

Identifikasi Molekul Adhesi Pili *Pseudomonas aeruginosa* pada Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Culture

Dwi Yuni Nur Hidayati*

Program Studi Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Pseudomonas aeruginosa merupakan salah satu penyebab Gram negatif bakteremia yang bisa berlanjut menjadi sepsis. Bakteri ini banyak menginfeksi penderita di rumah sakit dengan membentuk koloni pada pembuluh darah melalui proses adhesi (pelekatan). Pili dan bagian *Outer Membrane Protein* (OMP) adalah faktor yang mempengaruhi pelekatan bakteri *P. aeruginosa*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui berat molekul protein hemagglutinin yang terdapat pada pili dan membuktikan peran protein hemagglutinin pada pili dalam pelekatan bakteri *P. aeruginosa*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolasi protein pili *P. aeruginosa* secara bertingkat, dilanjutkan dengan uji hemagglutinasi (metode mikrotiter) dan uji adhesi menggunakan protein pili hasil elektroelusi yang disalutkan pada kultur sel endotel (HUVECs) (konsentrasi 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 dan 0 [kontrol]). Hasil penelitian menunjukkan adanya reaksi hemagglutinasi pada potongan pili ketiga dengan titer tertinggi (1/128). Protein hemagglutinin dengan berat molekul 38,19 kDa memberikan titer tertinggi (1/16). Hasil uji adhesi protein hemagglutinin yang disalutkan pada sel endotel menunjukkan bahwa semakin tinggi pengenceran maka adhesi bakteri menunjukkan peningkatan secara signifikan dengan konstanta regresi (r)= 0,98 dan p value= 0,00. Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa protein hemagglutinin pili merupakan protein adhesin. Protein adhesin dengan berat molekul 38,19 kDa berperan pada pelekatan bakteri *P. aeruginosa* 9064 dengan kultur sel endotel (HUVECs).

Kata kunci: adhesi, hemagglutinasi, pili, *Pseudomonas aeruginosa*

PENDAHULUAN

Peningkatan kejadian dan problema penyakit infeksi yang biasanya dikaitkan dengan keadaan negara berkembang dan kebersihan yang kurang, ternyata tidak seluruhnya benar. Di Amerika Serikat, kematian akibat sepsis tiap tahunnya mencapai 70.000 orang. Sekitar 50-60% sepsis disebabkan oleh bakteremia Gram negatif. Penyebab Gram negatif bakteremia yang paling sering terjadi adalah famili *Enterobacteriaceae* dan *Pseudomonaceae*, terdiri dari *Escherichia coli* (35%), *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* (38%) dan *Pseudomonas aeruginosa* (12 %) [1].

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang, bergerak dengan flagel, dan bersifat aerob. Bakteri ini banyak menginfeksi penderita di rumah sakit dengan predisposisi tertentu. Banyak faktor-faktor penentu patogenitas dari bakteri ini diantaranya yang berhubungan dengan struktur sel seperti pili (*fimbriae*) dan bahan yang dikeluarkan seperti exotoxin A dan protease [2].

Kontak langsung antara agen infeksi dengan sel inang diawali dengan proses adhesi (pelekatan) [3]. Bakteri *P. aeruginosa* dapat melakukan adhesi dan membentuk koloni pada bermacam-macam tipe sel yaitu epitel sel *buccal*, paru, ginjal dan sel endotel [3]. Adhesin bakteri Gram negatif diperankan oleh suatu protein yang mampu mengaglutinasi eritrosit mamalia protein ini disebut dengan protein hemagglutinin, salah satu contoh adalah protein adhesin *Klebsiella pneumoniae* yang diperankan oleh protein hemagglutinin 29 kDa [4].

Penemuan bahwa adhesi merupakan tahap awal proses infeksi pada sebagian besar bakteri, menunjukkan bahwa protein adhesin tersebut memiliki potensi sebagai komponen vaksin yang baik. Salah satu contoh adalah *Fim H vaccine* yang sedang dikembangkan untuk mencegah infeksi saluran kemih yang disebabkan *E. coli* [5]. Kemampuan bakteri untuk melekat dan menembus sel endotel merupakan akibat dari interaksi adhesin-reseptor antara bakteri dan permukaan sel endotel [6]. Molekul reseptor tergantung pada jenis bakteri. Molekul reseptor terdapat di enterosit epitel vesica urinaria atau endotel. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* melekat selektif terhadap sel-sel endotel manusia [7].

* Alamat korespondensi penulis:

Dwi Yuni Nur Hidayati

e-mail : hidayati@yahoo.co.id

Alamat : Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran
Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang, 65154

Penelitian mengenai pengaruh protein adhesin yang terdapat pada pili sebagai faktor virulensi pada proses adhesi dengan sel endotel *Human Umbilical Vein Endothelial Cells Culture* (HUVECs) sebagai tempat pelekatan bakteri *P. aeruginosa* belum ada yang melaporkan. Berdasarkan uraian di atas diharapkan dapat dilakukan identifikasi protein adhesin dengan menentukan besarnya berat molekul protein hemaglutinin bakteri *P. aeruginosa*.

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian

Isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari bahan pemeriksaan klinik yang diperoleh di Laboratorium Klinik Mikrobiologi Rumah Sakit Saiful Anwar (RSSA) Malang yang mempunyai titer aglutinasi tinggi. Jenis Penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorik, dengan desain *Posttest Only Kontrol Group Design*. Setiap unit percobaan terdiri satu *well* kultur endotel yang didalamnya terdapat *cover slip*. Masing-masing perlakuan diinkubasi dengan *P. aeruginosa*. Kelompok kontrol adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang dilakukan uji adhesi tanpa penambahan konsentrasi protein pili. Sedangkan kelompok perlakuan adalah bakteri *P. aeruginosa* yang dilakukan uji adhesi dengan penambahan konsentrasi protein pili yang berbeda.

Metode Kultur *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri yang digunakan berasal dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi RSSA. Bakteri ditumbuhkan pada media TCG. Sebelum bakteri ditumbuhkan dalam media TCG, bakteri terlebih dahulu ditumbuhkan dalam media TCBS dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 24 °C. Biakan yang telah tumbuh diambil dan ditanam pada media TCBS (inkubasi 24 jam suhu 24 °C). Biakan yang tumbuh diambil dengan cara dikerok, sebelumnya dituangkan PBS steril pH 7,4 secukupnya. Suspensi bakteri tersebut dimasukkan ke dalam botol yang berisi 1000 ml larutan *Brain Heart Infusion Broth* (BHI). Suspensi tersebut dikocok kuat selama 30 menit pada penangas air 37 °C. Suspensi bakteri diambil sebanyak 10 ml dan dimasukkan ke dalam media TCG dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C.

Metode Isolasi Pili *Pseudomonas aeruginosa*

Metode isolasi pili bakteri ini merujuk dari Ehara [8]. Bakteri dipanen dari botol biakan bakteri dan selanjutnya hasil koleksi ditambahkan *Tri Chloroacetic Acid* (TCA) sampai

konsentrasi 3% dan dihomogenasi. Suspensi kemudian disimpan pada suhu kamar selama satu jam dan dilanjutkan dengan sentrifugasi kecepatan 6.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C. Pelet diambil dan diresuspensi dengan cairan PBS pH 7,4 dengan perbandingan antara pelet dan cairan 1:10. Bakteri kemudian dicukur menggunakan *mixer* yang telah dirancang khusus untuk pencukuran pili di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Universitas Brawijaya Malang. Bakteri dicukur dengan kecepatan penuh selama satu menit, diulang sampai lima kali dengan masa istirahat satu menit. Hasil yang diperoleh dari pencukuran pili bakteri kemudian disentrifugasi selama 30 menit, kecepatan 12.000 rpm, pada suhu 4 °C. Pili yang terletak pada bagian supernatan diambil. Endapan (pelet) diresuspensi dengan larutan dan cara yang sama, kemudian dikumpulkan dengan mencukur ulang beberapa kali sampai dihasilkan supernatan yang menunjukkan tes aglutinasi negatif.

Metode Isolasi Protein Hemaglutinin Pili *P. aeruginosa*

Pili yang telah dikoleksi selanjutnya dilakukan SDS-PAGE. Sel dipotong lurus pada berat molekul yang diinginkan dan potongan pita tersebut dikumpulkan dan dimasukkan pada tabung membran. Selanjutnya pita dianalisis menggunakan larutan penyangga elektroforesis (*running buffer*). Kemudian dilanjutkan dengan analisis *elektroelusion* menggunakan sistem elektroforesis *horizontal apparatus* dengan aliran 125 mV selama 25 menit. Hasil elektroforesis dielusi dengan larutan pengangga PBS pH 7,4 selama 48 jam masing-masing dua liter dan diganti tiga kali. Cairan hasil elusi, yang berasal dari potongan pita SDS-PAGE tersebut dilakukan uji hemaglutinasi.

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Monitoring berat molekul dikerjakan menggunakan SDS-PAGE metode Laemmli [9]. Sampel protein dipanaskan 100 °C selama lima menit dalam larutan penyangga yang mengandung 5 mM Tris HCl pH 6,8, 5% *2-mercapto ethanol*, 2,5% *sodium dodecyl sulfate*, 10% *glyserol* dengan warna pelacak *bromophenol blue*. Dipergunakan 12,5% *mini slab gel* dengan *tracking gel* 4%. Voltase yang digunakan 125 mV. Sebagai bahan pewarna adalah *coomassie brilliant blue* dan molekul standar *sigma low range marker*.

Metode Uji Hemaglutinasi

Uji hemaglutinasi dikerjakan menurut Hanne and Finkelstein [10]. Sel darah merah dicuci sebanyak tiga kali menggunakan PBS dengan cara

sentrifugasi, kecepatan 3000 rpm masing-masing selama 10 menit. Pengenceran sampel dibuat kon-sentrasi $\frac{1}{2}$ dan volume 50 μ l pada tiap sumur mikroplat V. Tiap sumur ditambahkan suspensi darah merah mencit konsentrasi 0,5% dengan volume sama. Kemudian digoyang dengan menggunakan *rotator plate* selama satu menit. Selanjutnya diletakkan pada suhu kamar selama satu jam. Besarnya titer ditentukan dengan pengamatan adanya aglutinasi darah merah pada pengenceran yang terendah. Sampel yang diuji adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, protein pili. Jenis darah merah yang digunakan adalah darah manusia dan tikus. Aglutinasi dibaca apabila terlihat hasil aglutinasi (aglutinat) pada dasar sumuran *plat titer micro* dengan kontrol negatif. Titer hemaglutinasi dihitung berdasarkan angka kebalikan pengenceran tertinggi yang masih menunjukkan aglutinasi. Setiap uji dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

Isolasi dan Pembuatan Kultur Sel Endotel

Semua bahan yang akan digunakan dihangatkan hingga 37 °C. Umbilikus dibersihkan dari debris sel dengan *tissue*. Masing-masing ujung umbilikus dipotong transversal sehingga terlihat dua arteri dan vena (dinding yang lebih tebal, lebih besar dan lentur). Selanjutnya kanul dimasukkan pada satu ujung vena (klem) kemudian diikat dengan erat. Vena dibersihkan dengan PBS A melalui kanul yang terpasang dengan menggunakan *sprit* 20 cm. Ujung umbilikus yang tidak memiliki kanul diikat kuat. Selanjutnya kolagenase dimasukkan ke dalam vena seperti cara memasukkan kanul dan dibiarkan *sprit* terpasang pada kanul. Selanjutnya umbilikus didekap dengan tangan (agar suhu mencapai 37 °C) selama 8 menit.

Kolagenase (mengandung sel endotel) dikeluarkan dengan cara diambil dengan *sprit* yang masih terpasang dan dipindahkan pada tabung sentrifugasi steril. Cara seperti pemberian kolagenase diulang tetapi dengan menggunakan 8 ml PBS A. Larutan tersebut kemudian diambil kembali seperti pada cara sebelumnya. Larutan yang mengandung sel endotel disentrifugasi dengan kecepatan 1300 rpm selama 8 menit. Sentrifugasi diulang sebanyak dua kali dengan ditambahkan 2 ml media. Supernatan yang terbentuk dipisahkan dan pelet diresuspendi dengan 4 ml media kultur. Supernatan yang diperoleh diinkubasi dalam inkubator (5% O dan 95% CO₂).

Pada hari berikutnya media diambil dan dicuci dengan menggunakan *serum free media*, kemudian diisi lagi dengan 4 ml media kultur. Setiap dua hari sekali setengah dari media

diambil dan diganti dengan yang baru. Sel endotel akan berbentuk sebagai *monolayer* pada hari ke-3 dan selanjutnya di subkultur.

Metode Pengecatan Struktur

Pengecatan struktur endotel dilakukan dengan menggunakan cat warna Gram (kristal violet, lugol, aseton-alkohol 96% dan safranin) dan Giemsa (*Wright* dan *buffer sample*). Kaca benda yang berisi sel endotel dalam *well* dicuci bersih dan dikeringanginkan dalam inkubator dengan suhu 37 °C. Selanjutnya ditetesi dengan larutan *Wright* secara merata diatas *cover slip* selama 3 menit. Larutan selanjutnya diambil dengan jarum suntik dan dibilas dengan *buffer sample* selama 10 menit. *Buffer* diangkat dengan jarum suntik kemudian *cover slip* dikeringanginkan dalam inkubator 37 °C. Dilakukan pengamatan struktur endotel pada mikroskop *inverted* dan mikroskop DIC (*Different Inferent Contrast*) dengan perbesaran 200 kali, 400 kali dan 1000 kali.

Metode Uji Adhesi

Uji adhesi menggunakan metode modifikasi Nagayama *et al.* [11]. Biakan cair bakteri *P. aeruginosa* disentrifugasi (6.000 rpm, 10 menit, suhu 4 °C). Suspensi bakteri diambil sebanyak 100 μ l (kandungan bakteri sekitar 10⁸ ml⁻¹) dan dimasukkan *well* yang didalamnya terdapat kaca benda berisi sel endotel. *Well* dimasukkan dalam *shaking* inkubator dengan pergerakan rotor 60 kali per menit, selama 30 menit, dengan suhu 37 °C, kemudian kaca benda dalam *well* dicuci sebanyak tiga kali dengan PBS steril (*calcium free*). Kaca benda dengan kristal violet dibilas dengan air selama satu menit, kemudian dicuci dengan lugol selama satu menit, dibilas dengan air dan dicuci dengan aseton-alkohol 96% selama satu menit, dibilas dengan air dan dicuci dengan safranin. Preparat dibilas lagi dengan air, kemudian dikeringanginkan. Dilakukan pengamatan model adhesi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada sel endotel, dan model struktur sel endotel. Model adhesi diamati menggunakan mikroskop dengan pembesaran 200 kali, 400 kali, dan 1000 kali, serta dilakukan perhitungan indeks adhesi yaitu jumlah rata-rata bakteri yang menempel tiap 100 sel endotel.

Metode Uji Hambatan Adhesi

Metode uji hambatan adhesi merujuk pada Sumarno [12]. Bakteri *P. aeruginosa* diencerkan hingga *Optical Density* (OD) 1. Sampel protein pili hasil elektroelusi diencerkan dengan seri pengenceran masing-masing $\frac{1}{2}$ kali dengan menggunakan PBS steril pH 7,4 sebanyak 500 ml dan

selanjutnya dimasukkan ke dalam sumuran yang berisi *cover slip* kultur endotel (inkubasi pada *water bath* dengan suhu 37 °C, *shaker* dengan pergerakan rotor 60 kali tiap menit selama 30 menit). Bakteri *P. aeruginosa* OD 1 dimasukkan sebanyak 200 µl pada masing-masing *cover slip* yang berisi endotel. Dilakukan inkubasi dengan *shaker incubator* dengan kecepatan rotor 60 kali tiap menit, pada suhu 37 °C selama 30 menit. *Cover slip* yang berisi endotel diangkat dengan pinset, difiksasi, dan dilakukan pengecatan Giemsa Gram. Masing-masing pewarnaan dilakukan selama satu menit. *Cover slip* dikeringanginkan dan dilakukan penghitungan uji hambatan adhesi.

Teknik Analisis Data

Data dianalisis menggunakan analisis korelasi antara perubahan indeks adhesi dan perubahan konsentrasi protein pili hemagglutinin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

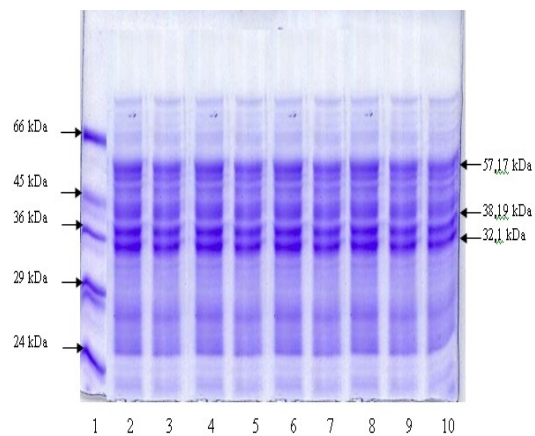
Uji Hemagglutinas & SDS-PAGE

Uji hemagglutinas dilakukan untuk mencari protein hemagglutinin *P. aeruginosa* dengan titer tertinggi yang berasal dari sepuluh isolat dan protein hemagglutinin yang berasal dari pili (*fimbriae*) setelah biakan bakteri dipotong dengan alat *omnimixer* modifikasi [8]. Pada uji saring mencari protein hemagglutinin dari 10 isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diperoleh isolat *Pseudomonas aeruginosa* 9064 dengan titer 1/64 dan fraksi pili (*fimbriae*) diperoleh titer 1/128 pada uji hemagglutinas menggunakan eritrosit mencit (Tabel 1). Selain itu, dari hasil uji hemagglutinas protein pili *P. aeruginosa* menunjukkan titer hemagglutinas dari potongan pili ketiga (P3) paling tinggi dengan titer 1/128. Berdasarkan kedua data tersebut diketahui

bahwa bakteri *P. aeruginosa* 9064 memiliki protein hemagglutinin (HA) yang berasal dari pili (*fimbriae*).

Hasil SDS-Page Isolasi Bertingkat Protein Pili *P. aeruginosa* 9064

Berdasarkan hasil analisis SDS PAGE potongan pili yang memiliki sifat aglutinasi eritrosit mencit, diperoleh tiga gambaran berat molekul pita protein yang paling menonjol dari potongan protein pili ketiga, yaitu 57,17 kDa, 38,19 kDa dan 32,1 kDa. Gambaran ketiga protein yang menonjol tersebut dipotong untuk dikoleksi, selanjutnya dilakukan pemurnian untuk elektroelusi sehingga didapatkan protein larutan. Protein untuk elektroelusi seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil elektroforesis SDS-PAGE protein Pili potongan ke-3 untuk Elektroelusi

Keterangan : 1 : protein perunut
2 – 10 : potongan Pili 3

Tabel 1. Titer Hemagglutinas dari berbagai isolat bakteri *P. Aeruginosa*

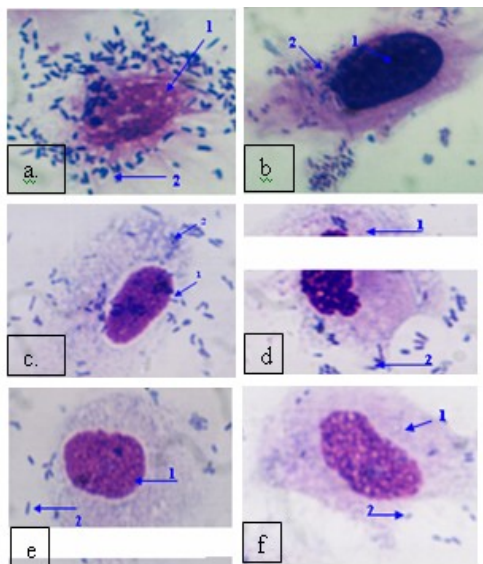
| Materi | Sumur | | | | | | | | | | | |
|---------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|---|---|----|----|---------|
| | 1 (1/2) | 2 (1/4) | 3 (1/8) | 4 (1/16) | 5 (1/32) | 6 (1/64) | 7 (1/128) | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 K |
| Ps0865 | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ps9475 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ps0670 | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ps1019 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Ps0881 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ps0614 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ps9476 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ps9064* | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Ps0871 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ps3418 | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Uji Hemaglutinasi terhadap Berbagai Jenis Eritrosit

Uji hemaglutinasi ini bertujuan untuk mengamati hemaglutinasi terhadap eritrosit manusia golongan darah A, B, AB, O dan darah mencit. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan data yang diperoleh dapat diketahui bahwa titer hemaglutinasi protein pili 38,19 kDa memberikan hasil positif dengan eritrosit manusia golongan darah O ($\frac{1}{16}$) dan eritrosit mencit ($\frac{1}{32}$) sedangkan dengan eritrosit manusia golongan A, B dan AB memberikan hasil negatif.

Uji Adhesi Protein Hemaglutinin

Uji adhesi bertujuan untuk membuktikan bahwa protein hemaglutinin pili 38,19 kDa merupakan protein adhesin, sebagai faktor virulensi yang memiliki kemampuan untuk melekatkan bakteri *P. aeruginosa* pada sel hospes, dalam hal ini adalah sel endotel (HUVECs). Berdasarkan pengamatan terhadap uji adhesi protein hemaglutinin pada enam perlakuan (Gambar 2) dan berdasarkan hasil perhitungan indeks adhesi *P. aeruginosa* pada sel endotel (HUVECs) yang disalut protein hemaglutinin 38,19 kDa tersebut memberikan gambaran bahwa, semakin tinggi konsentrasi protein hemaglutinin yang diberikan maka akan menurunkan indeks adhesi.



Gambar 2. Uji adhesi protein hemaglutinin (Foto mikroskop Nikon pembesaran 1000 kali)

Keterangan:

- a. kontrol (*P. aeruginosa* pada sel endotel)
- b. perlakuan protein hemaglutinin 38,19 kDa konsentrasi $\frac{1}{16}$
- c. perlakuan protein hemaglutinin 38,19 kDa konsentrasi $\frac{1}{8}$
- d. perlakuan protein hemaglutinin 38,19 kDa

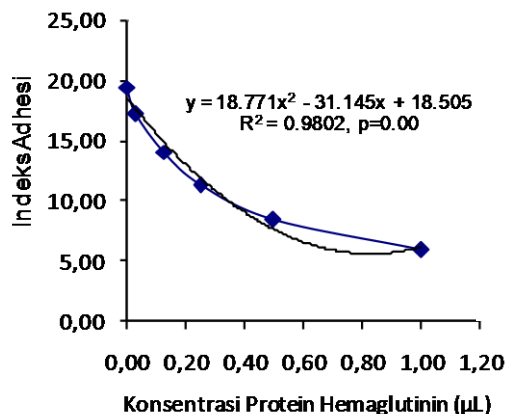
- koncentrasi $\frac{1}{4}$
- e. perlakuan protein hemaglutinin 38,19 kDa konsentrasi $\frac{1}{2}$
- f. perlakuan protein hemaglutinin 38,19 kDa konsentrasi 1
- 1. Sel endotel HUVECs
- 2. Sel bakteri *P. Aeruginosa*.

Analisis lebih lanjut dengan menggunakan analisis regresi dan varian ($\alpha = 0.05$) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada masing-masing perlakuan yang diberikan. Kecenderungan peningkatan konsentrasi protein hemaglutinin terhadap indeks adhesi, dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan hasil analisis varian satu jalur (ANOVA) diketahui bahwa dosis pengenceran protein hemaglutinin berpengaruh signifikan terhadap indeks adhesi *P. aeruginosa* pada sel endotel HUVECs dengan signifikansi F hitung (p) = 0,00 dan tingkat kepercayaan 95%. Hasil analisis perbandingan masing-masing perlakuan melalui (*Tukey's test*), menunjukkan bahwa masing-masing dosis pengenceran memberikan hasil yang berbeda secara signifikan dengan tingkat kepercayaan 95%, jika dibandingkan semua perlakuan. Berdasarkan hal tersebut, diketahui bahwa pemberian protein hemaglutinin pili 38,19 kDa dapat menurunkan indeks adhesi.

P. aeruginosa mempunyai dua tipe protein adhesi yaitu protein adhesi yang terdapat pada pili dan yang terdapat pada permukaan sel (*non pillus adhesins*). Pili *P. aeruginosa* yang digunakan pada penelitian ini merupakan pili tipe 4 yang hampir sama dengan pili yang dimiliki bakteri *Nesseria gonorrhoeae* dan *Vibrio cholera* [2]. Bakteri Gram negatif berinteraksi dengan lingkungan luar menggunakan faktor virulensi termasuk toksin ekstraseluler, pili, flagella, *autotransporter*, dan *crystallin S-layers* [13]. Hal ini membuktikan bahwa *P. aeruginosa* mempunyai protein adhesin dari pili potongan ketiga dengan berat molekul 38,19 kDa.

Adhesi *P. aeruginosa* pada sel endotel HUVECs ditentukan oleh faktor virulensi berupa pili. Penelitian lain menyebutkan bahwa bahwa *Pseudomonas aeruginosa* juga mengaktivasi sel M manusia untuk menginduksi migrasi neutrophil transendothelial melalui sel M yang berasal dari IL-1 α dan IL-1 β [14]. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui kemungkinan penggunaan mekanisme adhesi oleh HUVECs untuk menginfeksi endotel. Diduga adhesi *P. aeruginosa* terhadap endotel ditentukan oleh sekresi protein dengan *general secretory pathway* (GSP) yang merupakan dua bagian

proses yang membutuhkan *Sec translocase* didalam *inner membrane* dan suatu substrat pemisah sekresi spesifik aparatus selama sekresi menyeberangi *outer membran*. Salah satu faktor virulensi *P. aeruginosa* untuk berinteraksi dan komunikasi dengan inang yang termasuk dalam GSP adalah pili [2, 13].



Gambar 3. Kecenderungan peningkatan konsentrasi protein hemagglutinin terhadap indeks adhesi

Pili tipe IV *P. aeruginosa* merupakan *pseudopilin* yang didisain oleh protein PulG, PulH, Pull, dan PulJ. Semua protein termasuk *prepilin peptidase cleavage* dan bagian *metilasi* dan hampir semuanya terletak pada periplasma. Struktur pili ini merupakan pilus yang menyeberangi periplasma (tabung sekresi), berfungsi untuk memfasilitasi transport Pula menuju *Outer Membran* (OM). Dalam hal ini pili seperti protein, merupakan sistem sekresi *pullulanase* yang melibatkan tipe 4 *prepilin* seperti signal peptidase yang disusun oleh PilO yang sangat penting untuk sekresi protein Pula.

Comer *et al.*, menjelaskan *P. aeruginosa* strain 1244 mempunyai *pilin glycan* yang berikatan secara kovalen terhadap residu serin [15]. Hasil sequencing N-terminal dari fraksi pilin dihasilkan dari perlakuan endopeptidase dan diidentifikasi dengan reaksi monoklonal antibodi spesifik *glycan* yang terindikasi bahwa *glycan* berada diantara residu 75 dan *terminus pilin karboksil*. Bagian *karboksil-proksimal* pada *pilin disulfida loop*, yang di ukur pada *pilin glycan*, merupakan epitop sel B linear utama, ini sebagai epitop peptida.

Pili dari *P. aeruginosa* pada dasarnya merupakan protein fiber yang memanjang dari satu atau kedua sel *pole*. Proses ini merupakan faktor penting untuk virulensi yang mem-

perantarai proses adhesi pada jaringan sel *inang*. Pili mampu meluas dan beretraksi, sebuah bagian yang mempengaruhi kolonisasi dan memfasilitasi proses *twitching*, sebuah bentuk motilitas yang sangat penting dalam *desiminasi* patogen. Pili *P. aeruginosa* merupakan bentuk tetap dari sebuah subunit monomerik, pili yang mempunyai berat molekuler antara 15 kDa hingga 17 kDa dan mempunyai karakteristik yang berhubungan dengan pili tipe IV. Salah satu karakteristik ini adalah adanya *methylated amino-terminal phenylalanine*. Hal ini menunjukkan bahwa, pada modifikasi *post translasional* pili *P. aeruginosa* 1244 merupakan glikosilasi dan modifikasi ini membutuhkan adanya fungsi dari gen *PilO*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa berat molekul potongan pili ketiga adalah 38,19 kDa. Seperti dijelaskan oleh peneliti terdahulu bahwa pili *P. aeruginosa* merupakan pili sub unit monomerik tetapi berat molekulnya adalah 15 kDa sampai 17 kDa, setelah ditentukan ternyata gen penyandinya adalah *PilO*. Diduga berat molekul 38,19 kDa merupakan berat molekul sub unit monomerik dengan jenis gen penyandi yang berbeda, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan bentuk protein dengan berat molekul tersebut. Selain itu, diperlukan penelitian lebih lanjut tentang jenis protein dan analisis gen penyandi protein *P. aeruginosa*.

Castric *et al.*, juga menjelaskan bahwa pili *P. aeruginosa* merupakan pili somatik, filamen protein yang meluas seperti benang dari satu atau kedua sel poles, yang merupakan faktor virulensi utama, memicu adherensi pada sel inang dan proses invasi pada sel inang [16]. Berat molekul protein pili ini berkisar antara 16 kDa. Bentuk *mature* dari protein ini dihasilkan oleh pergerakan dari suatu *six-residue leader sequence* sebuah proses yang diatur oleh metilasi pada *nascent amino-terminal phenylalanine*. Deter-minasi proses ini tergantung jenis gen penyandi *PilO*, yaitu sebuah gen yang terletak pada bagian operon yang juga mengandung pili struktural gen *PilA*. Berat molekul kisaran 16 kDa diketahui sebagai berat molekul penentu patogen oportunistik pada bakteri Gram negatif *P. aeruginosa*. Berdasarkan kajian literatur tersebut perlu ditentukan apakah berat molekul protein dari hasil penelitian potongan pili ketiga 38,19 kDa isolat Ps 9064 juga merupakan patogen oportunistik terhadap sel *inang* khususnya sel endotel HUVEC.

Mekanisme invasi *P. aeruginosa whole cell* pada sel endotel HUVEC normal berdasarkan

hasil penelitian menunjukkan bahwa struktur morfologi sel endotel kultur yang dicat dengan pewarnaan *Wright Giemsa* dan pengamatan dengan mikroskop merk Nikon menunjukkan bahwa tampak bentuk sel pipih, dengan struktur sitoplasma dan inti sel yang masih jelas, dan secara morfologis belum menunjukkan adanya perubahan morfologis secara nyata.

Gambaran adhesi bakteri *P. aeruginosa* menunjukkan pola agregat dan ada pula yang berpola *diffuse* atau menyebar pada permukaan sel endotel. Kultur sel endotel yang telah diperlakukan dengan adhesi *P. aeruginosa* dan disalut dengan protein pili hemagglutinin pada potongan pili ketiga dengan berat molekul 38,19 kDa dengan berbagai dosis pengenceran menunjukkan bahwa semakin besar dosis protein hemagglutinin yang disalut pada sel endotel kultur menunjukkan adanya tingkat penghambatan adhesi yang semakin besar. Semakin besar pengenceran yang diberikan, memberikan gambaran adhesi yang lebih besar dibandingkan dosis pemberian protein hemagglutinin tanpa pengenceran. Kecenderungan peningkatan konsentrasi protein hemagglutinin terhadap indeks adhesi, dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan Gambar 3, diketahui bahwa semakin besar tingkat pengenceran maka terjadi peningkatan adhesi bakteri secara signifikan dengan nilai *regresi* (r) = 0,98 dan p value= 0,00. Hal ini diduga terdapat hubungan yang signifikan antara pili dengan berat molekul 38,19 kDa dengan adhesi *P. aeruginosa* pada sel endotel kultur normal. Berdasarkan titer tertinggi pada pengenceran protein pili potongan protein hemagglutinin pada dosis $\frac{1}{16}$ adhesi *P. aeruginosa* menunjukkan adhesi yang meningkat bila dibandingkan dengan dosis 1 dan dosis pengenceran $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ dan $\frac{1}{8}$. Hasil ini menunjukkan adanya pengaruh pemberian protein hemagglutinin terhadap indeks adhesi bahwa semakin besar konsentrasi protein adhesin pili (*fimbriae*) yang disalut pada sel endotel kultur makin kecil indeks adhesi bakteri *P. aeruginosa*. Hasil penghitungan indeks adhesi *P. aeruginosa* pada sel endotel juga menunjukkan semakin besar dosis pengenceran protein pili (*fimbriae*) yang disalut pada sel endotel maka indeks adhesi bakteri juga semakin besar.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan analisis hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa hasil pemoangan pili pada bakteri *P. aeruginosa* 9064 didapatkan protein

hemagglutinin dengan berat molekul 38,19 kDa. Semakin besar dosis protein hemagglutinin yang disalut pada sel endotel (HUVECs), maka semakin kecil nilai adhesi bakteri *P. aeruginosa*.

Saran

Perlu dilakukan analisis molekuler lebih lanjut terhadap protein hemagglutinin pili *P. aeruginosa* dengan berat molekul 38,19 kDa. Hal ini bertujuan untuk membuktikan kemungkinan pili potongan ketiga dengan berat 38,19 kDa merupakan salah protein hemagglutinin dan merupakan satu faktor virulensi pada sel endotel normal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Virella, G. 1997. Gram-negative Rods III: Oppor-tunistic and Zoonotic Bacteri; Microbiology and infectious disease 3rd edition. Williams and Willins awaverly Company. Philadelphia.
2. Salyers, A.A., D. Whitt. 1994. Bacterial Pathogenesis. ASM Press. Washington DC.
3. Comolli, J.C., L.L. Waite, K.E. Mostov, J.N. Engel. 1999. Pili Bending to Asialo-GM 1 on Epithelial Cells Can Mediate Cytotoxicity or Bacterial Internalisation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*. 67: 7:3207–3214.
4. Martino, P.D., Y. Bertin, J.P. Giradeau, V. Livrelli, B. Joly. 1995. Molecular Characterization and Adhesive Properties of CF29K an Adhesin of *Klebsiella pneumoniae* Strain Involved in Nosocomial Infec-tion. *Infection and Immunity* 67:700–707.
5. Wizemann, T.M., J.E. Adamoum, S. Langermann. 1999. Adhesins as Targets for Vaccine Develop-ment. Centers for Disease Kontrol and Prevention. USA.
6. Tompkins D.C., V.B. Hatcher, D. Patel, G.A. Orr, C.L. Higgins, F.D. Loury. 1985. A Human Endothelial Cell Membrane Protein that Binds *StaphyloCoccus aureus* In Vitro. *J.Clin Invest*. 65:1248-1254.
7. Plotkowski, M.C., A.M. Saliba, S.H. Pereira, M.P. Cervante, O. Bajolet-Laudinat. 1994. *Pseudomonas aeruginosa* selective adherence to and entry into human endothelial cells. *Infection and Immunity*. Dec. 62:5456-5463.
8. Ehara, M., M. Ishibashi, Y. Ichinose, M. Iwanaga, S. Shimotori, T. Naito. 1987. Purification and Partial Characterization of Pili of *Vibrio cholerae* O1. *Vaccine* 5:283-288.
9. Laemli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Protein During Assembly of The Head of Bacteriophage T.4. *nature* 227:680-685.

10. Hanne, L.F., R.A. Finkelstein. 1982. Characterization and distribution of the hemagglutinins produced by *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*. April. 36. 1:209–214.
11. Nagayama, K., T. Oguchi, M. Arita, T. Honda. 1995. Purification and Characterization of A Cell Associated Haemagglutinin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*. 63. 5:1987–1992.
12. Sumarno. 2000. Karakterisasi Molekuler Protein Adhesi *Vibrio Cholerae* 01 M094V dan Protein reseptornya pada Sel Epitel Usus Halus Tikus Putih (Wistar). Tesis. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
13. Stathopoulos, C., D.R. Hendrixson, D.G. Thanassi, S.J. Hultgreen. 2000. Secretion of Virulence determinants by the general secretory pathway in Gram-negative pathogens: an evolving story. *Microbes and infection*. 2:1061–1072.
14. Lin-Tong, J., G. Rafael, R.T.M. Boudreau, A.C. Issekutz. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* Activates Human Mast Cells to Induce Neutrophil Trans-endothelial Migration Via Mast Cell-Derived IL-1 α and IL-1 β ¹. *Journal Immunology*. 169:4522-4530
15. Comer, J.E., M.A. Marshal, V.J. Blanch, C.D. Deal. 2002. Identification of the *Pseudomonas aeruginosa* 1244 Pili glycosylation Sit. *Infection and Immunity*. 70. 6:2837–2845.
16. Castric, P., F.J. Cassels, R.W. Carlson. 2001. Structural Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 1244 Pili Glycan. *Journal of Biological Chemistry*. 270. 28:26479 – 26485.