

GAMBARAN PEMERIKSAAN SERUM ALANIN AMINOTRANSFERASE (ALT) PADA PASIEN DEMAM TIFOID MENGGUNAKAN FOTOMETER DAN SDS-PAGE

Satriani Syarif¹, Sugireng², Husnul Mufidah Gamal³

satrianisyarif@gmail.com¹, sugireng92@gmail.com², Husnulmufidahgamal@gmail.com³

STIKES Mandala Waluya Kendari

ABSTRAK

Demam tifoid merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella Typhi* yang dapat menyerang jaringan tubuh seperti hati. Kerusakan hati pada penderita demam tifoid dapat menyebabkan peningkatan kadar Alanin Aminotransferase (ALT). Peningkatan konsentrasi enzim tersebut dapat terdeteksi dalam darah. Semakin tinggi konsentrasi sampel maka pita protein yang terbentuk semakin tebal. Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui Gambaran pemeriksaan Alanin Aminotransferase (ALT) pada penderita demam tifoid menggunakan Fotometer dan SDS-PAGE. Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian deskriptif dan studi laboratorium. Populasi dalam penelitian ini adalah 23 pasien. Dengan metode pengambilan sampel yang digunakan adalah teknik Accidental Sampling dengan jumlah sampel sebanyak 19 pasien.

Hasil penelitian metode Fotometer didapatkan dari 19 sampel penderita demam tifoid sebagian besar kadar ALT pada penderita demam tifoid normal sebanyak 15 dengan persentase 79% dan ditemukan 4 penderita demam tifoid yang memiliki kadar ALT tidak normal dengan persentase 21%. Hasil SDS-PAGE memberikan separasi yang terbaik dengan terbentuknya pita protein, yang ditunjukkan pada fraksi ALT pita ke-4 dan ke-5 dengan berat molekul 53.45 dan 53.40 kDa. Jadi dapat disimpulkan konsentrasi ALT pada sampel plasma tifoid tidak berpengaruh terhadap daya deteksi dari SDS-PAGE.

Kata kunci : *Demam Tifoid, Fotometer, SDS-PAGE, ALT*

PENDAHULUAN

Penyakit pada saluran pernafasan dan pencernaan adalah penyakit menular yang paling sering terjadi di negara berkembang yang beriklim tropis dan subtropis. Salah satunya adalah penyakit demam tifoid pada usus halus yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi*. Pada tahun 2009 angka insidensi penyakit ini di dunia sekitar 17 juta pertahun, dan mengalami peningkatan pada tahun 2014

sekitar 21 juta kasus demam tifoid (WHO, 2014).

Di Indonesia penyakit demam tifoid merupakan penyakit yang masih endemik. Demam tifoid menempati urutan ke-2 dari 10 penyakit terbanyak di Indonesia dengan jumlah kasus 81.116 (Depkes RI, 2009). Pada tahun 2010 mengalami penurunan dengan jumlah kasus demam tifoid 41.081 (Profil Kesehatan Indonesia, 2010).

Pada tahun 2014 jumlah kasus demam tifoid di Sulawesi Tenggara sebesar

3.828 kasus dan mengalami penurunan pada tahun 2015 dengan 1.867 kasus. Walaupun angka prevalensi demam tifoid pada tahun 2015 menurun, penyakit ini masuk dalam 10 besar penyakit infeksi pada dua tahun terakhir (Profil Dinkes Sultra, 2015). Pada tahun 2016 dilingkup kerja Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Kota Kendari, kasus demam tifoid menempati urutan ke-7 dari 10 penyakit terbanyak dengan jumlah 199 kasus. Pada tahun 2017 mengalami peningkatan sebanyak 234 kasus demam tifoid dan pada tahun 2018 sebanyak 223 kasus (Profil RSUD Kota Kendari, 2017).

Tifoid adalah penyakit sistemik akut yang disebabkan infeksi bakteri *Salmonella typhi* (Jawetz, 2014). Bakteri *Salmonella typhi* menghasilkan endotoksin yang merupakan kompleks lipopolisakarida dan dianggap berperan penting pada patogenesis demam tifoid. Endotoksin bersifat pirogenik serta memperbesar reaksi peradangan dimana bakteri *Salmonella typhi* berkembang biak, maka jika masuk ke dalam tubuh dapat menyebabkan kondisi tubuh menjadi lemah sehingga memudahkan bakteri *Salmonella typhi* menyerang jaringan-jaringan tubuh yang lain termasuk hati (Depkes RI, 2009).

Keberadaan ALT dalam darah berhubungan dengan kerusakan jaringan hati. Peningkatan kadar ALT dapat dijadikan screening pada penderita berbagai

penyakit hati misalnya pada penderita demam tifoid (Jain, 2016). Pengukuran konsentrasi enzim dalam darah dengan uji ALT dapat memberikan informasi penting mengenai tingkat gangguan fungsi hati. Aktivitas ALT di dalam hati dapat di deteksi meskipun dalam jumlah sangat kecil. Enzim ALT yang terkandung dalam serum maupun supernatan hasil pengendapan ditentukan konsentrasinya untuk mengetahui jumlah volume yang digunakan untuk mengetahui efektivitas pengendapan dan jumlah volume sampel yang digunakan dalam SDS-PAGE. Untuk menentukan suatu konsentrasi atau kadar ALT dalam sampel dapat diukur menggunakan alat Fotometer dengan metode kinetik enzimatis. Kadar normal ALT pada pria 0-41 U/L dan wanita 0-35 U/L. Selain mengukur kadar ALT ada salah satu metode yang sering digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekul yaitu dengan menggunakan teknik elektroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis*). Semakin tinggi konsentrasi sampel maka pita yang terbentuk akan semakin tebal (Padila, 2013). Berat molekul ALT dikatakan berhasil di isolasi jika berat molekul ALT diperoleh dengan berat 54 kiloDalton (kDa) (Yang, 2002). Berdasarkan uraian di atas peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang "Gambaran

Pemeriksaan *Alanin Aminotransferase* (ALT) pada penderita demam tifoid menggunakan Fotometer dan SDS-PAGE"

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Rumah Sakit Umum Daerah kota Kendari dan Laboratorium D-IV Teknologi Laboratorium Medis STIKES Mandala Waluya Kendari pada bulan April sampai dengan bulan Mei 2019.

Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu spuit 3 cc, Tourniquet (One Med), ERBA MULTI XL-300, Mikropipet, Cup Sampel, Tips, Sentrifuge, Elektroforesis SDS-PAGE, Shaker/Vortex, Gloves (Sarung tangan), Tabung 1.5 mL, *Heat block/ Water Bath*, PowerPac/ Power Supply.

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan yaitu Darah (Serum/plasma) pasien demam tifoid rawat inap di RSUD Kota kendari, Tris pH 7,5, L-Alanin, LDH (microbial), 2-Oxoglutarat, NADH, Running Buffer Tris-Glycine- SDS, *Commassie Brilliant Blue Staining Solution*, *Coomassie Destaining Solution*, Gel Agarosa, TEMED (*Tetra Etil Metil Ethilene Diamine*), APS (*Ammonium Phosphate*)10%, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10%, Aquades Steril (ddH₂O), TrisHCL 1M pH 6.8, Acrylamide 30%,

Bromophenol Blue 1%, β Mercaptoetanol, Gliserol 50%, Marker Protein, Laemmli sampel buffer, Membrane PVDF (*Poliviniliden difluorida*), Ammonium Sulfate (APS) 50%, Etanol Absolut dingin.

METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang digunakan yaitu metode deskriptif dan studi laboratorium, diharapkan penelitian ini dapat memberikan Gambaran protein ALT pada pasien demam tifoid.

Bahan utama dari penelitian ini adalah Plasma pasien positif tifoid yang diperoleh dari RSUD Kota Kendari. Sampel tersebut terlebih dahulu dipisahkan menggunakan Sentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm Selama 5-10 menit. Plasma dipisahkan dan dipindahkan ke cup sampel untuk selanjutnya dilakukan pemeriksaan (Rumah Sakit Abunawas, 2017).

Untuk menentukan konsentrasi protein yaitu menggunakan metode Fotometer dengan alat ERBA MULTI XL-300. Analisis Protein ALT dilakukan dengan teknik SDS-PAGE dengan komposisi separating gel 12% dan Stacking gel 4%.

Pemurnian Sampel Plasma

Sampel plasma yang telah dikumpulkan, dimasukkan ke dalam tabung 1.5 mL sebanyak 100 μ L. Ditambahkan Ammonium Sulfate (APS) 50% sebanyak 100 μ L, lalu di vortex. Kemudian di

sentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Dibuang supernatan, pelet ditambahkan Etanol absolute dingin dengan perbandingan 1:1. Di sentrifuge kembali dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit (dibuang supernatan). Dikering-anginkan pellet, hingga bau etanol hilang. Ditambahkan buffer Tris HCL pH 6.8 dengan perbandingan 1:1. Disimpan di freezer -20°C (jika tidak digunakan).

Pemeriksaan dengan SDS-PAGE

Persiapan sampel

Diukur konsentrasi plasma dengan menggunakan metode Bradford atau Lowry. Setelah diperoleh konsentrasi yang diinginkan maka tahap berikutnya adalah dengan menambahkan sampel buffer yaitu laemmli sampel buffer yang sudah ditambahkan (50 µL β- mercaptoetanol + 950 µL laemmli sampel buffer) sebanyak 1:1. Selanjutnya, protein yang sudah ditambahkan laemmli sampel buffer dipanaskan dalam *water bath* atau *heat block* (>70°C) selama 3-5 menit untuk mendenaturasi protein dan mempercepat reaksi pada sampel yang dianalisis. Setelah dingin, disimpan pada suhu 20°C bila sampel tidak langsung dipakai.

Pembuatan Gel SDS-PAGE

Disiapkan alat yang akan digunakan untuk mencetak gel seperti *spacer plate*,

short plate, dan *casting gel system*. Dirakit alat untuk membuat gel, dengan memasukkan *spacer* dan *short plate* pada casting gel secara merata untuk menghindari kebocoran. Pertama dibuat larutan gel pemisah (*separating gel*) 12% dengan komposisi sebagai berikut: Dimasukkan 6 mL stock 30% akrilamide/Bis dalam tabung/ botol 50 mL, Ditambahkan 3,75 mL 1,5 M tris pH 8.8, shaker perlahan-lahan. Ditambahkan aquabides 5,03 mL, shaker perlahan-lahan kembali. Ditambahkan 150 µL 10% SDS (sodium dodesil sulfat), shaker kembali. Dimasukkan 75 µL 10% APS (Amonium Persulfat). Ditambahkan TEMED 7,5 µL, shaker kembali. Segera dituangkan kedalam cetakan, ditunggu hingga ± 30 menit.

Untuk *stacking gel* 4%, dengan komposisi sebagai berikut: Dimasukkan 0,99 mL 30% Akrilamide/Bis dalam tabung. Ditambahkan 1,89 mL 0,5 M tris pH 6,8, shaker perlahan-lahan. Ditambahkan aquabides 4,5 mL, shaker perlahan-lahan kembali. Ditambahkan 75 µL 10% SDS (sodium dodesil sulfat), shaker kembali. Dimasukkan 40 µL 10 % APS (Amonium sulfat). Ditambahkan TEMED 7,5 µL, shaker kembali. Segera dituangkan diatas *separating gel*. Dipasang comb, dan ditunggu hingga gel memadat. Setelah gel membeku, gel siap digunakan untuk proses SDS-PAGE.

Running SDS-PAGE

Dimasukkan gel ke dalam chamber yang terdapat pada mini protein tetra cell, ditambahkan running buffer kemudian comb dibuka. Sampel protein dan marker dimasukkan ke dalam sumur/ well. Setelah marker protein dan sampel protein dimasukkan, ditutup chamber mini protein tetra cell. Dihubungkan kabel mini protein tetra cell dengan power supply. Di running gel pada 100-120 V , selama 60 - 90 menit. Setelah selesai, dimatikan power supply. Lalu diangkat kaca yang mengandung gel kemudian dikeluarkan gel menggunakan pembuka gel yang sudah disediakan. Untuk verifikasi hasil SDS-PAGE dapat dilakukan dengan proses pewarnaan dengan *coomasie blue* atau menggunakan *coomassie Bio-Safe*. Setelah proses pewarnaan , dilakukan langkah destaining / pencucian gel . Untuk penggunaan *coomasie blue* digunakan larutan destaining dengan komposisi Methanol 100 mL, Asam asetat glasial 100 mL, Aquades 100 mL Untuk penggunaan *coomasie bio safe* bisa menggunakan aquades. Setelah itu divisualisasi bisa di

lakukan langsung tanpa menggunakan imaging system (Fatchiyah, 2011).

Hasil elektroforesis yang berupa *band* dapat dilakukan perhitungan Rf (*Retardation Factor*) dari masing-masing *band* dengan rumus $Rf = \frac{\text{jarak pergerakan protein}}{\text{jarak pergerakan warna}}$ dari tempat awal dibagi jarak pergerakan warna dari tempat awal.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengukuran Konsentrasi Protein ALT

Pengukuran kadar ALT digunakan untuk menentukan konsentrasi sampel yang diperlukan pada proses *running SDS-PAGE*. Hasil pemeriksaan ALT pada penderita demam tifoid di Rumah Sakit Umum Daerah Kota Kendari dari 19 penderita demam tifoid laki-laki yang memiliki kadar normal ALT sebanyak 4 orang dengan persentase 27% sedangkan kadar ALT tinggi sebanyak 1 orang dengan persentase 25%. Pasien perempuan memiliki kadar normal ALT sebanyak 11 orang dengan persentase 73% sedangkan kadar ALT tinggi sebanyak 3 orang dengan persentase 75%. Hasil tersebut dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5 Distribusi Frekuensi Hasil Pemeriksaan ALT Pada Penderita Demam Tifoid Yang Rawat Inap Di RSUD Kota Kendari

Jenis Kelamin	Normal	Persentase (%)	Tidak Normal	Persentase (%)	Nilai Rujukan
Laki – laki	4	27	1	25	0-45 U/L
Perempuan	11	73	3	75	0-34 U/L
Total	15	100	4	100	

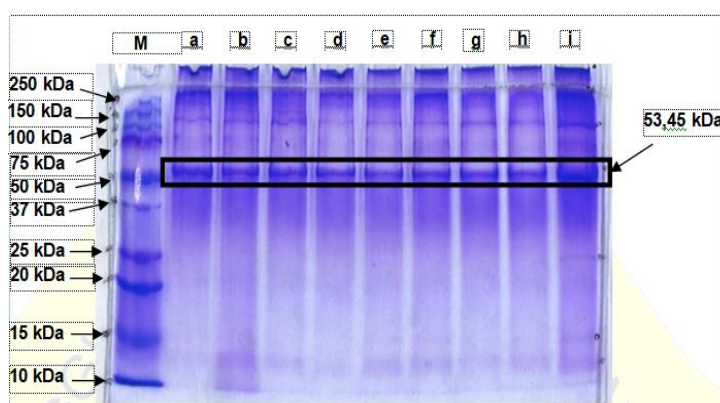
Sumber: Data Primer 2019

SDS-PAGE Protein Plasma

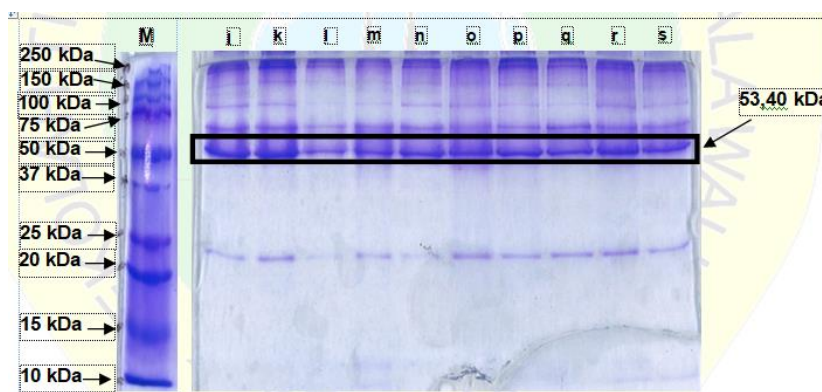
SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) merupakan salah satu metode untuk menganalisis protein dengan memisahkan pita-pita protein yang ada dalam sampel berdasarkan bobot molekulnya (Arif, 2012). Sebelum dilakukan SDS-PAGE, protein terlebih dahulu diubah dari struktur globular menjadi struktur yang linier dengan proses denaturasi. Prinsip dasar SDS-

PAGE ini adalah denaturasi protein oleh SDS yang dilanjutkan dengan pemisahan molekul berdasarkan bobot molekulnya dengan metode elektroforesis yang menggunakan gel, dalam hal ini yang digunakan adalah poliakrilamid (Rahmawati, 2009).

Analisis dengan SDS-PAGE ini, menggunakan gel poliakrilamid yang terdiri dari separating gel 12% dan Stacking gel 4%.



Gambar 6. Hasil SDS-PAGE protein plasma penderita demam tifoid (a)
Keterangan : M = Marker, Lajur a - i = Protein ALT



Gambar 7. Hasil SDS-PAGE protein plasma penderita demam tifoid (b)
Keterangan : M = Marker, Lajur i – s = Protein ALT

Perbedaan dapat dilihat dari *Separating gel* memiliki konsentrasi 12% konsentrasi gel poliakrilamid yaitu pada sedangkan *Stacking gel* memiliki

konsentrasi 4%. Semakin kecil berat molekul protein yang dipisahkan, maka semakin tinggi konsentrasi gel poliakrilamid yang digunakan agar pori-pori gel yang terbentuk semakin rapat. Pada saat arus listrik diberikan, molekul bermigrasi melalui gel poliakrilamid dari kutub negatif (katoda) menuju kutub positif (anoda).

Enzim yang memiliki berat molekul kecil akan bermigrasi lebih cepat dibandingkan yang memiliki berat molekul besar karena berat molekul yang lebih besar akan tertahan sehingga pergerakannya lambat. Hasil SDS-PAGE dapat dilihat pada gambar 6 dan 7.

Karakterisasi protein plasma pada sampel tifoid ini didasarkan atas bobot molekul relatifnya yang dibandingkan dengan *marker* protein. Berat molekul protein dapat diukur dengan menggunakan *marker* protein yang telah diketahui berat molekulnya, pada penelitian ini *marker* protein yang digunakan yaitu di kisaran 10-250 kDa (Bio Rad). Perhitungan dilakukan dengan mengukur total jarak migrasi dari *Stacking* ke *Separating* gel pada *marker*, dilanjutkan dengan mengukur jarak migrasi dari *stacking gel* ke masing-masing pita protein yang terbentuk. Berat molekul pada tiap sampel dihitung menggunakan cara perhitungan ukuran molekul yang didasarkan pada rumus regresi *marker* dan

penghitungan mobilitas relatif (Bintang, 2010).

Berdasarkan hasil SDS-PAGE yang dilakukan pada 19 sampel protein plasma penderita demam tifoid diperoleh pada Gambar 6 dan Gambar 7, kedua gambar tersebut menunjukkan bahwa pemisahan dengan SDS-PAGE memberikan penampilan separasi yang terbaik. Hasil SDS-PAGE menunjukkan pita protein dari *marker* protein terlihat dengan baik, dimana dari semua pita yang terbentuk memiliki intensitas ketebalan yang berbeda-beda. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi protein plasma masing-masing fraksi berbeda-beda (Sinlae, 2014). Hasil penelitian tersebut sesuai dengan pernyataan Albert (2002) yang menyatakan bahwa ketebalan pita protein menunjukkan konsentrasi protein tersebut. Pita protein dengan intensitas yang lebih tebal memiliki konsentrasi yang lebih tinggi.

Hasil penelitian diperoleh dari 19 sampel plasma pasien tifoid menunjukkan 100% ditemukan pita protein ALT. Fraksi ALT ditunjukkan oleh pita ke-4 Gambar 6 dan pita ke-5 Gambar 7 dari 19 sampel, dengan berat molekul 53.45 dan 53.40 kDa. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Glinghammar, dkk (2009) dengan menggunakan spesimen jaringan dan plasma diperoleh ukuran berat molekul 54 kDa. Disamping penelitian Glinghammar,

dkk (2009) Nilai tersebut sesuai dengan pernyataan Yang (2002) bahwa berat molekul ALT dikatakan berhasil di isolasi jika berat molekul ALT diperoleh dengan berat 54 kDa.

KESIMPULAN

Pengukuran konsentrasi ALT dari 19 penderita demam tifoid sebagian besar kadar ALT pada penderita demam tifoid normal sebanyak 15 dengan persentase 79% dan ditemukan 4 penderita demam tifoid yang memiliki kadar ALT tidak normal dengan persentase 21%. Hasil SDS-PAGE pada sampel plasma menunjukkan bahwa pemisahan dengan SDS-PAGE memberikan penampilan separasi yang terbaik dengan terbentuknya pita protein dari marker

protein yang digunakan dimana fraksi ALT ditunjukkan oleh pita ke- 4 dan pita ke-5 dari 19 sampel dengan berat molekul 53.45 dan 53.40 kDa. Dapat disimpulkan konsentrasi ALT pada sampel plasma tifoid tidak berpengaruh terhadap daya deteksi dari SDS-PAGE.

Disarankan bagi peneliti selanjutnya untuk melakukan penelitian dengan menggunakan sampel protein lainnya dengan mengembangkan pemeriksaan yang berbasis genetika. Patut dipertimbangkan pemilihan penderita demam tifoid positif *Salmonella typhi* dengan titer widal yang tinggi (1/320 atau 1/640) mungkin dapat dipakai untuk mendapat hasil yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of The Cell*. Edisi ke-4. Garland Science: New York.
- Arif M. 2012. Profil SDS-PAGE Outer Membrane Protein *Porphyromonas gingivalis* (Penelitian Observasional Analitik in vitro). *Skripsi*. Program Sarjana. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Jember. Jember.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Erlangga. Jakarta.
- BioRad Laboratories. 2011. *A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection*. Life Science Group. US/EG.
- Depkes RI. 2009. Demam Tifoid. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kesehatan Masyarakat*, 2 (6) *Tempo*, Mei 2017:1-9.
- Fatchiyah, E.L., Arumingtyas S., Widyarti, & Rahayu, S. 2011. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. Jakarta
- Jain, A., Soni, M., Deb, L., Jain, A., Rout, S.P., Gupta, V.B., dan Krishna, K.L. 2016. *Antioxidant and Hepatoprotective Activity of Ethanolic and Aqueous Extracts of Momordica Dioica Roxb. Leaves. J. Ethnopharmacol.* 115. 61 – 66.
- Jawetz, M dan Adelberg's. 2014. *Mikrobiologi kedokteran*. Salemba Medika. Jakarta.
- Padila. 2013. *Asuhan Keperawatan Penyakit Dalam*. Nuha Medika. Yogyakarta.
- Profil Kesehatan Indonesia. 2010. Demam Tifoid. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kesehatan Masyarakat* 2 (6). *Tempo*, Mei 2017.

- Profil RSUD Kota Kendari. 2017. *Data Kasus Penderita Demam Tifoid Rawat Inap di Rumah Sakit Umum Daerah KotaKendari*. Kendari.2017.
- Rahmawati D. 2009. Pengaruh Vaksinasi Kultur *Klebsiella pneumoniae* Hasil Inaktivasi Pemanasan dan Iradiasi Sinar Gamma terhadap Kondisi Fisik serta Profil Protein Serum Darah Mencit. *Skripsi*. Program Sarjana. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Sinlae RN. 2014. Karakteristik Protein dan Asam Amino Daging Sapi Bali dan Wagyu pada Penyimpanan Suhu Dingin 4°C. *Tesis*. Program Pascasarjana. Universitas Udayana. Denpasar.
- WHO (World Health Organization). 2014. *Background Doc: The Diagnosis, Treatment and Prevention of Typhoid Fever* Geneva, Swizerland.
- Yang RZ, et al. 2002. *cDNA Cloning Genomic Structure, Chromosomal Mapping, and Functional Expression of a Novel Human Alanine Aminotransferase*. *Genomic*. 79 (3): 445-50