

TOKSISITAS PROTEIN PILI *Escherichia coli* PADA DARAH MENCIT (*Mus musculus*)

Sukarjati, Pungky Slamet, Diah Karunia
Universitas PGRI Adi Buana Surabaya
Sukarjati@ymail.com

ABSTRAK. Protein Pili E. coli berpotensi digunakan sebagai pengontrolan fertilitas. Bahan pengontrol fertilitas mempunyai syarat aman, dapat mencegah kehamilan 100% , reversible dan tidak toksik. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan apakah protein pili E. coli bersifat toksik pada darah mencit.

Sampel yang digunakan adalah mencit betina sejumlah 16 ekor yang dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok perlakuan dan kelompok control. Protein Pili E. coli diperoleh dengan cara memotong pili E. coli menggunakan omnimixer. Selanjutnya dilakukan fraksinasi. Dilakukan elektroforesis dengan metode SDS PAGE, elektroelusi dan dialysis. Protein pili yang didapat di gunakan perlakuan dengan cara menginjeksi mencit kelompok perlakuan dengan 50 µg/ml selama 5 hari secara intravena. Selanjutnya hari ke 6 mencit di matikan dan darah diambil dari jantung. Parameter darah meliputi sel darah merah, sel darah putih, limfosit, monosit, dan haemoglobin diamati menggunakan *photometric method Mindray BA 88*. Data dianalisis menggunakan uji t. Hasil Analisis data adalah ada perbedaan jumlah WBC pada mencit perlakuan dibanding control (p=0.011). Jumlah limfosit antara mencit perlakuan dan mencit control tidak ada perbedaan (p= 0.210). Jumlah Sel darah Merah antara mencit perlakuan dan mencit control tidak ada perbedaan (p=0.66). Kadar Haemoglobin mencit perlakuan tidak berbeda dengan mencit control (p=0.76). Jumlah Monosit mencit perlakuan tidak berbeda dengan mencit control (p= 0.05). Jumlah Granulosit mencit perlakuan tidak berbeda dengan mencit control (p=0.170). Pada jumlah WBC walaupun ada perbedaan tetapi jumlah WBC masih dalam kisaran jumlah normal. Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa protein pili E. coli tidak toksik pada darah mencit sehingga dapat digunakan sebagai bahan pengontrolan fertilitas.

Kata Kunci : Protein Pili *Escherichia coli*, Toksisitas, Mencit, Haemoglobin, RBC, WBC, Limfosit, Monosit, Granulosit

PENDAHULUAN

Bahan kontrasepsi yang didasarkan atas penghambatan fungsi spermatozoa telah dipasarkan. Beberapa produk spermicidal yang telah dipasarkan tersebut sebagian besar berisi deterjen sebagai kandungan bahan aktifnya. Bahan tersebut meliputi Isononyl-phenyl-polyoxyethylene ether atau Nonoxynol9, methanyl-phenyl-olyoxyethylene ether atau Menfegol, dan Isooctyl-phenyl-polyoxyethylene ether atau Octoxynol (Digenis, et al., 1999). Penggunaan surfaktan spermicidal seperti deterjen bekerja pada sel epitel dan flora normal vagina. Penggunaan surfaktan secara berulang sebagai kontrasepsi vagina akan menambah resiko infeksi pada vagina atau pada servik dan menyebabkan iritasi. Disamping itu spermicida tipe deterjen mengubah flora normal bakteri dan menyebabkan berubahnya lingkungan mikroba vagina yang mengakibatkan infeksi oportunistik. Pengembangan spermicida vagina baru mempunyai syarat tidak toksik pada membran sel dan dapat menghambat kehamilan 100 %. Telah banyak dipasarkan spermicida tipe deterjen seperti yang telah di jelaskan di atas. Namun masih sedikit peptida yang dieksplorasi yang berpotensi sebagai kontrasepsi vagina. Peptida yang terkandung pada sekret kulit katak seperti dermaseptin dan magainin berpotensi sebagai spermisidal yang ampuh melawan sperma manusia dan melawan patogen penyebab penyakit menular seksual, tetapi bahan ini toksik (Zairi, et al., 2008). Sublitosin yang dihasilkan *Bacillus subtilis* menunjukkan dapat mengeliminasi spermatozoa motil. Bahan sintetik dan toksik ini yang dapat menghambat motilitas, dapat bekerja sebagai bahan kontrasepsi (Sutyak, et al., 2008). Beberapa bakteri juga dapat menghambat motilitas sperma. Bakteri dapat menghambat motilitas baik secara langsung dengan melekat ke sperma atau dengan mensekresikan substansi ekstraselluler yang dapat membuat sperma immotil. Diemer, et al., (1996) melaporkan immobilisasi sperma juga berhubungan dengan tingginya perlekatan antara bakteri dan sperma yang mengakibatkan

terjadinya agglutinasi. *S. aureus* juga dapat menyebabkan spermatozoa immotil dan menyebabkan aglutinasi. Hasil penelitian Gupta, et al., (2012) didapat bahwa faktor immobilisasi sperma telah berhasil diisolasi dari *S. aureus* dan dapat terikat ke spermatozoa serta menyebabkan sperma immotil.

Telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi protein pili *E. coli* isolat semen pria infertil. Protein pili *E. coli* isolat semen infertil tersebut mempunyai Berat Molekul (BM) 32.2 kDa dan berfungsi sebagai adhesin. Telah dibuktikan protein adhesi pili *E. coli* BM 32.2 kDa bersifat immunogenik (Sukarjati, 2011). *E. coli* mempunyai kemampuan melekat ke membran plasma spermatozoa menggunakan pili. Perlekatan tersebut terjadi pada kepala, bagian tengah dan ekor spermatozoa manusia. Kepala sperma khususnya segmen equatorial berfungsi untuk perlekatan dengan ovum. Perlekatan *E. coli* pada spermatozoa juga dapat menyebabkan aglutinasi sperma motil. Aglutinasi mengakibatkan sperma tidak dapat melaksanakan fungsinya yaitu memfertilisasi oosit. Mekanisme inilah yang menarik peneliti untuk memanfaatkan protein pili *E. coli* sebagai bahan pengontrolan fertilitas. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji toksisitas sistemik dari protein pili *E. coli* BM 32.2 kDa sebagai sperm agglutinating factor (SAF) menggunakan hewan model Mencit (*Mus musculus*).

KAJIAN LITERATUR

2.1.Potensi Protein dari Bakteri pada Pengontrolan Fertilitas

Mekanisme infertilitas akibat infeksi bakteri pada saluran reproduksi dapat terjadi melalui (a) perlekatan bakteri ke spermatozoa, (b) faktor immobilisasi yang dihasilkan oleh bakteri, (c) rekrutmen sistem imun, (d) perubahan pada sistem kelenjar. Hasil penelitian Prabha, et.al., (2010) menyatakan bahwa faktor immobilisasi sperma yang dihasilkan oleh *E. coli* secara ekstraselluler dapat mengganggu fungsi sperma. Hasil penelitiannya didapat bahwa faktor immobilisasi sperma tersebut dapat menghambat ionophore yang menginduksi reaksi akrosom manusia dan dapat menginduksi perubahan yang dapat mencegah terjadinya reaksi akrosom. Bila sperma tidak mengalami reaksi akrosom maka sperma akan gagal memfertilisasi oosit. Hal ini dapat dimanfaatkan untuk pencarian bahan kontrasepsi berbahan protein bakteri melalui mekanisme penghambatan fungsi sperma.

Bahan kontrasepsi yang didasarkan atas penghambatan fungsi spermatozoa telah dipasarkan. Beberapa produk spermicidal yang telah dipasarkan tersebut sebagian besar berisi deterjen sebagai kandungan bahan aktifnya. Bahan tersebut meliputi Isononyl-phenyl-polyoxyethylene ether atau Nonoxynol 9, methanyl-phenyl-polyoxyethylene ether atau Menfegol, dan Isooctyl-phenyl-polyoxyethylene ether atau Octoxynol (Digenis, et al., 1999). Penggunaan surfaktan spermicidal seperti deterjen bekerja pada sel epitel dan flora normal vagina. Penggunaan surfaktan secara berulang sebagai kontrasepsi vagina akan menambah resiko infeksi pada vagina atau pada servik dan menyebabkan iritasi. Disamping itu spermicida tipe deterjen mengubah flora normal bakteri dan menyebabkan berubahnya lingkungan mikroba vagina yang mengakibatkan infeksi oportunistik.

Pengembangan spermicida vagina baru mempunyai syarat tidak toksik pada membran dan dapat menghambat kehamilan 100 %. Telah banyak dipasarkan spermicida tipe deterjen seperti yang telah di jelaskan di atas. Namun masih sedikit peptida yang dieksplorasi yang berpotensi sebagai kontrasepsi vagina. Peptida yang terkandung pada sekret kulit katak seperti dermaseptin dan magainin berpotensi sebagai spermisidal yang ampuh melawan sperma manusia dan melawan patogen penyebab penyakit menular seksual, tetapi bahan ini toksik (Zairi, et al., 2008). Sublitosin yang dihasilkan *Bacillus subtilis* menunjukkan dapat mengeliminasi spermatozoa motil. Bahan sintetik dan toksik ini yang dapat menghambat motilitas, dapat bekerja sebagai bahan kontrasepsi (Sutyak, et al., 2008). Beberapa bakteri juga dapat menghambat motilitas sperma. Bakteri dapat menghambat motilitas baik secara langsung dengan melekat ke sperma atau dengan mensekresikan substansi ekstraselluler yang dapat membuat sperma immotil. Diemer,et al., (1996) melaporkan immobilisasi sperma juga berhubungan dengan tingginya perlekatan antara bakteri dan sperma yang mengakibatkan terjadinya agglutinasi. *S. aureus* juga dapat menyebabkan spermatozoa immotil dan menyebabkan aglutinasi. Hasil penelitian Gupta, et al., (2012) didapat bahwa faktor immobilisasi sperma telah berhasil diisolasi dari *S. aureus* dan dapat terikat ke spermatozoa serta menyebabkan sperma immotil.

Lysenin yaitu protein yang dipurifikasi dari *Eisenia foetida* dapat menyebabkan sperma immotil dan dapat membunuh spermatozoa vertebrata termasuk manusia dalam beberapa menit.

Secara *ex vivo* protein tersebut dapat menghancurkan sel darah merah manusia, tikus dan kambing serta injeksi secara intravena dapat membunuh tikus (Kobayashi, et al, 2000). Reddy et al., (2004) pertama kali melaporkan Nisin berfungsi sebagai kontrasepsi baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Aranha, et.al., (2004) melaporkan Nisin berpengaruh terhadap motilitas sperma tergantung waktu dan dosis yang digunakan.

METODE PENELITIAN

Dilakukan isolasi dan purifikasi dan produksi protein adhesi pili E. coli BM 32.2 kDa sebagai sperm agglutinating factor dengan langkah langkah sebagai berikut:

Perbanyakan *Escherichia coli* dan Memperkaya Pili.

E. coli dari stock diremajakan terlebih dahulu dengan membuat kultur di medium agar Mc Conkey suhu 37^o C selama 24 jam. Kemudian biakan dari medium tersebut di inokulasi ke Erlenmeyer berisi 500 ml medium BHI, dan diinkubasi 24 jam, kemudian bakteri dituang ke 50 botol 250 ml yang telah berisi medium TGC 25 ml (media untuk memperkaya fimbriae bakteri), masing-masing 10 ml. Dilakukan inkubasi 37^o C selama 48 jam. Selanjutnya biakan bakteri dikumpulkan jadi satu dalam tabung Erlenmeyer 1000 ml dan disiapkan untuk dilakukan pemotongan pili dari bagian sel *E. coli*.

Pemotongan Pili

Biakan cair dipindahkan ke dalam tabung sentrifus 100 ml, ditambah TCA 3%, kemudian diputar pada sentrifus dingin 4^oC 6000 rpm selama 15 menit. Endapan disuspensi dengan PBS pH 7,4 ; 3-5 kali volum, dilakukan pemotongan pili menggunakan alat *omnimixer* pada suhu 4^oC. Sampel diputar dalam sentrifus dingin 4^oC 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dan endapan disuspensi dengan PBS pH 7,4 secukupnya, kemudian dilakukan pemotongan pili lagi. Proses ini di ulang sampai 5 kali. Dari prosedur ini, diperoleh 5 macam supernatan yang mengandung fraksi pili dan endapan merupakan bagian sel bakteri.

Fraksinasi Pili

Pili yang di dapat dilakukan proses dialisis menggunakan larutan PBS pH 7,4 pada suhu 4^oC selama 2x24 jam untuk menghilangkan sisa TCA. Selanjutnya dialisat diendapkan dengan ammonium sulfat 35 % , diputar 6000 rpm 4^oC , supernatan di buang, endapan disuspensi dengan PBS secukupnya dan dilakukan dialisis kembali.

Elektroforesis dengan metode SDS PAGE untuk perbanyakan sperm agglutinating facor, Elektroelusi dan dialisis.

Fraksi pili potongan I dilakukan elektroforesis dengan metode SDS PAGE. Elektroforesis. Gel hasil SDS-PAGE 12, 5 % sebanyak 10 lembar yang terdapat pita protein pili pada posisi BM 32.2 kDa, dipotong secara mendatar pada sisi atas dan bawah pita. Kemudian dilakukan elektroelusi menggunakan alat elektroforesis horizontal apparatus, dengan larutan penyangga elektroforesis running buffer, aliran listrik 125 volt selama 2 jam. Hasil elektroelusi dilakukan dialisis dengan larutan PBS selama 2x24 jam, larutan diganti setiap 24 jam. Eluat di endapkan dengan larutan etanol absolut dingin semalam, sehingga diperoleh endapan protein murni yang siap digunakan untuk uji. Sebelum digunakan untuk uji dilakukan penghitungan konsentrasi protein menggunakan spectrophotometer nanodrop

Efek toksisitas sistemik.

Untuk mengevaluasi efek toksik sistemik protein adhesi pili *E. coli* BM 32.2 kDa, ditempuh langkah langkah sebagai berikut: 16 tikus dewasa dibagi menjadi dua kelompok (kontrol dan diperlakukan). Toksisitas sistemik dilakukan dengan memberikan injeksi intravena 0,1 ml protein adhesi pili *E. coli* BM 32.2 kDa dengan dosis 50 µg/ml per hari selama 5 hari. Tikus kontrol di beri

0,1 ml buffer fosfat. Untuk mengevaluasi efek toksik sistemik dengan mengukur sel darah putih, sel darah merah, monosit, lekosit, netrofil, eosinofil. Limfosit, Haemoglobin. Pemeriksaan darah menggunakan metode *photometric method Mindray BA 88*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1: Parameter Darah pada Mencit yang diberi 50 µg / ml protein pili E. coli BM 32.2 kDa secara intravena selama 5 hari.

No	Parameter	Kontrol	Perlakuan
1	WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	4.08	4.81
2	LYMPH (%)	74.75	73.96
3	MONO (%)	1.8	1.9
4	GRAN (%)	7.62	6.87
5	RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	6.79	6.67
6	HGB (g/dl)	13.06	12.8

Hasil analisis data menggunakan uji t didapat ada perbedaan jumlah WBC pada mencit perlakuan dibanding control ($p=0.011$). Jumlah limfosit antara mencit perlakuan dan mencit control tidak ada perbedaan ($p= 0.210$). Jumlah Sel darah Merah antara mencit perlakuan dan mencit control tidak ada perbedaan ($p=0.66$). Kadar Haemoglobin mencit perlakuan tidak berbeda dengan mencit control ($p=0.76$). Jumlah Monosit mencit perlakuan tidak berbeda dengan mencit control ($p= 0.05$). Jumlah Granulosit mencit perlakuan tidak berbeda dengan mencit control ($p=0.170$).

PEMBAHASAN

Mencit memiliki kisaran jumlah leukosit 4-12 ribu/ mm^3 dengan rata rata 8 ribu/ mm^3 (Arrington, 1972). Pada penelitian ini walaupun ada perbedaan jumlah WBC antara control dan perlakuan tetapi nilai tersebut masih dalam batas jumlah WBC normal. Kadar rata rata Haemoglobin Mencit adalah 14.8 gr/dl. Hasil penelitian ini tidak ada perbedaan kadar Hb antara mencit control dan perlakuan dan masih dalam batas rata rata kadar Hb mencit normal. Jumlah RBC mencit berkisar 6.86-11.7 juta/ mm^3 Hasil penelitian ini baik pada mencit perlakuan maupun pada mencit control jumlah RBC berada pada kisaran normal. Jumlah limfosit pada mencit normal adalah 8.7 -12.4 ribu/ mm^3 . Pada penelitian ini tidak ada perbedaan jumlah limfosit antara mencit perlakuan dan mencit control. Dan ke dua kelompok mencit tersebut masih dalam batas normal.

KESIMPULAN

Protein Pili E. coli BM 32.2 kDa tidak toksik terhadap parameter darah mencit.

DAFTAR PUSTAKA

- Aranha, C., Gupta, S. dan Reddy, K. V. R. 2004. Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide Nisin: in vitro and in vivo studies, *Contraception*, 69 (4): 333–338.
- Arrington, L. R. 1972. Introductory Laboratory Animal. The Breeding, Care and Management of Experimental Animal Science. The Interstate Printers and Publishing., New York.
- Digenis, G.A., Nosek, D., Mohammadi, F., Darwazeh, N.B., Anwar, H.S. dan Zavos, P.M. 1999, Novel vaginal controlled-delivery systems incorporating co precipitates of nonoxynol-9. *Pharm Dev Technol*, 4: 421-430.

- Diemer, T., Weidner, W., Michelmann, H.W., Schiefer, H.G., Rován, E. dan Mayer, F., 1996. Influence of on motility parameters of human spermatozoa in vitro. *Int J Androl*, 19 (5): 271-277.
- Gupta, S dan Prabha, V., 2012. Human Sperm Interaction with *Staphylococcus aureus*: A molecular Approach, *Journal of Pathogens*; 1-7
- Kobayashi, H., Sekizawa Y., Aizu, M., dan Umeda, M., 2000, Lethal and non lethal responses of spermatozoa from a wide variety of vertebrates to Lysenin, a protein from the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*, *J Exp Zool*, 286:286-549
- Reddy, K.V.R., Aranha, C., Gupta, S.M. and Yedery, R.D. 2004, Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: in vitro and in vivo studies, *Reproduct*, 128: 117-126.
- Sutyak, K.E., Anderson, R.A., Dover, S.E., Feathergill, K.A., Aroutcheva, A.A., Faro, S. dan Chikindas, M.L. 2008, Spermicidal activity of the safe natural antimicrobial peptide subtilisin. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 1-6
- Zairi, A., Tangy, F., Saadi, S. dan K. Hani. 2008, In vitro activity of dermaseptin S4 derivatives against genital infections pathogens, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50(3):353-358