

ISOLASI DAN KARAKTERISASI HEMAGLUTININ *Staphylococcus aureus* PENYEBAB MASTITIS SUBKLINIS PADA SAPI PERAH

Isolation and Characterization Haemagglutinin of Staphylococcus aureus on Subclinical Mastitis in Dairy Cows

Mahdi Abrar¹, I Wayan Teguh Wibawan², Bambang Pontjo Priosoeryanto³, Mirnawati Soedarwanto⁴, dan Fachriyan Hasymi Pasaribu⁵

¹Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

³Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

⁴Laboratorium Kesmavet Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

⁵Laboratorium Bakteriologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

E-mail: kedokteranhewan61@yahoo.com

ABSTRAK

Dalam penelitian ini isolasi dan karakterisasi hemagglutinin *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan teknik afinitas kromatografi. Karakterisasi hemagglutinin yang dihasilkan dilanjutkan dengan teknik elektroforesis menggunakan metode *sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dan dilanjutkan untuk melihat pengaruh suhu dan enzim terhadap aktivitas hemagglutinin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa komponen hemagglutinin *Staphylococcus aureus* yang telah diisolasi memiliki berat molekul 46 kDa. Aktivitas *Staphylococcus aureus* dalam meghemaglutinasi hilang pada pemanasan 60° C dan pengaruh enzim proteolitik. Hasil ini mengindikasikan bahwa hemagglutinin *Staphylococcus aureus* adalah protein.

Kata kunci: hemagglutinin, mastitis subklinis, adhesi, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Haemagglutinin of Staphylococcus aureus was isolated with affinity chromatography technique and characterized with sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis (SDS-PAGE). The isolated haemagglutinin consist of one protein band with molecular weight of 46 kDa. The haemagglutination activities was affected by heat and by proteolytic enzyme treatments. This indicated that haemagglutinin of Staphylococcus aureus appear to be a protein.

Key words: haemagglutinin, subclinical mastitis, adhesi, *Staphylococcus aureus*

PENDAHULUAN

Penyakit radang ambing yang dikenal sebagai mastitis masih tetap merupakan masalah utama dalam peternakan sapi perah karena menyebabkan kerugian yang cukup besar sehubungan dengan penurunan produksi, kualitas, dan penyingkiran susu, biaya perawatan dan pengobatan yang cukup tinggi, serta pengafkiran ternak lebih awal. Insidensi mastitis pada sapi perah di Indonesia sangat tinggi (85%) dan sebagian besar merupakan infeksi yang bersifat subklinis. Penyebab mastitis subklinis yang paling sering terdeteksi adalah *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) dan beberapa jenis bakteri lain seperti *Streptococcus agalactiae* dan *Eschericia coli* (Wibawan *et al.*, 1997).

Mastitis yang disebabkan oleh *Staphylococcus* merupakan bentuk mastitis terpenting pada peternakan sapi perah karena mikroorganisme ini terdapat dimana-mana seperti pada kulit sapi, ambing yang sakit maupun yang sehat, lingkungan, pemerah, peralatan yang digunakan, air, dan udara. Infeksi *S. aureus* semakin sulit ditangani dengan antibiotik karena bakteri ini banyak yang resisten terhadap berbagai jenis antibiotik. Di samping itu, pemakaian antibiotik akan menimbulkan masalah baru yakni adanya residu antibiotik di dalam susu atau pada olahannya (Sudarwanto *et al.*, 1992).

Untuk menghindari hal-hal tersebut, strategi baru harus segera diupayakan. Salah satu pendekatan pemecahan masalah di atas adalah mempelajari faktor-faktor virulen lainnya yang paling bertanggung jawab terhadap patogenitas mikroba terutama dalam proses adhesi. Hemagglutinin merupakan salah satu komponen adhesin bakteri yang memperantarai perlekatan sel bakteri pada sel darah merah. Hubungan antara sifat hemagglutinin dan kemampuan bakteri untuk melekat pada sel inang telah diteliti pada berbagai spesies bakteri. Bakteri yang memiliki hemagglutinin dapat lebih mudah menempel pada permukaan mukosa. Hal ini telah dibuktikan pada beberapa spesies bakteri seperti *Streptococcus* Group B (SGB), *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* (Beuth *et al.*, 1988; Gatermann *et al.*, 1992; Rupp *et al.*, 1995; Wahyuni, 1998).

Keberadaan hemagglutinin pada *S. aureus* diduga akan mempermudah bakteri ini untuk melakukan adhesi pada sel ambing. Berdasarkan fenomena ini maka dalam mempelajari patogenesis mastitis subklinis faktor virulen ini harus dipertimbangkan. Dalam penelitian ini akan dilakukan isolasi dan karakterisasi dari hemagglutinin *S. aureus*. Dari penelitian ini diharapkan dapat diperoleh adhesin hemagglutinin yang berperan dalam proses adhesi, mempunyai sifat imunogenitas yang tinggi serta dapat menginduksi

protective immun response sehingga dapat digunakan sebagai landasan dalam pengembangan vaksin untuk pencegahan mastitis subklinis pada sapi perah.

MATERI DAN METODE

Isolat Bakteri

Isolat *S. aureus* yang digunakan diperoleh dari kasus mastitis subklinis (*screening* mastitis subklinis dengan menggunakan metoda IPB 1, Sudarwanto, 1998) di Pulau Jawa (Jawa Barat, Jawa Tengah, dan Jawa Timur). Hasil pengujian kemampuan hemaglutinasi terpilih 2 isolat yaitu 101 positif hemaglutinasi dan 3T1 negatif hemaglutinasi. Kedua isolat ini akan digunakan dalam penelitian baik untuk isolasi dan karakterisasi hemaglutinasi maupun untuk pengujian kapasitas adhesi pada sel epitel ambing sapi perah (Abrar, 2001).

Aktivitas Biologi Hemaglutinin

Untuk mempelajari aktivitas biologis hemaglutinin *S. aureus* dilakukan dalam beberapa uji. Uji-uji tersebut terdiri atas uji kemampuan perlekatan bakteri pada epitel ambing sapi perah secara *in vitro*, peran antibodi hemaglutinin sebagai anti adhesin dalam uji hambat adhesi, dan uji respons fagositosis.

Pembuatan Biakan Sel Epitel Ambing Sapi

Sebanyak 40 ml susu sapi diperah dengan tangan secara aseptis langsung ke dalam tabung sentrifus plastik steril berukuran 50 ml (Corning, USA) yang sebelumnya telah diisi 10 ml media transpor *dulbecco's modified eage's medium* (DMEM) (Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Scotland), 10% Na, bikarbonat (Gibco); 0,1% *fungizone* (Gibco), dan 0,1% gentamisin (Gibco). Sampel susu diambil sebanyak 18 tabung.

Pemisahan sel epitel dari susu dilakukan dengan sentrifugasi pada suhu 4° C, 100 rpm selama 10 menit. Pelet yang terbentuk dicuci dengan DMEM sebanyak tiga kali. Pelet sel dihitung menggunakan hemositometer Neubaur, kemudian ditumbuhkan dalam *tissue culture flask* (Costar Cambridge, MA, USA) berukuran luas 25 cm² dengan kepadatan 5x10⁵ sel/ml dalam medium DME yang disuplementasi dengan 30% *fetal calf serum* (FCS, Flow Laboratories); 0,1% gentamisin, dan 0,1% *fungizone*. Sel tersebut diinkubasi pada suhu 37° C, dalam inkubator CO₂ (Jouan, France). Pola pertumbuhan sel, koloni, serta morfologinya diamati setiap hari menggunakan mikroskop fase kontras (Zeiss, Germany).

Setelah pertumbuhan sel sempurna membentuk lapisan epitel yang menutupi seluruh permukaan *flask* (konfluen), dilakukan subkultur (pasase) dengan cara tripsinasi menggunakan 0,1% tripsin (1:250)-EDTA (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA). Setelah dilakukan 3 kali pasase sel-sel tersebut akan dijadikan donor untuk uji adhesi dan uji hambat adhesi.

Isolasi Hemaglutinin

Preparasi antibodi spesifik hemaglutinin

Preparasi antibodi spesifik terhadap hemaglutinin diperoleh dengan cara menyuntikkan secara intra vena

hemaglutinin yang telah terikat pada sel darah merah ayam ke individu ayam yang sama (3x/minggu, selama 3 minggu berturut-turut). Hemaglutinin diperoleh dengan cara mencampur sebanyak 2 ml suspensi bakteri yang positif pada uji hemaglutinasi dengan 2 ml *sodium dodecyl sulphat* (SDS) 2%, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 1 jam, suspensi kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh didialisis terhadap akuades selama 3 hari pada suhu 4° C. Suspensi hemaglutinin ini dicampurkan dengan suspensi sel darah merah 2% (1:1). Kemudian preparasi diinkubasikan pada suhu kamar selama 1 jam untuk memberi kesempatan pengikatan hemaglutinin oleh sel darah merah. Suspensi disentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan sedimen disuspensikan dalam 5 ml *phosphate buffer saline* (PBS). Suspensi siap dipergunakan sebagai antigen. Serum dipanen setelah 1 minggu penyuntikkan terakhir dan spesifitas antibodi diuji dengan imundifusi *agar gel presipitation* (AGP).

Agar gel precipitation test (AGPT)/imunodifusi ganda

Untuk membuat media agar, ke dalam sebuah tabung Erlenmeyer dicampur 0,4 g *agarose* (Serva, Heidelberg, Jerman) dan 1,2 g *polyethylene glycol* (PEG 6000, Serva) yang kemudian dilarutkan dalam 20 ml akuades dan 20 ml PBS 0,5 ml; pH 7,2. Suspensi ini ditangas pada air mendidih sehingga campuran ini larut secara sempurna. Setelah larut, campuran tersebut diturunkan dari penangas sampai suhu agak dingin. Dengan menggunakan pipet ukur 10 ml, agar cair dituangkan pada 6 buah gelas objek yang telah diatur pada rak untuk AGP dan ditunggu sampai mengeras. Pada agar ini dibuat sumur-sumur untuk antigen dan antiserum homolognya dengan menggunakan *gel puncter*. Ke dalam bagian tengah sumur tersebut diisikan antiserum, sedangkan antigen-antigen yang diuji dimasukkan pada sumur-sumur yang mengelilinginya. Rak yang berisi gelas objek kemudian ditaruh pada tempat yang telah diberi kertas saring basah untuk menjaga kelembabannya. Reaksi ini dibaca setelah 18-48 jam dengan melihat garis presipitasi pada daerah antigen dan antiserum yang homolog. Preparasi antigen dilakukan dengan menggunakan ekstraksi *autoclaf* (Rantz dan Randall, 1955). Bakteri ditumbuhkan dalam 50 ml *todd hewn broth* (THB) (Gibco, Karlsruhe, Jerman) dalam inkubator pada suhu 37° C selama 18-24 jam, kemudian disentrifus 15.000 rpm selama 10 menit. Pelet dicuci sebanyak dua kali dengan 5 ml NaCl 0,14 M. Pelet yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan 0,35 ml NaCl 0,14 M, dihomogenkan dan dinetralkan dengan menggunakan NaOH 0,1 N hingga suspensi berwarna merah jambu/merah. Suspensi selanjutnya diautoclaf selama 15 menit pada 120° C, disentrifus selama 10 menit, 15.000 rpm dan supernatan yang dihasilkan digunakan sebagai antigen.

Uji Adhesi

Sebanyak 1 ml suspensi bakteri *S. aureus* baik yang positif hemaglutinin maupun yang negatif (mengandung

10^8 sel bakteri) disuspensikan dengan *fluorescen isothiosianat* (FITC) dan diinkubasikan pada suhu ruangan selama 60 menit. *Fluorescen isothiosianat* yang tidak terikat dicuci dengan menggunakan *minimum essential medium* (MEM) sebanyak 2-3 kali. Bakteri yang telah terlabel oleh FITC disuspensikan dengan sel epitel ambing sapi perah dengan konsentrasi 10^5 sel/ml dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 60 menit. Bakteri yang tidak menempel pada sel epitel dicuci dengan MEM sebanyak 2-3 kali. Kemampuan adhesi ditentukan dengan menghitung jumlah bakteri yang menempel pada 20 sel epitel. Penghitungan dilakukan di bawah mikroskop fluoresen (Valentin-Weigand *et al.*, 1988).

Uji Hambat Adhesi

Untuk mengukur kemampuan adhesi protein, dilakukan uji hambatan adhesi. Prinsip uji hambatan adhesi adalah pemberian antibodi pada antigen sebelum dilakukan uji adhesi. Tujuan uji ini untuk melihat kemampuan antibodi dalam menghambat proses adhesi bakteri pada sel.

Untuk uji hambat adhesi ini sebanyak 0,5 ml sel bakteri (10^8 sel/ml) yang telah terlabel FITC diinkubasikan terlebih dahulu dengan 100 μl antiserum spesifik terhadap hemagutinin sebelum diinkubasikan dengan sel epitel ambing. Penentuan jumlah adhesi bakteri dihitung di bawah mikroskop fluoresen seperti yang dilakukan pada uji adhesi di atas.

Isolasi Hemaglutinin dengan Teknik Afinitas Kromatografi

Untuk melakukan isolasi hemaglutinin perlu dibuat matriks afinitas kromatografi. Matriks afinitas kromatografi dibuat dengan pengaktifan kertas nitroselulosa dengan menggunakan antibodi spesifik terhadap hemaglutinin. Kertas nitroselulosa (8x8 cm) dimasukkan ke dalam gelas ukur yang telah diisi dengan 100 ml PBS dan ditambahkan *cyanogen bromide* (CN-Br). Selama kertas nitroselulosa direndam, dengan menggunakan pH meter, pH dijaga antara 11-15 dengan cara menambahkan NaOH pekat selama kurang lebih 45 menit. Kertas kemudian dicuci 8-10 kali menggunakan akuades. Kertas nitroselulosa kemudian dimasukkan ke dalam gelas ukur dan ditetesi antibodi spesifik hemaglutinin sebanyak 5 ml kemudian diinkubasikan pada suhu 4°C selama 24 jam. Matriks ini siap untuk mengisolasi hemaglutinin. Ekstrak hemagutinin dibuat dari *S. aureus* yang menunjukkan reaksi hemaglutinin positif. Bakteri ditumbuhkan dalam 500 ml THB selama 18 jam pada suhu 37°C , disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit dan dicuci sebanyak tiga kali. Suspensi bakteri yang didapat diencerkan menjadi 5 ml dengan menambahkan PBS. Suspensi ini ditambah dengan lisozim sebanyak 200 μl lalu diinkubasikan pada suhu ruangan selama 60 menit. Kemudian suspensi tersebut disentrifus dan diambil supernatannya. Supernatan diinkubasikan pada matriks dalam suhu 4°C selama 24 jam. Ikatan yang spesifik antara matriks dengan

hemaglutinin dielusi dengan menggunakan larutan Tris-HCl 0,05 M sebanyak 3- 4 ml pada pH 2,5. Eluat yang diperoleh dipekatkan dan dilakukan karakterisasi proteinnya.

Uji Immunoblotting

Isolat bakteri 101 dan 3T1 ditumbuhkan dalam media THB selama 18-24 jam. Kemudian isolat tersebut disentrifus 300 rpm selama 10 menit. Supernatannya dibuang, sedang pelet yang didapat dicuci dengan larutan PBS. Hal ini diulangi hingga 2 kali. Pelet kemudian ditambah dengan 1 ml PBS dan dihomogenkan. Setelah homogen, suspensi siap untuk digunakan. Kertas nitroselulosa yang telah dibentuk lajur-lajur sesuai pengenceran serum ditetesi dengan antigen 101 dan 3T1 dan dikeringkan dengan pengering rambut. Kertas kemudian direndam dalam susu skim yang telah diencerkan sebanyak 10 kali selama 45 menit dalam suhu ruang. Setelah itu kertas tersebut dicuci dengan larutan PBS sebanyak 2 kali dan diinkubasikan dalam serum dengan berbagai pengenceran selama 1 jam dalam suhu ruangan. Kertas kemudian dicuci lagi dengan PBS sebanyak 2 kali dan direndam dalam larutan konjugat (25 μl konjugat + 5 ml PBS) selama 1 jam. Kertas yang telah direndam kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali. Setelah dicuci kertas direndam kembali dalam larutan alfa-*chloronaphthol* (9 mg alfa-*chloronaphthol* + 3 ml metanol + 25 ml PBS) dan terakhir ditambahkan 2 ml H_2O_2 3% dan ditunggu beberapa saat sampai warna hitam muncul.

Uji Hambat Adhesi

Untuk mengukur kemampuan adhesi protein, dilakukan uji hambatan adhesi. Prinsip uji hambatan adhesi adalah pemberian antibodi pada antigen sebelum dilakukan uji adhesi. Tujuan uji ini untuk melihat kemampuan antibodi dalam menghambat proses adhesi bakteri pada sel.

Untuk uji hambat adhesi ini sebanyak 0,5 ml sel bakteri (10^8 sel/ml) yang telah terlabel FITC diinkubasikan terlebih dahulu dengan 100 μl antiserum spesifik terhadap hemagutinin sebelum diinkubasikan dengan sel epitel ambing. Penentuan jumlah adhesi bakteri dihitung di bawah mikroskop fluoresen seperti yang dilakukan pada uji adhesi di atas.

Karakterisasi Hemaglutinin

Karakterisasi hemaglutinin dilakukan secara imunologik dengan teknik SDS-PAGE (Towbin *et al.*, 1979; Henkeshoven *et al.*, 1985). Berat molekul hemaglutinin yang telah diisolasi ditentukan dengan menggunakan teknik elektroforesis gel poliakrilamid konsentrasi 11%, dengan komposisi sebagai berikut: Gel pemisah dimasukkan (kurang lebih 4 ml atau 1 cm di bawah sisir) ke dalam kaca yang telah dipasang sebelumnya. Setelah gel pemisah membeku, gel pengumpul dimasukkan dengan bantuan sisir untuk membuat sumur-sumur tempat memasukkan contoh yang akan dipisahkan. Setelah gel pengumpul membeku,

sisir diangkat. Sebanyak 25 μ l hemagglutinin yang telah diisolasi dicampur dengan 5 μ l buffer sampel (tris-HCl 1 mol/l pH 6,8; SDS 2%; gliserol 10%; 2-merkaptotetanol 0,05%; bromofenol 0,002%), kemudian dimasukkan ke dalam sumur penampung pada gel kemudian dilakukan pada tegangan 80 volt selama 45-50 menit. Setelah sampel mencapai batas bawah gel, gel dilepaskan dari cetaknya untuk dilakukan pewarnaan. Pewarnaan dengan *commasie blue* dilakukan selama 30 menit setelah itu gel dipucatkan dengan larutan pemucat (10 ml metanol, 10 ml asam asetat, dan 80 ml akuades).

Karakterisasi Sifat-sifat Fisikokimia Hemagglutinin

Dalam uji stabilitas terhadap pemanasan dan suhu, hemagglutinin diberi perlakuan:

1. Dipanaskan 45° C selama 30 menit dalam *waterbath*.
2. Dipanaskan 60° C selama 30 menit dalam *waterbath*.

Pengaruh Enzim terhadap Aktivitas Hemagglutinin

Untuk mengetahui sifat kimia hemagglutinin maka dilakukan perlakuan pengaruh enzim terhadap aktivitas hemagglutinin. Setelah diekspos dengan enzim, substansi kemudian diuji aktivitas hemagglutinasi. Enzim yang digunakan adalah enzim proteolitik pronase, protease, dan enzim aminoglukosidase. Sebanyak 1 ml suspensi yang dilarutkan dengan buffer fosfat 0,1 M ditambah masing-masing dengan 1 mg/ml enzim (papain, pronase, bromelain dan aminoglukosidase) dan pH disesuaikan menjadi 7. Selanjutnya sampel diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37° C dan diuji aktivitas hemagglutinasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberadaan hemagglutinin pada permukaan sel bakteri yang diisolasi dari sapi penderita mastitis subklinis *S. aureus* diyakini sebagai salah satu komponen yang paling bertanggung jawab terhadap sifat adhesif bakteri pada permukaan sel epitel ambing. Di samping itu, sifat hidrofobik bakteri tersebut, sebagai cerminan keberadaan antigen protein di permukaan selnya merupakan ciri khas bakteri yang diisolasi dari kasus mastitis (Abrar, 2001).

Dari penelitian ini dapat dinyatakan bahwa hemagglutinin dapat digunakan sebagai indikator atau ciri biovar *S. aureus* yang diisolasi dari sapi perah penderita mastitis subklinis. Pada kasus mastitis subklinis kemampuan adhesif bakteri jauh lebih

diperlukan daripada sifat invasif.

Pada bakteri lain, hemagglutinin telah diketahui sebagai salah satu faktor yang bertanggung jawab terhadap sifat adhesivitas bakteri pada permukaan sel inang. Pada kasus mastitis sifat adhesivitas sangat dibutuhkan bakteri agar bakteri tidak mudah terbawa oleh susu pada saat pemerahan. Dihubungkan dengan keberadaan hemagglutinin yang tinggi pada isolat *S. aureus* asal sapi, pada penelitian ini memberi indikasi bahwa hemagglutinin berperan pula dalam proses adhesi bakteri pada sel epitel ambing sedangkan hemagglutinin dari *S. saprophyticus* mempunyai peran yang penting dalam proses adhesi dan kolonisasi pada sel ginjal pada hewan coba (Gunnarson *et al.*, 1994).

Untuk mengisolasi hemagglutinin dengan teknik kromatografi, serum spesifik terhadap hemagglutinin diperoleh dengan cara menyuntik ayam dengan hemagglutinin yang telah ditempelkan pada permukaan eritrosit ayam itu sendiri. Ayam akan membentuk antibodi spesifik hanya terhadap hemagglutinin yang menempel pada permukaan eritrosit tetapi tidak terhadap eritrositnya sendiri. Serum yang dipanen menunjukkan reaksi spesifik terhadap ekstrak bakteri yang memiliki hemagglutinin pada uji imunodifusi seperti yang disajikan pada Gambar 1.

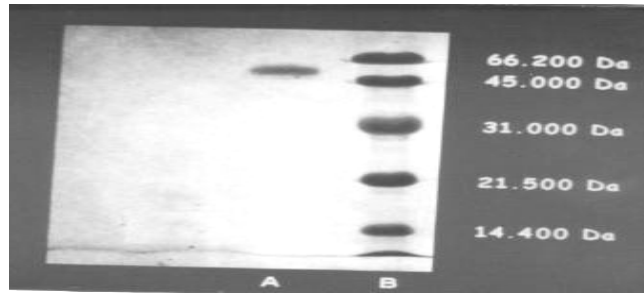
Serum spesifik terhadap hemagglutinin ini digunakan untuk mengaktifkan membran nitrocelulose yang sebelumnya telah diaktifkan dengan Bromsian (Br-CN). Matriks ini selanjutnya digunakan untuk mengisolasi hemagglutinin dari permukaan sel bakteri yang memiliki hemagglutinin. Hemagglutinin yang telah diisolasi ternyata bereaksi spesifik dengan antiserum hemagglutinin pada imunodifusi.

Dengan teknik afinitas kromatografi dapat diisolasi komponen dari hemagglutinin tersebut. Pemisahan komponen hemagglutinin *S. aureus* dengan teknik elektroforesis menunjukkan sebuah pita protein dengan berat molekul 50 kDa seperti yang disajikan pada Gambar 2.

Hal yang sama juga dijumpai pada hemagglutinin *S. saprophyticus* yang telah didapat ternyata juga suatu protein dengan berat molekul 160 kDa (Gunnarson *et al.*, 1994). Namun demikian tidak semua hemagglutinin dari tiap-tiap bakteri itu merupakan protein. Menurut Rupp *et al.* (1995) hemagglutinin dari *S. epidermidis* merupakan polisakarida yang komposisinya berbeda dengan adhesin yang lain dari bakteri tersebut.



Gambar 1. Reaksi imunodifusi. Garis presipitasi terlihat pada daerah antibodi spesifik hemagglutinin *S. aureus* (A) dan antigen *S. aureus* (B).



Gambar 2. Hasil uji kemurnian hemagglutinin dengan elektroforesis SDS-PAGE (A= hemagglutinin; B= marker)

Hemagglutinin yang telah diisolasi tersebut dikarakterisasi aktivitas hemaglutinasinya dengan melihat kemampuannya terhadap pengaruh suhu dan enzim. Kemampuan hemagglutinin bakteri *S. aureus* untuk mengaglutinasi eritrosit ternyata hilang setelah dipanaskan pada suhu 60° C selama 30 menit atau setelah diinkubasi dengan enzim pronase. Fenomena ini menunjukkan bahwa hemagglutinin pada *S. aureus* adalah protein. Hasil ini meneguhkan pendapat sebelumnya yang menyatakan bahwa hemagglutinin yang diisolasi dari *S. agalactiae* memiliki sifat-sifat protein (Wahyuni, 1998). Berbeda dengan hemagglutinin *E. coli* masih tetap menunjukkan aktivitasnya walaupun sebelumnya telah dipanaskan 60° C selama 30 menit atau diinkubasikan dengan pronase. Hal ini menunjukkan bahwa hemagglutinin *E. coli* memiliki natur yang bukan protein.

Aktivitas biologi hemagglutinin diamati berdasarkan kemampuan adhesi pada permukaan sel epitel ambing, respons fagositosis dan uji patogenitas. Sifat adhesif bakteri pada sel epitel ambing, dipelajari dengan menggunakan 2 isolat bakteri, yakni satu isolat memiliki hemagutinin (SA 101) dan satu isolat tidak memiliki hemagglutinin. Berdasarkan uji T tampak bahwa banyaknya sel epitel pada hemagglutinin positif berbeda sangat nyata dengan banyaknya sel epitel pada hemagglutinin negatif (p=0,0001). Bakteri yang memiliki hemagglutinin menunjukkan kemampuan adhesi yang jauh lebih baik dibandingkan dengan bakteri yang tidak memiliki hemagglutinin seperti yang disajikan pada Tabel 1.

Untuk mengetahui fungsi hemagglutinin dalam proses adhesi dilakukan uji hambat adhesi dengan menggunakan ekstrak hemagglutinin. Sel epitel ambing dipreinkubasikan dengan ekstrak hemagglutinin sebelum diinkubasikan dengan bakteri yang memiliki hemagglutinin. Ternyata hambatan adhesi dapat ditampilkan dengan jelas. Preinkubasi bakteri-bakteri yang memiliki hemagglutinin *S. aureus* dengan antiserum hemagglutinin yang homolog mampu menurunkan nilai adhesi pada permukaan sel (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa hemagglutinin sebagai adhesin mampu dihambat aktivitasnya secara

spesifik oleh antiserum yang homolog. Hal yang serupa terjadi pula pada *S. agalactiae*, bakteri yang diisolasi dari sapi sebagian besar menunjukkan aktivitas hemaglutinasi (Wahyuni, 1996) tetapi tidak atau hanya sebagian kecil bakteri yang diisolasi dari manusia menunjukkan aktivitas ini (Kurl *et al.*, 1989). Dari pengamatan ini dapat dikatakan bahwa hemagglutinin merupakan tanda (*marker*) bagi bakteri yang sangat mengandalkan kemampuan adhesi dalam mempertahankan hidupnya.

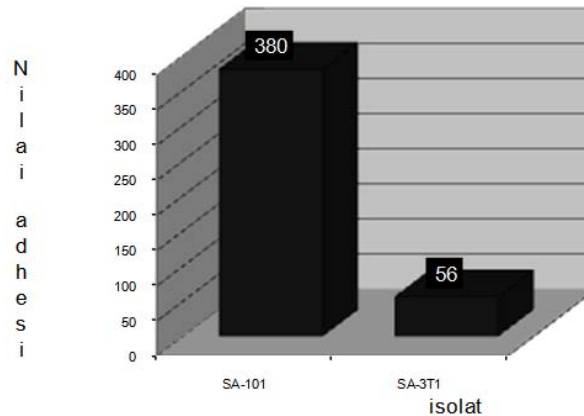
Kemampuan sifat adhesif bakteri pada sel epitel ambing dipelajari dengan menggunakan 2 isolat bakteri, yakni satu isolat memiliki hemagutinin (SA 101) dan satu isolat tidak memiliki hemagglutinin (SA 3T1). Berdasarkan uji T tampak bahwa banyaknya sel epitel pada hemagglutinin positif berbeda sangat nyata dengan banyaknya sel epitel pada hemagglutinin negatif (p=0,0001). Bakteri yang memiliki hemagglutinin menunjukkan kemampuan adhesi yang jauh lebih baik dibandingkan dengan bakteri yang tidak memiliki hemagglutinin seperti yang disajikan pada Gambar 3.

Dari Gambar 3 dapat ditunjukkan bahwa bakteri yang memiliki hemagglutinin memiliki kemampuan adhesi yang sangat tinggi sedangkan pada bakteri yang tidak memiliki hemagglutinin tidak dijumpai kemampuan adhesi pada sel epitel ambing. Pada jenis bakteri lain, hemagglutinin diketahui sebagai salah satu faktor yang bertanggung jawab terhadap sifat adhesivitas bakteri ke permukaan sel inang. Dihubungkan dengan keberadaan hemagglutinin yang tinggi pada isolat *S. aureus* asal sapi, pada penelitian ini memberikan indikasi bahwa hemagglutinin berperan pula dalam proses adhesi bakteri ke permukaan sel epitel ambing.

Untuk mengetahui fungsi hemagglutinin dalam proses adhesi dilakukan uji hambat adhesi dengan menggunakan ekstrak hemagglutinin. Sel epitel ambing dipreinkubasikan dengan ekstrak hemagglutinin sebelum diinkubasikan dengan bakteri yang memiliki hemagglutinin. Ternyata hambatan adhesi dapat ditampilkan dengan jelas, hal ini menunjukkan peran

Tabel 1. Uji hambat adhesi bakteri *S. aureus* dengan menggunakan serum spesifik terhadap hemagglutinin

Bakteri	Serum (µl)	Nilai adhesi
	-	355
<i>S. aureus</i> 101	100	260
	500	53



Gambar 3. Hubungan antara keberadaan hemaglutinin pada *S. aureus* dengan nilai adhesi pada permukaan sel epitel ambing

hemaglutinin dalam proses adhesi perlu diperhitungkan. Uji hambat adhesi bakteri *S. aureus* dengan menggunakan serum spesifik terhadap hemaglutinin menunjukkan penurunan kemampuan adhesi seperti yang disajikan pada Tabel 1. Pada penelitian ini mengindikasikan bahwa antibodi spesifik dapat mencegah adhesi *S. aureus* pada sel epitel ambing.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa hemaglutinin *S. aureus* dapat ditentukan dengan uji hemaglutinasi. Dengan teknik afinitas kromatografi dapat diisolasi hemaglutinin dari *S. aureus* dengan SDS-PAGE diketahui 1 pita protein dengan berat molekul 46 kDa. Kemampuan hemaglutinasi hemglutinin *S. aureus* hilang pada temperatur 60° C dan pengaruh aktivitas enzim pronase.

DAFTAR PUSTAKA

- Abrar, M. 2001. Distribusi Hemaglutinin pada *Staphylococcus aureus* Asal Sapi Mastitis Subklinis. **Disertasi**. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Abrar, M, dan Suwendra. 2000. Distribusi Hemaglutinin *S. aureus* isolat asal sapi dan manusia. **Prosiding Seminar Nasional VI Perhimpunan Alumni dari Jepang (Persada)**. Bogor.
- Abrar, M. dan Amelia. 2000. Distribusi hemaglutinin pada *Escherichia coli* isolat asal feses sapi dan babi serta perannya dalam adhesi. **Prosiding Seminar Nasional VI Perhimpunan Alumni dari Jepang (Persada)**. Bogor
- Beuth, J., H.I. Ko, F.S. Perdreu, G. Peters, P. Heczko, and G. Pulveer. 1988. Hemagglutination by *Staphylococcus saprophyticus* and other coagulase-negative Staphylococci. **Microbiol. Path.** 4:379-383.
- Gatermann, S. H., G. W. Meyer, and G. Wanner. 1992. *Staphylococcus saprophyticus* hemagglutinin is a 160-kilodalton surface polypeptide. **Infect. Immun.** 60:4127-4132.
- Gunnarson, A., P.A. Mardh, A. Lunbald, and S. Svensson. 1994. Oligosaccharide structures mediating agglutination of sheep erythrocyte by *Staphylococcus saprophyticus*. **Infect. Immun.** 45:41-46.
- Rupp, M. E., N. Slood, H.G.W. Meyer, J. Han, and S. Gatermann. 1995. Characterization of the hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis*. **J. Infect. Dis.** 172:1509-1518.
- Sudarwanto, M., A.W. Sanjaya, dan T. Purnawarman. 1992. Residu Antibiotik dalam Susu Pasteurisasi Ditinjau dari Segi Kesehatan Masyarakat Veteriner. **Laporan Penelitian**. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Valentine-Weigand, P., G. S. Chhatwall, and H. Blobel. 1988. Adherence of streptococcal isolates from cattle and horses to their respective host epithelial cells. **Am. J. Vet. Res.** 49:1485-1488.
- Wahyuni, A.E.T.H. 1998. Peran Hemaglutinin *Streptococcus agalactiae* dalam Proses Adhesi pada Sel Epitel Ambing Sapi. **Tesis**. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wibawan, I.W.T., Ch. Lämmler, and F.H. Pasaribu. 1997. Role of hydrophobic surface proteins in mediating adherence of group B streptococci to epithelial cells. **J. Gen Microbiol.** 138:1237-1242.