

# TOKSISITAS ADHESIN PILI *ESCHERICHIA COLI* ISOLAT SEMEN PRIA INFERTIL BM 32.2 KDa TERHADAP KADAR MALONDIALDEHID SPERMATOZOA MARMUT.

Oleh:  
Sukarjati  
Program Studi Biologi, FMIPA  
Universitas PGRI Adi Buana Surabaya

Protein hemagglutinin pili *E. coli* isolat semen pria infertil BM 32.2 kDa berperan sebagai adhesin pada spermatozoa. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan apakah adhesin pili *E. coli* BM 32.2 kDa bersifat toksik terhadap sperma dengan mengukur kadar Malondialdehid (MDA) yang merupakan indikator kerusakan membran plasma sperma karena oksidasi. Sampel penelitian ini adalah spermatozoa dari 15 ekor Marmut. Marmut kontrol sebanyak 5 ekor, Marmut yang diimunisasi dengan protein adhesin pili *E. coli* BM 32.2 kDa sebanyak 5 ekor, dan Marmut yang infeksi dengan *E. coli* secara transuretra sebanyak 5 ekor. Kadar MDA diukur menggunakan spektrofotometer. Hasil Penelitian ini didapat hasil bahwa ada perbedaan kadar MDA antara Marmut kelompok perlakuan (yang diimunisasi protein pili *E. coli* BM 32,2 kDa), kontrol positif (Marmut yang diinfeksi secara transuretra dengan *E. coli*) dan kontrol negatif ( $p = 0,024$ ). Dibanding dengan Marmut kontrol kadar MDA tidak berbeda ( $p = 0,251$ ) dengan Marmut yang diimunisasi dengan protein pili *E. coli* BM 32.2 kDa. Terdapat perbedaan kadar MDA antara marmut yang diinfeksi *E. coli* secara transuretra dengan marmut kontrol ( $p = 0,007$ ). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa protein adhesin pili *E. coli* BM 32.2 kDa tidak toksik terhadap kadar MDA spermatozoa Marmut.

Kata kunci: MDA, Spermatozoa Marmut, adhesin pili *E. coli* BM 32.2 kDa.

## PENDAHULUAN

Infertilitas merupakan masalah dalam perkawinan. Menurut Khanna, (1992), 10% kasus infertilitas disebabkan oleh infeksi traktus genitalis pria. Hasil survey peneliti pada klinik infertilitas di Surabaya didapat bahwa dari 1727 sampel semen yang dikultur mulai tahun 1991 sampai 1997, semen terinfeksi *S.epidermidis*, *E. aerogenes*, *S.faecalis*, *S. aureus*, *S.viridans*, *Pseudomonas*, *E. coli* dan *S.pyogenik* (Sukarjati, 1998). Hasil penelitian yang telah dilakukan didapat bahwa *E.coli* berpengaruh terhadap motilitas sperma manusia (Sukarjati, 2002), vitalitas spermatozoa manusia (Sukarjati, 2001) dan melalui uji hipoosmotik *swelling test* telah

dibuktikan *E. coli* merusak integritas membran spermatozoa manusia (Sukarjati, 2006a).

Telah dibuktikan secara *in vitro*, spermatozoa manusia yang diinkubasi dengan *E. coli* mempunyai kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang lebih tinggi dari pada sperma kontrol (Sukarjati, 2010). Kadar 8 OHdG sebagai indikator kerusakan DNA karena oksidasi didapat bahwa semen yang tercemar *E. coli* mempunyai kadar 8OHdG yang lebih tinggi dari pada kontrol (Sukarjati, 2006b). Telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi protein hemagglutinin pili *E. coli* isolat semen pria infertil. Protein hemagglutinin pili *E.coli* isolat semen pria infertil tersebut mempunyai berat molekul (BM) 32.2 kDa dan berfungsi sebagai

adhesin bagi spermatozoa manusia. Telah dibuktikan adhesin pili *E. coli* dengan BM 32.2 kDa tersebut mampu memblok/menghambat perlekatan *E. coli* ke spermatozoa manusia secara *in vitro* (Sukarjati, 2008). Telah dibuktikan bahwa adhesin pili *E. coli* dengan BM 32.2 kDa bersifat immunogenik (Sukarjati, 2011). Penelitian ini bertujuan untuk menguji toksisitas adhesin pili *E. coli* isolat semen pria infertil dengan BM 32.2 kDa terhadap kadar MDA spermatozoa marmut sebagai indikator kerusakan membran spermatozoa karena oksidasi.

## **BAHAN DAAN METODE**

### **Bahan**

Protein adhesin pili *E. coli* BM 32,2 kDa, *E. coli* isolat semen pria infertil, Marmut.

### **Metode**

#### **Dilakukan isolasi protein adhesin pili *E. coli* BM 32.2 kDa dengan langkah langkah:**

##### **a. Perbanyak *E.coli* dan Memperkaya Fimbriae (Pili).**

*E. coli* dari stock diremajakan terlebih dahulu dengan membuat kultur di medium agar Mc Conkey suhu 37<sup>0</sup> 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 TCG (Thioprolin Carbonat Glutamat) 25 ml, masing-masing 10 ml. Dilakukan inkubasi 37<sup>0</sup> C selama 48 jam. Selanjutnya

biakan *E. coli* dikumpulkan jadi satu dalam tabung Erlenmeyer 1000 ml dan disiapkan untuk dilakukan pemotongan pili.

##### **b. Pemotongan Pili**

Suspensi *E. coli* siap potong di masukkan ke dalam tabung omnimixer steril dan di set pada alat omnimixer, kemudian dilakukan pemotongan pili menggunakan alat omnimixer pada suhu 4<sup>0</sup>C, 3000 rpm selama 30 detik. Setelah di omnimixer, kemudian sampel disentrifus pada 4<sup>0</sup>C, 6000 rpm selama 15 menit. Supernatan ditampung pada tabung dan diberi label supernatan 1 (hasil potongan pertama) dan pellet disuspensi dengan PBS pH 7,4 sebanyak 1:1. Kemudian dilakukan pemotongan lagi dengan omnimixer pada 4<sup>0</sup>C, 3000 rpm selama 30 detik. Proses pemotongan ini di ulang sampai 5 kali. Selanjutnya supernatan masing masing hasil pemotongan disentrifus 12.000 rpm, 4<sup>0</sup>C selama 15 menit. Diperoleh supernatan dan pellet. Supernatan merupakan fraksi pili dan pellet adalah sel bakteri tanpa pili.

##### **c. Dialisis Fraksi Pili**

Fraksi pili yang di peroleh, dilakukan proses dialisis menggunakan larutan PBS pH 7,4 pada suhu 4<sup>0</sup>C selama 2x24 jam untuk menghilangkan sisa TCA. Selanjutnya dialisat diendapkan dengan ammonium sulfat 35 %, disentrifus 6000 rpm 4<sup>0</sup>C. Supernatan di buang, pellet disuspensi dengan PBS secukupnya dan

dilakukan dialisis kembali. Hasil dialisis merupakan protein pili.

**d. Elektroforesis dengan metode SDS PAGE untuk perbanyakkan protein adhesin, Elektroelusi, Dialisis dan Presipitasi.**

Frakasi pili dilakukan elektroforesis dengan metode SDS PAGE. Pewarnaan protein dilakukan dengan merendam gel dalam larutan 0,25 % *Comassie brilliant blue* selama 30 menit. Gel hasil SDS -PAGE 12,5 % yang terdapat pita protein dengan BM 32.2 kDa dipotong secara mendatar pada sisi atas dan bawah pita. Kemudian potongan potongan pita dikumpulkan dimasukkan membran dialisis untuk dilakukan elektroelusi menggunakan 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 protein murni BM 32.2 kDa yang siap digunakan.

**Uji Toksisitas**

a. Setelah diperoleh molekul adhesin pili *E. coli* BM 32.2 kDa, protein adhesin tersebut selanjutnya digunakan uji toksisitas. Sebelum dipergunakan Marmut di aklimatisasi terlebih dahulu selama 2 minggu. Marmut

dikelompokkan menjadi 3 kelompok dengan perlakuan sebagai berikut :

Pada Marmut perlakuan (Marmut diimunisasi dengan protein Pili *E. coli* BM 32.2kDa): Adhesin pili *E. coli* BM 32,2 kDa sejumlah 500 µg disuspensi dengan PBS 500 µl, ditambah Freund ajuvan komplet 500 µl, dicampur hingga terbentuk emulsi putih. Kemudian disuntikkan secara Sub kutan pada 5 titik, dimana bagian yang akan disuntik di disinfeksi terlebih dahulu dengan alkohol 70 %. Berselang satu minggu kemudian disuntikkan ulangan adhesin pili *E. coli* BM 32.2 kDa yang dicampur dengan Freund ajuvan inkomplit pada sub kutan di 5 titik. Penyuntikan ini dilanjutkan setiap minggu dengan cara yang sama sampai akhir minggu ke lima.

Pada Marmut kontrol negatif: hanya disuntik PBS saja.

Pada Marmut kontrol positif (Marmut diinfeksi dengan *E. coli* secara trans uretra): Marmut diinfeksi buatan secara transuretral dengan *E. coli* isolat semen pria infertil selama 3 kali selang 3 hari. Pada minggu ke lima Marmut dikorbankan, di ambil sperma epididimisnya dan dipisahkan saluran reproduksinya. Selanjutnya dilakukan pengukuran kadar MDA.

**Pengukuran Kadar MDA**

Spermatozoa dipisahkan dari proteinnya dengan penambahan asam triklor asetat 20 % sama banyak dan disentrifugasi selama 10 menit

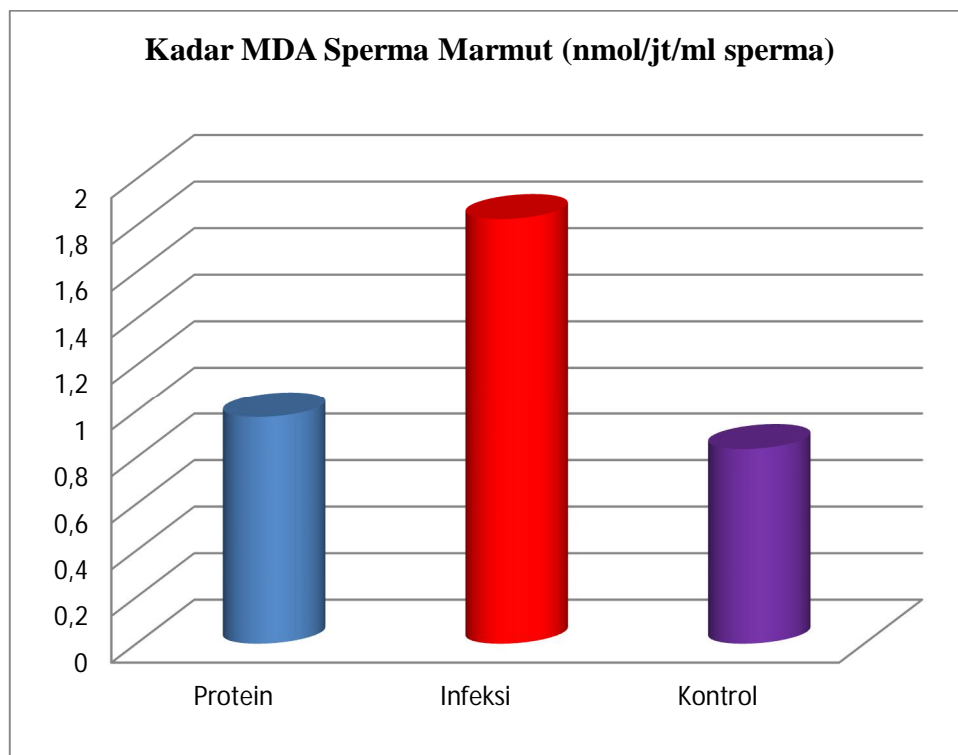
pada 5000 rpm. Sejumlah tertentu supernatan ditambahkan 0,1 ml natrium thiobarbiturat 1 % dan asam klorida 1 N sampai volume 10 ml pada labu ukur. Larutan kemudian diinkubasi di atas penangas air selama 135 menit. Larutan bewarna yang terjadi sebanyak 3 ml di amati dengan Spektrofotometer pada panjang gelombang eksitasi 532 nm.

## ANALISIS DATA

Perbedaan kadar MDA spermatozoa pada marmut yang diinfeksi *E. coli* secara trans uretra, marmut yang diimunisasi dengan protein pili *E. coli* BM 32.2 kDa serta marmut kontrol data di analisis menggunakan uji F.

## HASIL

### 1. Pengukuran kadar MDA Spermatozoa Marmut



Grafik 1.

Kadar MDA spermatozoa Marmut pada kelompok perlakuan (marmut yang diimunisasi protein pili *E. coli* BM 32,2 kDa), kontrol positif ( marmut yang diinfeksi secara transuretra dengan *E. coli*) dan kontrol negatif.

Dari hasil analisis data menggunakan uji F didapat terdapat perbedaan ( $p = 0,024$ ) kadar MDA antara marmut kelompok perlakuan (yang diimunisasi protein pili *E. coli* BM 32,2

kDa), kontrol positif (marmut yang diinfeksi secara transuretra dengan *E. coli*) dan kontrol negatif. Hasil uji beda menggunakan LSD di dapat bahwa dibanding dengan marmut kontrol

kadar MDA tidak berbeda (  $p= 0,251$ ) dengan marmut yang diimunisasi dengan protein pili *E. coli* BM 32.2 kDa. Terdapat perbedaan kadar MDA antara marmut yang diinfeksi *E. coli* secara tranuretra dengan marmut kontrol ( $p = 0,007$ ).

## PEMBAHASAN

Menurut Sikka (1996) bahwa dihasilkannya MDA adalah produk akhir peroksidasi lipid yang diinduksi oleh ion Ferro. Pembentukan MDA dapat ditentukan dengan reaksi TBA yang sederhana dan dapat digunakan untuk diagnosa pengukuran peroksidasi lipid pada sistem *in vitro* dan *in vivo*. Koksai *et al.* (2003), juga menyatakan bahwa MDA adalah produk akhir yang stabil dari peroksidasi lipid.

Peroksidasi lipid secara luas diartikan sebagai kerusakan oksidatif asam lemak poli tak jenuh (*polyunsaturated fatty acid/PUFA*), yang mana asam lemak berisi lebih dari dua ikatan rangkap. PUFA mempunyai ikatan rangkap yang tidak terkonjugasi yang dipisahkan oleh metilen. Adanya ikatan rangkap dekat dengan metilen membuat ikatan hidrogen-karbon metilen lemah, selanjutnya hidrogen lebih rentan untuk putus. Sejak abstraksi terjadi dihasilkan radikal yang telah distabilkan oleh penyusunan kembali ikatan rangkap, membentuk radikal diene terkonjugasi yang dapat dengan mudah teroksidasi. Diene terkonjugasi dengan cepat bereaksi dengan  $O_2$

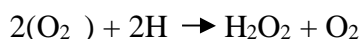
untuk membentuk radikal peroksil lipid ( $ROO^*$ ), yang mana memutus atom hidrogen dari molekul lipid yang lain untuk membentuk lipid hidroperoksida ( $ROOH$ ). Lipid hidroperoksida adalah stabil dibawah kondisi fisiologi sampai mereka kontak dengan logam transisi seperti Fe atau Copper. Logam ini menyebabkan lipid hidroperoksida menghasilkan radikal alkoksil dan peroksil, selanjutnya terjadi reaksi berantai dalam membran dan mempropagasi kerusakan sel (Agarwal *et al.*, 2003). Reaksi berantai ini dapat berakhir bila terjadi penggabungan 2 lipid radikal untuk membentuk asam lemak non radikal atau antara radikal dengan suatu senyawa pembasmi radikal.

Penambahan lipid peroksida dalam membran plasma spermatozoa akan menambah rigiditas struktur, mengubah kemampuan spermatozoa untuk berfusi dengan oosit (Aitken, 1993). Tingginya kadar MDA dapat menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa (Sikka, 1996).

Pada penelitian ini infeksi buatan secara transuretralis dengan *E. coli* pada Marmut dapat meningkatkan kadar MDA. Hal ini dikarenakan infeksi pada saluran reproduksi dapat merusak *Blood Testis Barrier* yang menstimulasi adanya respon imun baik respon imun selluler maupun respon imun humoral. Granulosit maupun makrofag dalam proses fagositosis akan menghasilkan *Reactive oxygen species* (ROS). ROS bersifat oksidator. Sasaran ROS salah satunya adalah lipid. Spermatozoa

komponen utama membran selnya adalah asam lemak tak jenuh yang mudah teroksidasi. MDA adalah produk akhir dari peroksidasi lipid. Ada korelasi linear antara *Reactive oxygen species* (ROS) dengan MDA. Tingginya kadar ROS akan mengoksidasi lipid atau asam lemak tidak jenuh yang merupakan komponen utama membran sel, sehingga diperoleh MDA yang tinggi.

Dalam seminal plasma dan spermatozoa terdapat antioksidan. Antioksidan adalah yang mengatur, menangkal dan menekan pembentukan ROS. Antioksidan superoksid dismutase (SOD) secara spontan mengubah radikal superoksid anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) untuk membentuk  $O_2$  dan  $H_2O_2$ . Pada mamalia ada 3 macam SOD yaitu sitosolik CuZn superoksid dismutase (SOD I), intra mitokondria Mangan superoksid dismutase (SOD 2), ekstraselluler CuZn superoksid dismutase (SOD 3). Ke tiga macam SOD tersebut mengkatalisis reaksi (Sikka, 1996):

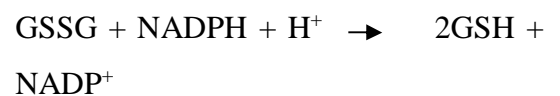
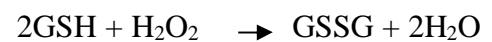


Katalase mengubah  $H_2O_2$  menjadi  $O_2$  dan  $H_2O$ .



SOD melindungi spermatozoa melawan secara spontan toksisitas  $O_2$  dan Lipid peroksidasi (LPO). SOD dan katalase juga menghilangkan  $O_2$  yang dihasilkan oleh NADPH oksidase netrofil dan memainkan peran penting dalam menurunkan LPO dan melindungi spermatozoa selama inflamasi pada traktus urinarius (Sikka, 1996).

Glutation peroksidase (GSH) adalah enzim antioksidan yang berisi selenium dan glutation sebagai donor elektron menghilangkan radikal peroksil ( $ROO^{\cdot}$ ) dari bermacam peroksida termasuk  $H_2O_2$ . Glutation reduktase lalu memperbaharui berkurangnya GSH dari GSSG (Sikka, 1996).



Pada keadaan infeksi antioksidan tidak mampu menangkal radikal bebas yang tinggi.

Pada penelitian ini kadar MDA spermatozoa marmut yang diimunisasi dengan protein adhesin pili E. coli BM 32.2 kDa tidak berbeda dengan kontrol. Kadar MDA yang rendah menunjukkan rendahnya peroksidasi lipid membran sperma marmut. Dengan demikian protein adhesin pili E. coli BM 32.2 kDa tidak toksik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal A., Saleh RA., Bedaiwy MA., 2003, *Role of Reactive Oxygen Species in The pathophysiology of Human Reproduction*, Fertil Steril, 79: 829-843
- Aitken RJ., 1993., *Analysis of Lipid Peroxidation Mechanism in Human Spermatozoa*, Molecular Reproduction and Development, 35:302-315.
- Khanna J., Van Look PFA, Griffin PSD., 1992, *A key to Brihter future*, Geneva, Word Organisation.
- Koksal IT., Usta M., Orhan I., Abbasoglu S., Kadioglu, 2003, *Potential Role of Reactive Oxygen Species on Testicular pathology Associated With Infertility*, Asian J Andrology, 5: 95-99.

- Sikka SC., Champion HC., Bivalacqua TJ., Estrada LS., Wang, R., Rajasekaran M., Agarwal BT., and Hellstrom WJG., 2001, *Role of genitourinary inflammation in infertility: synergistic effect of lipopolysaccharide and interferon  $\gamma$  on human spermatozoa*, Int.J. of Andrology, 24:136-141.
- Sukarjati, 1998, *Pengaruh spesies Bakteri dan Ratio sperma / Bakteri Terhadap Kualitas sperma Manusia secara in vitro*, Thesis, Unair Surabaya
- Sukarjati, Lunardhi H., 2001, *Pengaruh spesies Bakteri dan Ratio sperma / Bakteri Terhadap vitalitas sperma Manusia secara in vitro*, Jurnal Penelitian Berkala Hayati 7 (1)
- Sukarjati, Lunardhi H., Hinting A., 2002, *Pengaruh Spesies Bakteri dan ratio Sperma/ Bakteri Terhadap Motilitas Sperma Manusia secara In vitro*, Jurnal Penelitian Berkala Hayati, 8(1).
- Sukarjati, Lunardhi H., Sujarwo, 2006a, *Pengaruh inkubasi spermatozoa dengan spesies bakteri yang berbeda terhadap integritas membrane plasma spermatozoa*, Seminar Nasional Biologi, ITS Surabaya, 9 September 2006.
- Sukarjati, Lunardhi H., Sujarwo, 2006b, *Pengaruh semen yang terinfeksi E. coli terhadap kadar 8 hydroxy deoxy Guanosin (8 OHdG)*, Seminar Nasional Biodiversitas, Biologi UNAIR, 22 Juli 2006.
- Sukarjati, 2008, *Peran Protein Hemagglutinin Pili E. coli dan Lekosit pada mekanisme penurunan kualitas spermatozoa manusia*, Disertasi, Unair Surabaya.
- Sukarjati, Soebadi, DM., Hinting A., Sujarwo, 2010, *Pengaruh Echerichia coli dan Granulosit terhadap kadar Reactive Oxygen Species secara in vitro*, Jurnal Penelitian Berkala Hayati, 15(2).
- Sukarjati, Soebadi, DM., Hinting A., Sujarwo, 2011, *Immunogenity of 32.2 kDa Hemaggulitin BM Protein of*

*Echerichia coli Isolated from infertile males' semen*, Folia Medica Indonesiana, 47