakteri dapat bermutasi dan bersifat lebih patogen (6).

Penelitian sebelumnya menunjukkan, bahwa bakteri dari jenis coliform seperti *Escherichia coli* dapat diinaktivasi dengan iradiasi gamma pada kisaran dosis 800 – 1.000 Gy. Kerusakan antigen protein akibat iradiasi tidak menunjukkan kerusakan yang signifikan, tetapi mengalami perubahan konsentrasi (7). Inaktivasi dengan iradiasi kemungkinan dapat menyebabkan perubahan baik kadar dan jenis antigen protein. Perubahan tersebut karena adanya efek langsung dan tidak langsung dari radiasi (6).

Berdasarkan hal di atas, perlu dipelajari dosis optimum iradiasi gamma agar *K. pneumoniae* menjadi inaktif dan perubahan kadar protein sel yang terjadi akibat iradiasi.

BAHAN DAN METODE

Bahan. Isolat bakteri adalah *Klebsiella pneumoniae* K5 hasil isolasi dari susu sapi perah yang terinfeksi mastitis level 3. Bahan yang digunakan adalah Tryptic Soy Broth (TSB) Pronadisa, Agar bacteriological Oxoid dan Larutan Lowry Merck

Penentuan fase mid log *Klebsiella pneumoniae*. Kultur yang berumur 1 hari pada agar miring TSA diinokulasi sebanyak 3 ose ke dalam medium TSB 30 ml lalu diinkubasi pada suhu 37°C dengan agitasi 120 rpm selama 24 jam, dijadikan sebagai kultur inokulum. Contoh diukur dengan spektrofotometer pada λ_{660} nm, kemudian sebanyak 10% v/v (10^{12} sel/ml atau nilai absorbansinya=1) dimasukkan ke dalam 30 ml medium TSB untuk pembuatan kurva tumbuh.

Nilai absorbansi kultur diukur pada menit ke 0, 30, 60, 90, 150, 210, 270 dan 330. Hasil yang diperoleh dibuat kurva tumbuh dengan sumbu x: waktu dan y: absorbansi, untuk menentukan fase *mid log*. Fase *mid log* ditentukan berdasarkan kecepatan perubahan nilai absorbansi tertinggi (7).

Iradiasi *Klebsiella pneumoniae* dengan Sinar Gamma. Kultur pada fase *mid log* disentrifugasi 10.000 rpm dan dibilas dengan 30 ml larutan NaCl 0,85% sebanyak 2 kali. Pelet 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 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1.000 dan 1.500 Gy di Iradiator *Gamma Chamber* 4.000 A dengan laju dosis 1089,59 Gy/jam. Kultur hasil iradiasi kemudian dihitung jumlah selnya dengan metode sebar untuk uji inaktivasi dengan cara menanam kembali kultur hasil iradiasi pada medium TSA. Selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 1 hari. Dari hasil yang diperoleh, didapatkan dosis inaktif kultur bakteri *K. pneumoniae* hasil iradiasi dengan cara melihat pertumbuhan bakteri *K. pneumoniae* pada medium TSA (7).

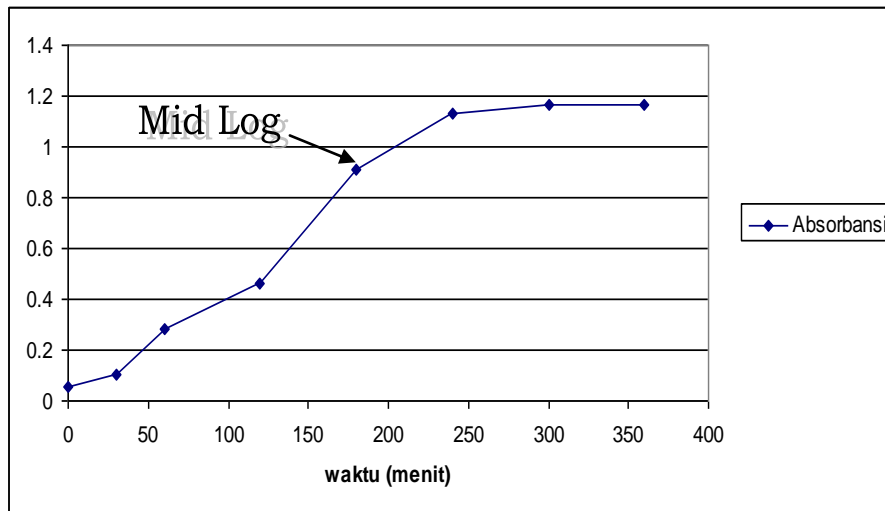
Pengukuran Protein Sel *Klebsiella pneumoniae* dengan Metode Lowry. Kultur hasil iradiasi diukur kandungan protein ekstraselular dan intraselular. Contoh disiapkan untuk menentukan kandungan protein ekstraselular langsung menggunakan kultur hasil iradiasi. Selanjutnya untuk protein intraselular dipecah terlebih dahulu dengan melarutkan kultur hasil iradiasi sebanyak 0,5 ml ke dalam aseton (1 : 1) dan disonikasi selama 10 menit. Sebanyak 0,5 ml sampel ditambahkan dengan 2,5 ml larutan Lowry I dan dibiarkan selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 0,25 ml larutan Lowry II dan dibiarkan selama 30 menit. Dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 700 nm (6). Hasil yang diperoleh dianalisis statistik dengan uji ANOVA ($P \leq 0,05$) dengan bantuan program SPSS 11.5.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan fase *mid log Klebsiella pneumoniae*

Isolat bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang ditumbuhkan dalam medium TSB menunjukkan kurva tumbuh memiliki dua fase pertumbuhan, yaitu fase logaritmik dan fase stasioner (Gambar 1). Fase logaritmik terjadi hingga menit ke-300, dan setelah itu memasuki fase stasioner. Pertumbuhan bakteri ini dapat dilihat dari perubahan nilai absorbansi yang didapat setelah dilakukan pengukuran pada menit yang berbeda. Kurva pertumbuhan bakteri terdiri dari suatu

periode awal yang tampaknya fase adaptasi, diikuti oleh suatu periode pertumbuhan yang cepat (fase log), kemudian fase stasioner dan akhirnya diikuti oleh suatu penurunan populasi sel hidup (4).



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan *K. pneumoniae*

Pada kurva ini, tidak terdapat fase adaptasi (*lag phase*). Hal ini terjadi karena sebelumnya bakteri yang digunakan telah ditumbuhkan pada medium yang sama, sehingga bakteri tersebut tidak memerlukan adaptasi terlebih dahulu pada medium pertumbuhannya. Oleh karena itu, pada kurva tumbuh tersebut fase adaptasinya tidak teramati. Adanya interaksi positif antar sel mikroba dan berlimpahnya nutrisi menyebabkan kecepatan pertumbuhan sel mikroba menjadi lebih tinggi (8).

Kurva tumbuh ini digunakan untuk menentukan fase mid log. Fase mid log merupakan suatu fase pertumbuhan dimana terjadi kecepatan pembelahan tertinggi. Fase ini diperlukan karena pada fase inilah iradiasi akan dilakukan terhadap sel bakteri. Fase ini terjadi pada menit ke-180, dengan kecepatan pertumbuhan berdasarkan nilai absorbansi adalah 0,0066/menit (Tabel 1). Perubahan nilai absorbansi yang tinggi menunjukkan pertumbuhan sel yang cepat pula. Fase mid log digunakan karena sel-sel bakteri dalam kondisi aktif melakukan metabolisme. Selain itu, pada fase tersebut terjadi pembelahan yang cepat sehingga dinding selnya tipis dan efek radiasi diharapkan akan maksimal (5). Sel yang paling sensitif adalah sel dengan tingkat proliferasi yang tinggi (aktif melakukan pembelahan) dan tingkat diferensiasi yang rendah, sedangkan sel yang

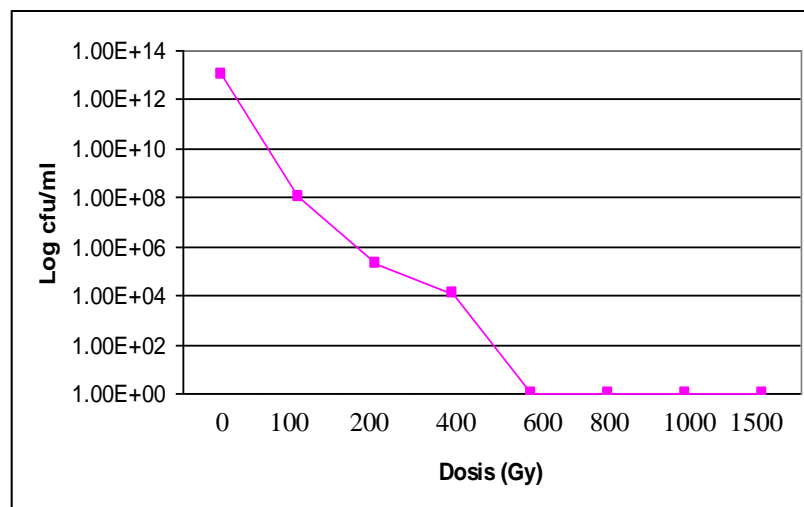
resisten atau tidak mudah rusak akibat pengaruh radiasi yaitu sel dengan tingkat diferensiasi yang tinggi dan tidak aktif melakukan pembelahan (9).

Tabel 1. Kecepatan perubahan nilai absorpsi/menit *K.pneumoniae*.

Waktu (menit)	Kecepatan perubahan nilai absorpsi/menit
0	0
30	0,0017
60	0,0034
120	0,0052
180	0,0066
240	0,0026
300	0,0017
360	0,0002

Viabilitas Sel *Klebsiella pneumoniae* Hasil Iradiasi Gamma

Hasil iradiasi gamma kultur bakteri menggambarkan bahwa terjadinya penurunan jumlah sel yang hidup sebanding dengan meningkatnya dosis (Gambar 2). Hilangnya kemampuan sel bakteri *K. pneumoniae* untuk bereplikasi terjadi pada kisaran dosis 600 Gy – 1.500 Gy. Hal ini dapat dilihat dari pertumbuhan sel bakteri *K. pneumoniae*, dimana pada dosis tersebut pertumbuhan selnya sudah tidak terlihat lagi. Ini disebabkan pada dosis tersebut, sel bakteri *K. pneumoniae* telah mengalami kerusakan yang cukup parah, sehingga sel tidak mampu bereplikasi.



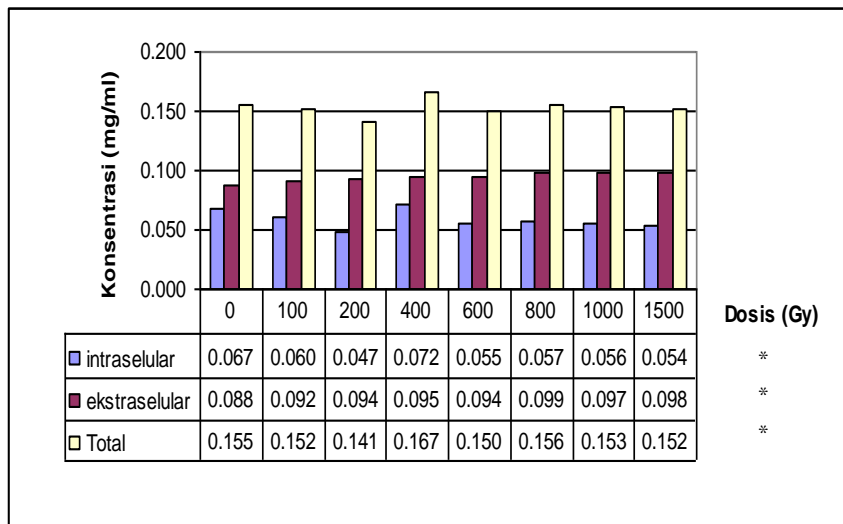
Gambar 2. Hubungan Dosis Iradiasi Gamma terhadap Jumlah Sel *K. pneumoniae*

Pada dosis 0 Gy (kontrol) sampai dengan dosis < 600 Gy, sel bakteri *K. pneumoniae* masih tetap memiliki viabilitas untuk hidup dan bereplikasi, walaupun terjadi penurunan jumlah sel. Hal tersebut menunjukkan bahwa efek iradiasi terhadap sel bakteri menyebabkan dua kemungkinan, yaitu sel bakteri akan tetap hidup atau sel bakteri akan mengalami kematian. Efek radiasi terhadap molekul-molekul penting, sel ataupun jaringan telah menimbulkan berbagai macam perubahan, gangguan ataupun kerusakan pada sistem biologi, seperti molekul DNA, molekul enzim, molekul protein, lemak dan karbohidrat (7).

Konsentrasi Protein Sel *Klebsiella pneumoniae* Hasil Iradiasi Gamma

Iradiasi dengan dosis berbeda pada kultur bakteri menunjukkan adanya perubahan konsentrasi protein sel bakteri *K. pneumoniae* yang tidak menentu atau acak (Gambar 3). Secara statistik, konsentrasi protein intraselular, ekstraselular dan total hasil iradiasi menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan ($p \leq 0,05$). Diduga perubahan kandungan protein tersebut menunjukkan pula adanya perubahan antigen protein pada sel bakteri *K.pneumoniae*.

Jumlah konsentrasi protein ekstraselular lebih besar jika dibandingkan dengan jumlah konsentrasi protein intraselular. Hal ini disebabkan dinding sel bakteri merupakan bagian terluar sel yang akan mengalami dampak dari radiasi paling tinggi, sehingga protein yang terdapat pada dinding sel akan mengalami perubahan komformasi sehingga sisi aktifnya terbuka. Dinding sel bakteri Gram negatif terdiri dari lapisan luar dan lapisan dalam. Pada lapisan luar terdapat LPS, protein, lipoprotein, dan molekul lain yang banyak mengandung gula, sedangkan lapisan dalam terdiri dari protein dan lipoprotein yang saling berikatan (10).



Gambar 3. Konsentrasi Protein *K. pneumoniae* Hasil Iradiasi (*nyata pada $p \leq 0,05$).

Hasil yang diperoleh sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa komposisi protein dalam serum akan bervariasi setelah iradiasi (11). Konsentrasi masing-masing protein dapat meningkat melalui sintesis atau melalui pelepasan selular yang nyata akibat kerusakan jaringan sel. Iradiasi dapat mempengaruhi molekul protein, terutama konfigurasinya. Konfigurasi 3 dimensi molekul protein menjadi terbuka dan siap melakukan suatu reaksi. Selain itu, penyebab lainnya adalah kerusakan DNA yang menyebabkan terganggunya sintesis protein (12).

Inaktivasi bakteri *K. pneumoniae* hasil iradiasi gamma memiliki prospek sebagai bahan vaksin, karena perubahan protein yang ditimbulkannya tidak signifikan yang diduga tidak mengubah antigen proteinnya. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh dosis radiasi gamma terhadap profil protein.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa dosis radiasi yang mampu menginaktivasi sel bakteri *K. pneumoniae* adalah antara 600 Gy – 1.500 Gy. Iradiasi dengan dosis berbeda pada kultur bakteri menunjukkan adanya perubahan konsentrasi protein sel bakteri *K. pneumoniae* yang tidak menentu atau acak dan adanya pengaruh yang signifikan dosis radiasi terhadap kandungan protein.

DAFTAR PUSTAKA

1. RYAN, KJ DAN RAY, CG. Sherris Medical Microbiology, 4th ed., McGraw Hill. (2004)
2. POSTGATE, J. Nitrogen fixation, 3rd ed.. Cambridge University Press (1998).
3. TUASIKAL, B. J., SUGORO, I., TJIPTOSUMIRAT, T., DAN LINA, M. Pengaruh Iradiasi Sinar Gamma pada Pertumbuhan *Streptococcus agalactiae* sebagai Bahan Vaksin Penyakit Mastitis pada Sapi Perah. *Jurnal sains dan Teknologi Nuklir Indonesia*. P3TIR-BATAN Jakarta (2003) 4: 137-149..
4. PELCHZAR, M, J. *Dasar-Dasar Mikrobiologi 2*. UI press. Jakarta. (2005).

-
5. TETRIANA, D DAN I. SUGORO. Aplikasi Teknik Nuklir dalam Bidang Vaksin. *Buletin ALARA*. PTKMR - Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN). Jakarta. (2007).
 6. HALL, E. J. *Radiobiology for The Radiobiologist*. Lippincott Williams and Walkin, Philadelphia. (1994).
 7. IKMALIA, DINARDI, N. LELANANINGTYAS, S. HERMANTO, DAN I. SUGORO. Profil Protein *Escherichia coli* Hasil Inaktivasi Iradiasi Gamma. Prosiding Seminar Nasional Biokimia, Departemen Kimia – Universitas Indonesia. (2008) h.54 - 60
 8. SUMARSIH, I. *Mikrobiologi Dasar*. Jurusan Ilmu Tanah. Fakultas Pertanian UPN "Veteran". Yogyakarta.(2003).
 9. ALATAS, Z. Efek Paparan Radiasi pada Manusia. Pusat Penelitian dan Pengembangan Keselamatan Radiasi dan Biomedika Nuklir. Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN). Jakarta. (2005).
 10. WINARNO, H. Lipid A-Pusat Aktif Endotoksin, Struktur Kimia dan Bioaktivitasnya. *Jurnal Cermin Dunia Kedokteran*. (1995) 103: 59-62..
 11. SYAIFUDIN, M. Indikator Biokimia Sel terhadap Radiasi Pengion. Pusat Penelitian dan Pengembangan Keselamatan Radiasi dan Biomedika Nuklir. Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN). Jakarta. (2005) 4: 125-131.
 12. DARUSSALAM, M. Radiasi dan Radioisotop : Prinsip Penggunaannya dalam Biologi, Kedokteran dan Pertanian. Tarsito. Bandung. (1996).

