

**Protein Hemagglutinin 35,2 kDa Pili *Proteus mirabilis* P355 sebagai Adhesin pada Epitel Vesika Urinaria Kelinci**  
(*The 35,2 kDa Hemagglutinin Protein of Pili's Proteus mirabilis P355 as Adhesin on Rabbit's Blader Epitelial*)

Diana Chusna Mufida dan Enny Suswati  
Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Jember

**ABSTRACT**

*Urinary tract infection represent one of nosocomial infection in hospital. One of agent nosocomial urinary tract infection is Proteus mirabilis bacteria and common occur on patient with urinary catheter. Urinary tract infection with caused by P. mirabilis was persistent, very difficult to eradicated. Further more is caused some complication such as cystitis, acut and cronic pyelonephritis, kidney bladder stone, bacterimiae and sepsis. This bacteriae has same virulence factors. Fimbriae is one of it. In the adhesion test utilization of protein hemagglutinin pili 35.2 kDa resulted in the electroelusion which salluted in vesica urinaria epitelial by dose 400µl, 200µl, 100µl, 50µl, 25µl, 12,5µl and 0µl as control. Form adhesion test on vesica urinary epitelial that salluted with 35.2kDa protein pili we faund that the higher dose of protein can decrease bacteriae concentration at vesica urinary epitelial. This result was significant with  $r= 0.93$  and  $p$  value = 0.005. This conclusion of this study is 35.2 kDa molecular weight protein pili of P. mirabilis P355 were adhesion protein.*

*Keywords : hemagglutinin, pili, Proteus mirabilis, adhesin*

**PENDAHULUAN**

Infeksi saluran kemih (ISK) merupakan penyakit yang sering didiagnosa pada pasien yang pulang dari rumah sakit dan juga merupakan infeksi nosokomial yang sering terjadi. Menurut National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS), jumlah kasus kesehatan sekitar 35% dari seluruh infeksi nosokomial (Gales *et al.*, 2000). Tingginya ISK yang disebabkan oleh infeksi nosokomial berhubungan dengan pemakaian *indwelling catheter*. Pemakaian kateter ini dapat menyebabkan bakteriuria yang asimtomatik dan selanjutnya dapat menyebabkan bakteremia lebih dari 5%. Menurut Platt (*dalam* Gales *et al.*, 2000), infeksi saluran kemih yang didapat selama pemakaian kateter dapat meningkatkan kematian pasien 3 kali lebih besar, serta memperlama pasien tinggal di rumah sakit dan memperbesar biaya pengobatan.

Penyebab ISK yang didapat di rumah sakit ini sebagian besar adalah *Eschericia coli*, kemudian diikuti oleh *Proteus mirabilis*, *Kleibsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* dan *Enterococcus*. Tetapi pada pasien yang menggunakan kateter *P. mirabilis* merupakan penyebab tersering dari ISK (Gales *et al.*, 2000). Studi yang dilakukan oleh Daifuku dan Stamm (1986) menunjukkan bahwa pada pasien yang memakai kateter adhesi *P. mirabilis* ke sel vesika urinaria mengalami peningkatan. *P. mirabilis* termasuk dalam tribe *Proteae*, famili

*Enterobacteriaceae*. Bakteri ini sering ditemukan di tanah dan air serta merupakan flora normal pada saluran pencernaan manusia dan mamalia (Wassif *et al.*, 1995). Bakteri ini memiliki morfologi batang, Gram negatif, mempunyai kemampuan *swarming* pada medium agar (Pfaller *et al.*, 2000). *P. mirabilis* merupakan salah satu penyebab terpenting ISK, karena infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini bersifat persisten, sulit diterapi dan dapat berakibat fatal. Bakteri ini dapat menimbulkan komplikasi antara lain pyelonephritis akut dan kronik, cystitis, serta pembentukan batu di ginjal dan vesica urinaria, bakteremia dan sepsis (Perepelov *et al.*, 1999; Wassif *et al.*, 1995).

*P. mirabilis* mempunyai beberapa faktor virulensi, yaitu fimbria atau pili, hemolisin, flagella, immunoglobulin A protease, deaminase serta urease (Wassif *et al.*, 1995 ; Lie, 2001). Fimbria dan flagella berperan dalam pelekatan dan kolonisasi pada epitel saluran kemih (Lie *et al.*, 1999 ). *P. mirabilis* mempunyai beberapa tipe pili yang berperan dalam menyebabkan infeksi pada saluran kemih yaitu *mannosa resistant Proteus like fimbriae* (MR/P), *Proteus mirabilis fimbriae* (PMF), *mannose resistant Kleibsiella like fimbriae* (MR/K), *uroepithelial cell adhesion* (UCA), dan *ambient- temperature fimbriae* (TF) (Mobley *et al.*, 1994).

Untuk dapat menyebabkan infeksi, mikroorganisme melibatkan beberapa tahap,

yaitu dimulai dengan pelekatan/ adhesi pada permukaan sel inang, dan selanjutnya dapat terjadi invasi dan menyebar secara lokal atau sistemik. Kemampuan bakteri untuk melekat pada sel inang diperantai oleh molekul adhesi yang terdapat pada bakteri dan reseptor yang terdapat pada sel inang. Molekul adhesi pada bakteri bisa terletak di pili atau di *outer membrane protein* (OMP). Pelekatan bakteri ke sel inang ini bersifat spesifik. Spesifitas ini berhubungan dengan ketersediaan reseptor yang sesuai dan hal ini akan menentukan bagian tubuh yang akan diinfeksi oleh bakteri (Salyers and Whitt, 1994).

Karakteristik molekul adhesi diketahui melalui adanya kemampuan untuk menggumpalkan sel darah merah. Protein hemaglutinin menggumpalkan sel darah merah digolongkan menjadi dua yaitu *manosa sensitive hemaglutinin* (MSHA) dan *manosa resisten hemaglutinin* (MRHA). Sperandio *et al.*, 1995 berhasil mengisolasi molekul hemaglutinin pada *outer membrane protein Vibrio cholera* 01 classical (OMP) yang mempunyai berat molekul 38 kDa dan merupakan molekul adhesi. Protein hemaglutinin *Vibrio cholerae* 01 M094V telah diisolasi oleh Sumarno (2000), protein tersebut mempunyai berat molekul 50,3 kDa, 37,8 kDa, 35,9 kDa dan 21,3 kDa berasal dari pili dan dari *outer membrane protein* mempunyai berat molekul 37,8 kDa dan protein hemaglutinin tersebut juga merupakan protein adhesin. Penelitian ini bertujuan membuktikan protein hemaglutinin 35,2kDa *P. mirabilis* merupakan protein adhesin.

#### METODE

Bakteri yang akan digunakan adalah *P. mirabilis* galur lokal yang berasal dari urin pasien bakteriuria. Metode yang digunakan menurut petunjuk Ehara *et al.*, 1986, yaitu media TCG yang memperkaya pertumbuhan pili *P. mirabilis*. Media ini mengandung 0,02% thioproline, 0,3% NaHCO<sub>3</sub>, 0,15 bacto trypton, 0,2% yeast extract, 0,5% NaCl, 2% bacto agar dan 1mM EGTA. Media agar dibuat dalam botol kapasitas 250 ml secara miring sebanyak 50 ml agar. *P. mirabilis* yang dipilih ditanam pada media *Brain Heart Infusion* (BHI) yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Kemudian suspensi bakteri sebanyak 10 ml dimasukkan dalam setiap botol yang mengandung media TCG. Selanjutnya

dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 2 × 24 jam.

Pili dipanen dari 50 botol biakan bakteri. Hasil koleksi bakteri ditambahkan *tri kloroacetit acid* (TCA) sampai konsentrasi 3%. Setelah dikocok rata diletakkan pada suhu kamar selama 1 jam dan tiap 15 menit di kocok. Selanjutnya disentrifugasi 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet diambil dan diresuspensi dengan cairan PBS pH 7,4 dengan perbandingan 1: 10. Bakteri dicukur dengan menggunakan alat *omnimixer* pada suhu 4°C. Bakteri dicukur dengan kecepatan penuh selama 1 menit, diulang sampai 5 kali dengan masa istirahat 1 menit. Hasilnya dilakukan sentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 12000 rpm suhu 4°C. Pili yang terletak dibagian atas diambil. Endapan disuspensi dengan larutan dan cara yang sama seperti di atas dan dikumpulkan dengan cara mencukur ulang sampai beberapa kali, sampai dihasilkan supernatan yang menunjukkan tes aglutinasi negatif.

Monitoring berat molekul dikerjakan menggunakan SDS-PAGE (Smeds *et al.*, 2001). Sampel protein dipanaskan 100°C selama 5 menit dalam larutan penyangga yang mengandung 5mM Tris HCl pH 6,8, 2-mercapto ethanol 5%, w/v sodium dodecyl sulfat 2,5%, v/v gliserol 10% dengan warna pelacak Bromophenol Blue. Dipilih mini slab gel 12,5% dengan tracking gel 4%. Voltase yang digunakan 125 mV. Bahan yang digunakan adalah coomasive brilliant blue dan molekul standart *sigma low range marker*.

Selanjutnya protein hasil SDS-PAGE dimurnikan dengan cara memotong gel lurus pada bobot molekul yang diinginkan dan potongan pita tersebut dikumpulkan dan dimasukkan dalam membrane dialisa memakai cairan penyangga elektroforesis, *running buffer*. Selanjutnya dilakukan elektroelusi menggunakan elektroforesis frontal apparatus aliran 125 mV selama 25 menit. Hasil elektroforesis dilakukan dialisa dengan cairan penyangga PBS pH 7,4 selama 2 × 24 jam @ 1 liter dan diganti 2 kali. Cairan dialisat tersebut merupakan protein yang siap untuk diuji adhesi.

Metode uji adhesi merujuk pada Sumarno (2000). Tahap pertama dilakukan preparasi biakan bakteri yang diperoleh dari kultur *P. mirabilis*. Pelet yang diperoleh diencerkan dengan PBS sampai OD 1. Pengenceran sampel protein pili hasil elektroelusi dengan

pengenceran  $\frac{1}{2}$  kali secara seri pada endpod, dengan memakai larutan pengencer dipakai PBS steril pH 7,4 ad 500  $\mu$ l dan sebagai control adalah pada dosis protein pili 0. Kemudian dimasukkan hasil pengenceran protein pili dalam endpod yang mengandung epitel vesika urinaria. Setelah itu dilakukan inkubasi pada *water bath* dengan suhu 37°C, seker 80 kali permenit selama 30 menit. Kemudian disentrifus 1000 rpm 5 menit, kemudian peletnya ditambah bakteri 200  $\mu$ l. Dilakukan inkubasi pada *water bath* dengan suhu 37°C, selama 30 menit dengan goyangan 80 kali permenit. Selanjutnya disentrifugasi 1000 rpm 5 menit dan pellet dicuci dengan PBS 2 kali. Pelet yang telah dicuci ditambah PBS 50  $\mu$ l. Selanjutnya masing-masing diambil 20  $\mu$ l untuk hapusan pada obyek glass. Preparat siap dilakukan pengecatan Gram dan perhitungan indeks adhesi dilakukan di bawah mikroskop perbesaran 1000  $\times$  (emersi).

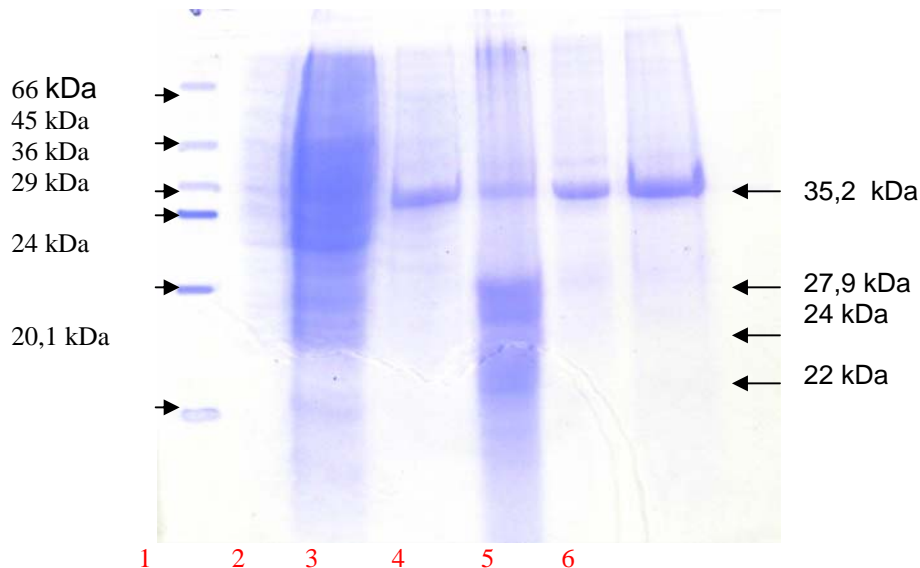
#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil protein pili *P. mirabilis* tampak seperti pada Gambar 1. Pada penelitian sebelumnya

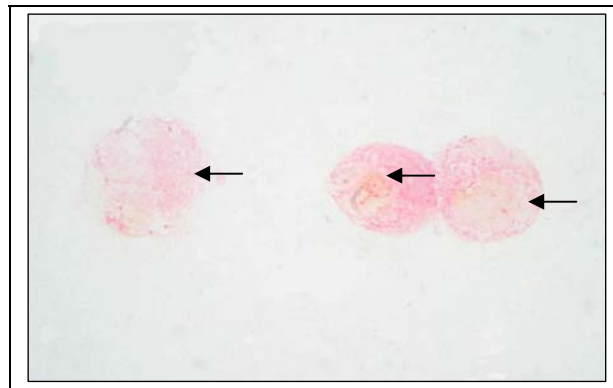
telah berhasil diidentifikasi protein dengan berat molekul 35,2 kDa merupakan protein hemagglutinin dengan titer tertinggi, yaitu 1/512.

Uji hambat adhesi *P. mirabilis* P355 dilakukan secara invitro pada epitel vesika urinaria kelinci, menggunakan protein hemagglutinin pili dengan berat molekul 35,2 kDa. Protein hemagglutinin dengan berat molekul 35,2 kDa diberikan dengan dosis bertingkat, mulai dari 12,5  $\mu$ l sampai 400  $\mu$ l dan dosis 0  $\mu$ l sebagai kontrol. Epitel vesika urinaria kelinci diisolasi dengan menggunakan metode Weiser (*dalam* Nagayama *et al.*, 1995). Gambaran epitel vesika urinaria yang telah dilakukan pengecatan Gram adalah seperti pada Gambar 2.

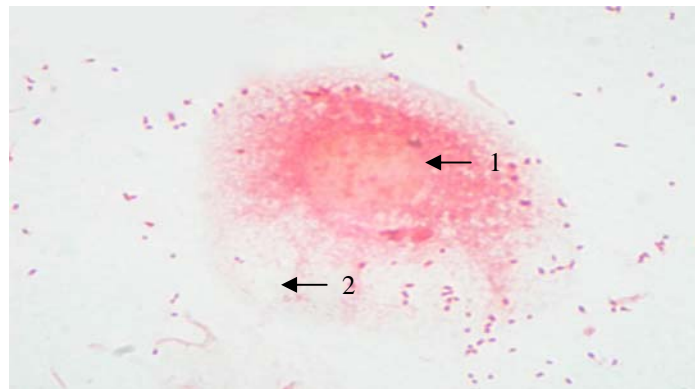
Hasil uji hambat adhesi *P. mirabilis* P355 pada sel epitel vesika urinaria, dilakukan dimulai dengan dosis protein hemagglutinin 0  $\mu$ l sebagai kontrol, tampak pada Gambar 3. dan dilanjutkan dengan dosis terbesar protein hemagglutinin pili terbesar sampai dosis terkecil tampak pada Gambar 4.



Gambar 1. Hasil SDS-PAGE whole cell dan potongan pili *P. mirabilis* P355.  
Sumur 1 : protein perunut; Sumur 2 :whole cell; Sumur 3:  
potongan pili 1; Sumur 4: potongan pili 2; Sumur 5: potongan pili  
3; Sumur 6: potongan pili 4



Gambar 2. Epitel vesika urinaria kelinci, dengan pengecatan Gram direkam dengan fotomikroskop olympus dengan perbesaran 1000× (emersi).



Gambar 3. Uji hambat adhesi *P. mirabilis* P355 vesika urinaria kelinci dengan dosis protein hemaglutinin pili 0µl. Direkam menggunakan fotomikroskop Olympus dengan perbesaran 1000× (emersi). 1. epitel vesika urinaria; 2. *P. mirabilis*

Keterlibatan protein hemaglutinin dengan berat molekul 35,2 kDa dalam menghambat perlekatan *P. mirabilis* terlihat pada Gambar 4. Tidak adanya pelekatan bakteri pada sel vesika urinaria setelah diinkubasi dengan protein hemaglutinin menunjukkan bahwa protein tersebut dapat menghambat bakteri untuk melakukan pelekatan.

Pada kontrol uji hambat adhesi didapatkan hasil seperti pada Gambar 3. Pada Gambar tersebut tampak adanya bakteri yang menempel pada sel epitel vesika urinaria dan ada beberapa bakteri yang sudah masuk ke sel epitel. Sedangkan pada hambat adhesi dengan menggunakan protein hemaglutinin dengan berat molekul 35,2 kDa, pada dosis terbesar sampai dosis terkecil tampak pada Gambar 4. Pada gambar 4(a) tampak tidak ada bakteri yang melekat pada sel epitel, hal ini disebabkan karena sebagian besar reseptor *P. mirabilis* telah dijenuhi oleh protein hemaglutinin pili,

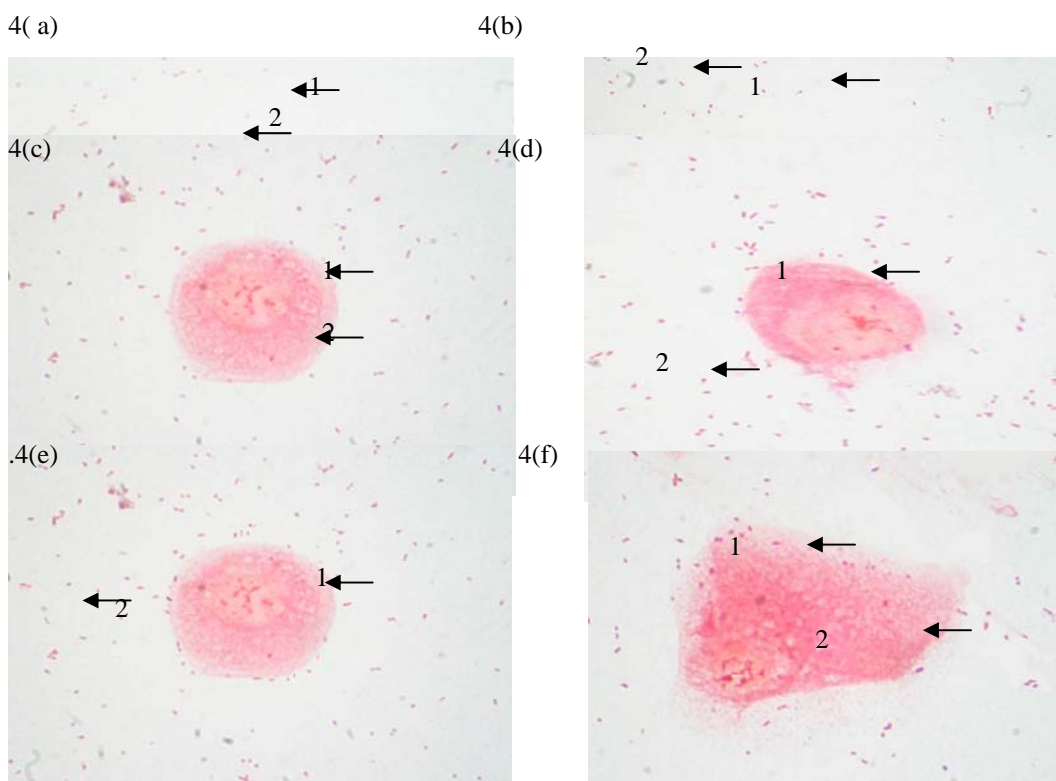
sehingga *P. mirabilis* P355 tidak dapat melakukan adhesi ke sel epitel. Pada pengenceran protein hemaglutinin pili yang lebih besar maka reseptor yang dijenuhi oleh protein hemaglutinin berkurang, sehingga bakteri yang dapat menempel ke sel epitel menjadi lebih banyak. Fenomena ini dapat dilihat, pada Gambar 4(b) dengan dosis protein hemaglutinin 200 µl, bakteri yang menempel lebih banyak bila dibanding dengan dosis hemaglutinin 400 µl, seperti yang tampak pada Gambar 4(a), pada Gambar 4(c) bakteri yang menempel lebih banyak dibanding dengan Gambar 4(b) dan seterusnya. Jadi semakin pekat protein yang diberikan menunjukkan semakin besar hambatan adhesi *P. mirabilis* P355 ke sel epitel dibandingkan dengan yang tanpa dihambat oleh protein hemaglutinin. Kecenderungan penurunan indeks adhesi pada konsentrasi protein yang lebih tinggi dapat dilihat pada Gambar 4(a). Jadi semakin pekat

protein hemagglutinin yang dipaparkan ke sel epitel vesika urinaria kelinci, semakin sedikit jumlah bakteri *P. mirabilis* yang menempel. Untuk lebih jelasnya indeks adhesi *P. mirabilis* P355 pada sel vesika urinaria kelinci dapat dilihat pada Tabel 1.

Perhitungan indeks adhesi pada Tabel 1. memperlihatkan kecenderungan semakin tinggi

protein hemagglutinin yang disalut, semakin sedikit pelekatan bakteri pada sel epitel vesika urinaria.

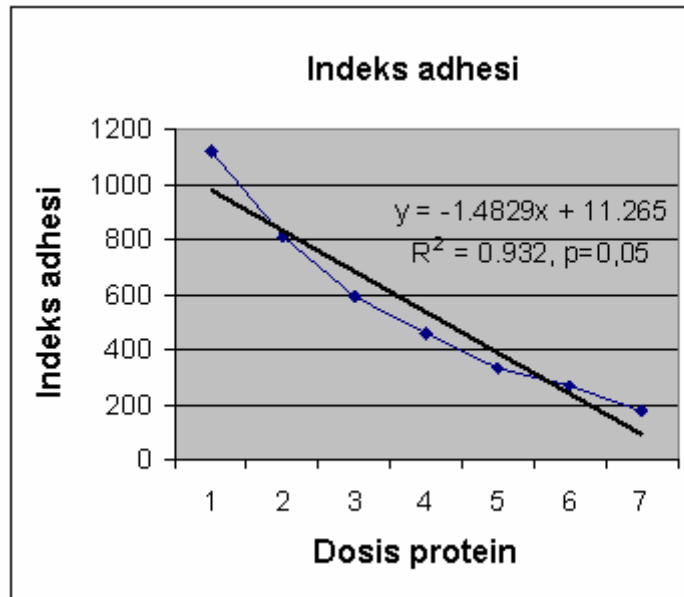
Analisis statistik menggunakan regresi linier pada perhitungan indeks adhesi *P. mirabilis* P355 pada sel epitel vesika urinaria tampak pada Gambar 5.



Gambar 4.a-f. Uji hambat adhesi, direkam dengan menggunakan fotomikroskop Olympus dengan perbesaran 1000X ( emersi ). Gambar 4(a). hambat adhesi dengan dosis 400 µl, Gambar 4(b). dengan dosis protein 200 µl, Gambar (4c). dengan dosis protein 100 µl, Gambar 4(d). dosis protein 50 µl, Gambar (4e). dosis protein 25 µl, Gambar 4(f). dosis protein 12,5 µl. 1 .epitel vesika urinaria, 2. *P. mirabilis*

Tabel 1. Hasil perhitungan indeks adhesi *P. mirabilis* P355 pada epitel vesika urinaria kelinci dengan menggunakan protein hemagglutinin berat molekul 35,2 kDa

Ulangan	Indeks adhesi						
	Dosis protein						
	400 µl	200 µl	100 µl	50 µl	25 µl	12,5 µl	0 µl
I	160	284	340	432	572	804	1084
II	180	252	328	476	624	832	1076
III	188	260	312	460	574	776	1180



Gambar 5. Analisis regresi indeks adhesi *P. mirabilis* P355 pada sel epitel vesika urinaria kelinci dengan menggunakan protein hemaglutinin 35,2 kDa 1. Dosis protein HA-F35,2 kDa 0 µl; 2. Dosis protein HA-F 35,2 kDa 12,5 µ; 3. Dosis protein HA-F 35,2 kDa 25 µl; 4. Dosis protein HA-F 35,2 kDa 50µl; 5. Dosis protein HA-F 35,2 kDa 100 µl; 6. Dosis protein HA-F 35,2 kDa 200 µl ; 7. Dosis protein HA-F 35,2 kDa 400 µl.

Berdasar regresi linier, tampak bahwa besarnya dosis mempengaruhi indeks adhesi *P. mirabilis* P355 ke sel epitel vesika urinaria dengan  $r^2 = 0,932$  dan analisis varian satu jalur (ANOVA) juga menunjukkan hasil yang signifikan dengan p value 0,005 dengan tingkat kepercayaan 95 % .

Berdasarkan uji adhesi sebagaimana yang ditampilkan pada Gambar 3-4 dan Tabel 1 , dengan pemberian dosis yang semakin meningkat akan diikuti oleh penurunan indeks adhesi, maka dapat disimpulkan bahwa protein hemaglutinin fimbria *P. mirabilis* dengan berat 35,2 kDa adalah protein adhesin.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Sumarno (2000), protein hemaglutinin *V. cholera* dengan berta molekul 50,3 kDa, 37,8 kDa, 35,9 kDa dan 21,3 kDa yang berasal dari pili dan dari *outer membrane protein* mempunyai berat molekul 37,8 kDa merupakan protein adhesin. Penelitian pada bakteri *Acinobacter baumannii* yang diambil dari urin penderita ISK menunjukkan bahwa protein hemaglutinin dengan berat molekul 16 kDa merupakan protein adhesin (Noorhamdani, 2005).

#### KESIMPULAN

Protein hemaglutinin pili *P. mirabilis* P355 dengan berat molekul 35,2 kDa merupakan protein adhesin yang berperan pada penempelan *P.mirabilis* pada sel epitel vesika urinaria kelinci.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Daifiku and Stamm, 1986. Bacterial Adherence to Bladder Uroepithelial Cells in catheter-assoaiated Urinary Tract Infection. *NEJM*. **314** : 1208-1213
- Ehara, M., M.Ishibashi, Y. Ichinose, M. Iwanaga, S.Schimotori , T. Naito, 1986. Purification and Partial Characterisationmaf Fimbriae of *Vibrio cholera* 0-1. *Vaccine*; **5**: 283-286.
- Gales, C.A., N.R. Jones, A.K. Gordon, S.H. Sader, W.W. Wilke, L.M. Beach, A.M. Pfaller, V.G. Doern, 2000. Activity and Spectrum of 22 Antimicrobial Agent Tested Againts Urinary Tract Infection Pathogens in Hospitalized patient in Latin America : report form the second year of the Sentry Antimicrobial Sueveillance

- Program, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **45** : 295-303.
- Li Xin., E.D. Johnson, T.L.H. Mobley, 1999. Requirement of MrpH for Mannosa-Resistant *Proteus* Like fimbriae Mediated Hemagglutination by *Proteus mirabilis*, *Infection and Immunity*, **67** : 2822- 2833.
- Li Xin, 2001. Repression of bacterial Motility by a Novel Fimbrial Gene Product, *European Molecular Biology Organization*, **17** ; 4854-4862.
- Mobley H.L., M.D. Island, and G. Massad, 1994. Virulence determinants of Uropathogenic *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*, *Kidney Int Suppl* **47** : 129-136
- Nagayama K., T. Oguchi , M. Arita , T. Honda , 1995. Purification and Characterizations of a Cell-Associated Hemagglutinin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* **63**: 1987-1992.
- Noorhamdani, 2005. Protein Fimbria 16 kDa Bakteri *Acinetobacter baumannii* dari Urin Penderita Infeksi Saluran Kemih Berperan sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin, *Jurnal Kedokteran Brawijaya* **21**: 44-53.
- Perepelov E. Ujazda , N.S. Senchenkova , A. Shashkov, W. Kaca, 1999. Struktural and serological studies on the O-antigen of *Proteus mirabilis* O14, a new polysaccharide containing 2-[(R)-1-carboxyethylamino] ethyl phosphate, *European Journal of Biochemistry* **261**: 347-353
- Pfaller M.A., I. Mujeeb, R.J. Hollis, R.N. Jones, and G.V. Doern, 2000. Evaluation of the Discriminatory Powers of Dienes Test and Ribotyping Methods for *Proteus mirabilis*, *Journal of Clinical Microbiology* **36** : 1077-1080.
- Salyers A.A., and D. Whitt , 1994, *Bacterial Pathogenesis*. Washington DC : ASM Press, p.115-127.
- Smeds A., K. Hemmann, M. Jakava-Viljanen, S. Pelkonen, H., Imberechts, A. Palva, 2001. Characterization of the Adhesin of *Escherichia coli* F18 Fimbriae. *Infection and Immunity*. **69** : 7941-7945.
- Sperandio V., J.A. Giron, W.D. Siveira and J.B. Kaper, 1995. The Omp U membrane protein, potential adherence factor of *Vibrio cholera*. *Infect Immun* **63**: 4433-4438.
- Sumarno, 2000. *Karakterisasi Molekuler Protein Adhesi Vibrio cholerae 01 M094V dan Protein Reseptornya pada Sel Epitel Usus Halus Tikus Putih, Studi Patogenitas V. cholerae 01 M094V*. Disertasi Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, Surabaya. [ Tidak dipublikasikan ]
- Wassif C., D. Cheek, and R. Belas, 1995. Molecular Analysis of a Metalloprotease from *Proteus mirabilis*, *Journal of Bacteriology* **177** : 5790-5798.