



**PERAN PROTEIN PILI 85 kDa BAKTERI *Escherichia coli* SEBAGAI
PROTEIN ADHESIN DAN HEMAGLUTININ**

SKRIPSI

Oleh

**Siti Marissa Aisyah
NIM 162010101052**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2020**



**PERAN PROTEIN PILI 85 kDa BAKTERI *Escherichia coli* SEBAGAI
PROTEIN ADHESIN DAN HEMAGLUTININ**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

**Siti Marissa Aisyah
NIM 162010101052**

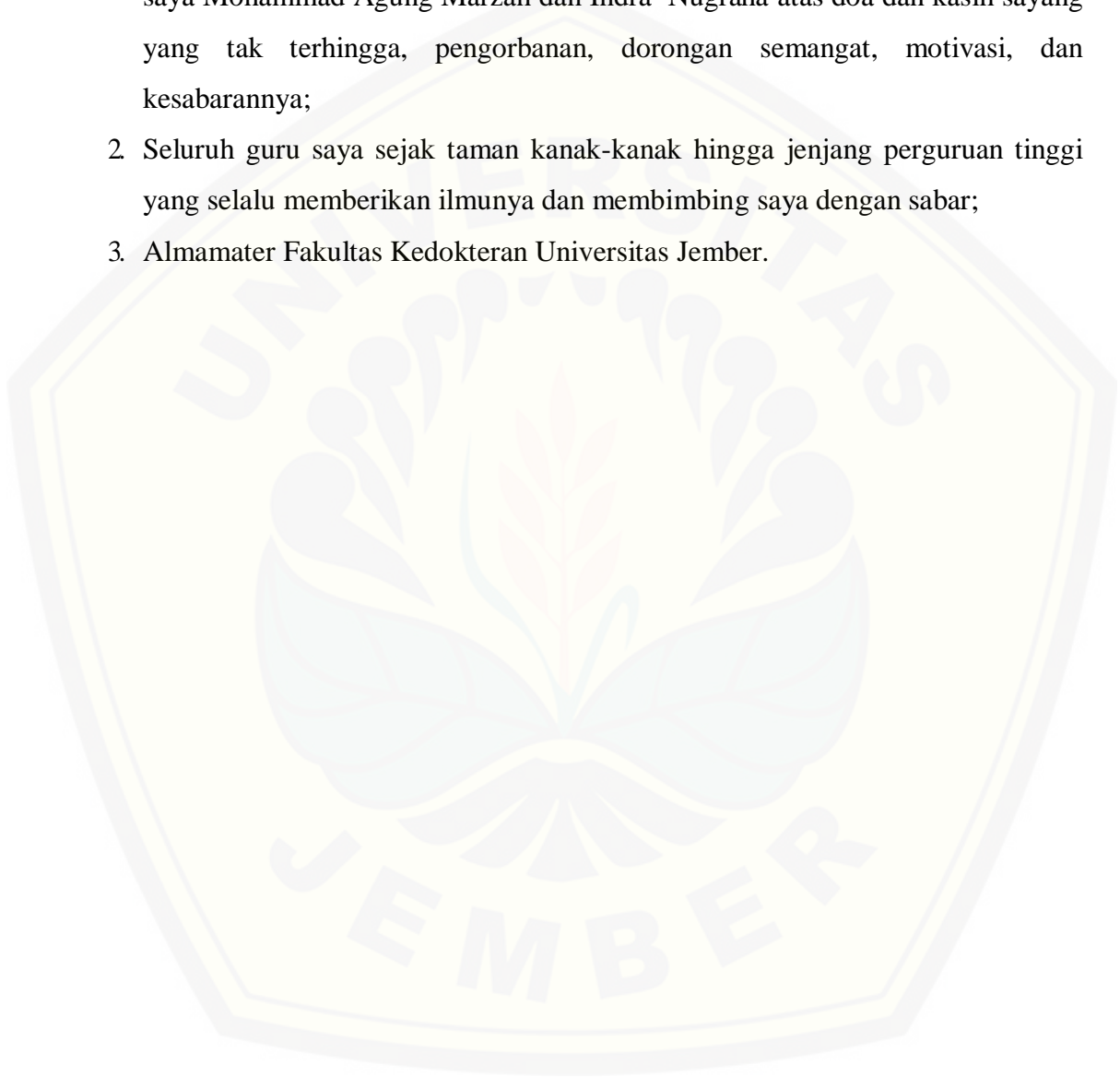
**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2020**



PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Orang tua saya, Ibu Maryuning, Bapak Hamzah Lukman, dan kakak-kakak saya Mohammad Agung Marzah dan Indra Nugraha atas doa dan kasih sayang yang tak terhingga, pengorbanan, dorongan semangat, motivasi, dan kesabarannya;
2. Seluruh guru saya sejak taman kanak-kanak hingga jenjang perguruan tinggi yang selalu memberikan ilmunya dan membimbing saya dengan sabar;
3. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



MOTTO

“Orang shaleh adalah orang-orang yang bisa memaklumkan Allah, Rasulullah, dan Al Qur’an supaya bisa diterima. Karena awal dari orang menerima itu tahu dulu” –K.H. Ahmad Bahauddin Nur Salim



PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

nama : Siti Marissa Aisyah

NIM : 162010101052

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Peran Protein Pili 85 kDa Bakteri *Escherichia coli* sebagai Protein Adhesin dan Hemagglutinin” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 1 Maret 2020
Yang menyatakan,

Siti Marissa Aisyah
NIM 162010101052

SKRIPSI

**PERAN PILI 85 kDa BAKTERI *Escherichia coli*
SEBAGAI PROTEIN ADHESIN DAN
HEMAGLUTININ**

Oleh

Siti Marissa Aisyah 162010101052

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama (DPU) : dr. Dini Agustina, M.Biomed.

Dosen Pembimbing Anggota (DPA) : dr. Ika Rahmawati S, M.Biotech.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Peran Protein Pili 85 kDa Bakteri *Escherichia coli* sebagai Protein Adhesin dan Hemagglutinin” karya Siti Marissa Aisyah telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Tim Penguji:

Ketua

dr. Erfan Efendi, Sp. An.
NIP. 19680328 199903 1 001

Anggota I

dr. Muh. Hasan, M. Kes., Sp.OT.
NIP. 19690411 199903 1 001

Anggota II

dr. Dini Agustina, M.Biomed.
NIP. 19830801 200812 2 003

Anggota III

dr. Ika Rahmawati S, M.Biotech.
NIP. 19840819 200912 2 003

Mengesahkan
Dekan,

dr. Supangat, M.Kes, Ph.D, Sp.BA
NIP 197304241999031002

RINGKASAN

Peran Protein Pili 85 kDa Bakteri *Escherichia coli* sebagai Protein Adhesin dan Hemagglutinin; Siti Marissa Aisyah, 162010101052; 2020; 63 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Escherichia coli (*E. coli*) merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang. *E. coli* termasuk dalam bakteri *Multi Drug Resistant* (MDR) karena memproduksi enzim *beta-lactamase extended spectrum* (ESBL). Saat ini ada beberapa strategi dilakukan untuk mencegah dan mengobati infeksi bakteri *E. coli* sehingga mengurangi angka terjadinya MDR. Salah satunya dengan pengembangan vaksin berbasis protein. Pada membran luar *E. coli* terdapat protein permukaan yang berperan dalam faktor virulensi. Pili merupakan salah satu protein permukaan yang dapat memperantarai perlekatan bakteri dengan sel inang (adhesin atau hemagglutinin) dan dapat dijadikan kandidat vaksin berbasis protein.

Protein imunogenik yang mampu memicu respon humoral maupun imunitas seluler memiliki berat molekul antara 10-100 kDa. Penelitian sebelumnya menyebutkan pili adhesin 32,2 kDa *E. coli* terbukti dapat menghambat perlekatan bakteri *E. coli* pada spermatozoa manusia. Pada penelitian ini akan dilakukan uji adhesi dan hemagglutinasi untuk mengetahui bakteri *E. coli* 85 kDa dapat berperan sebagai protein adhesin dan hemagglutinin.

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian *true experimental laboratories* dan deskriptif untuk mengetahui peran protein pili berat molekul 85 kDa bakteri *E. coli* sebagai adhesin dan hemagglutinin. Sampel yang digunakan adalah stok *E. coli* di laboratorium mikrobiologi FK UNEJ. Variabel bebas pada penelitian ini adalah titer pengenceran pili dan variabel terikatnya adalah hemagglutinasi dan indeks adhesi. Protein pili 85 kDa bakteri *E. coli* dilanjutkan dengan uji korelasi-regresi untuk mengetahui hubungan antara titer pengenceran pili 85 kDa dan indeks adhesi.

Hasil uji hemagglutinasi menunjukkan tidak terjadi proses aglutinasi eritrosit mencit. Hasil perhitungan indeks adhesi bakteri pada sel enterosit mencit menunjukkan bahwa semakin tinggi titer pengenceran maka semakin banyak bakteri yang menempel. Protein pili berperan sebagai kompetitor bagi bakteri dalam menempati reseptor sel penjamu sehingga semakin tinggi konsentrasi pili yang diberikan maka semakin sedikit bakteri yang menempel pada sel paru mencit. Hasil uji statistik ditemukan nilai $R = -0,921$ dan $R^2 = 0,848$. Persamaan regresi yang diperoleh adalah $y = -658,99x + 979,92$. Kesimpulan penelitian ini adalah protein pili 85 kDa bakteri *E. coli* dapat berperan sebagai protein adhesin dan tidak berperan sebagai protein hemagglutinin.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah - Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Peran Protein Pili 85 kDa Bakteri *Escherichia coli* sebagai Protein Adhesin dan Hemagglutinin”. Skripsi ini diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Studi Pendidikan Dokter (S1) di Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Supangat, M.Kes., Ph.D., Sp.BA. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama menempuh Studi Pendidikan Dokter di Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Dini Agustina, M.Biomed. selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Ika Rahmawati S, M.Biotech. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah baik hati dan meluangkan waktu, pikiran, tenaga, serta perhatian dalam membimbing penulisan skripsi ini;
3. dr. Erfan Efendi, Sp.An. selaku Dosen Penguji I dan dr. Muh. Hasan, M.Kes., Sp.OT. selaku Dosen Penguji II atas segala bimbingan, perhatian, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. Seluruh staf pengajar dan karyawan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas bantuannya selama saya menjadi mahasiswa;
5. Kedua orang tua yang sangat saya cintai, Ibu Maryuning dan Bapak Hamzah Lukman yang tidak pernah lelah dan putus memberikan doa, kasih sayang, motivasi, perhatian, dukungan, bimbingan, dan seluruh pengorbannya selama ini;
6. Kakak-kakak saya tercinta, Mohammad Agung Marzah dan Indra Nugraha yang selalu memberikan doa, kasih sayang, motivasi, dukungan, perhatian, dan membawa kebahagiaan selama ini;
7. K.H Misrawi beserta keluarga, selaku pengasuh PPIM Ath Thoybah yang

telah memberikan doa dan motivasi saya selama ini;

8. Teman-teman santri PPIM Ath Thoybah khususnya Fajar Amalia Rohmah dan Luluk Mahfudotul Habibah, yang telah baik dan memberikan semangat, doa, dukungan, perhatian, motivasi, serta penyegaran pikiran di kala jenuh;
9. Teman-teman Ligamen 2016 khususnya Sus Faradila Yusmi, Safira Geta Putri Ayunita, Niken Larasati, Fathiah Ulil Albab, Ichlasul Amal, dan Febri Fatma Lailatul Laeli, yang telah baik dan memberikan doa, dukungan, bantuan, motivasi, serta semangat selama ini;
10. Teman-teman tim penelitian Keris Mikrobiologi, Nurul Indah Saffanah, Rahma Perwitasari, Prisma Diandari, Yuna Annisa Salsabila, dan Adellia Fira Fa'idha yang telah baik dan memberikan bantuan, dukungan, serta semangat selama ini;
11. Analis Laboratorium Mikrobiologi FK UNEJ, Mbak Lilis Lestari dan Analis Laboratorium Biokimia Mbak Nuris atas segala bantuan, kerjasama, masukan, dan bimbingannya selama penelitian ini;
12. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih atas segala bantuan dan kerjasama selama ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember,

Penulis.

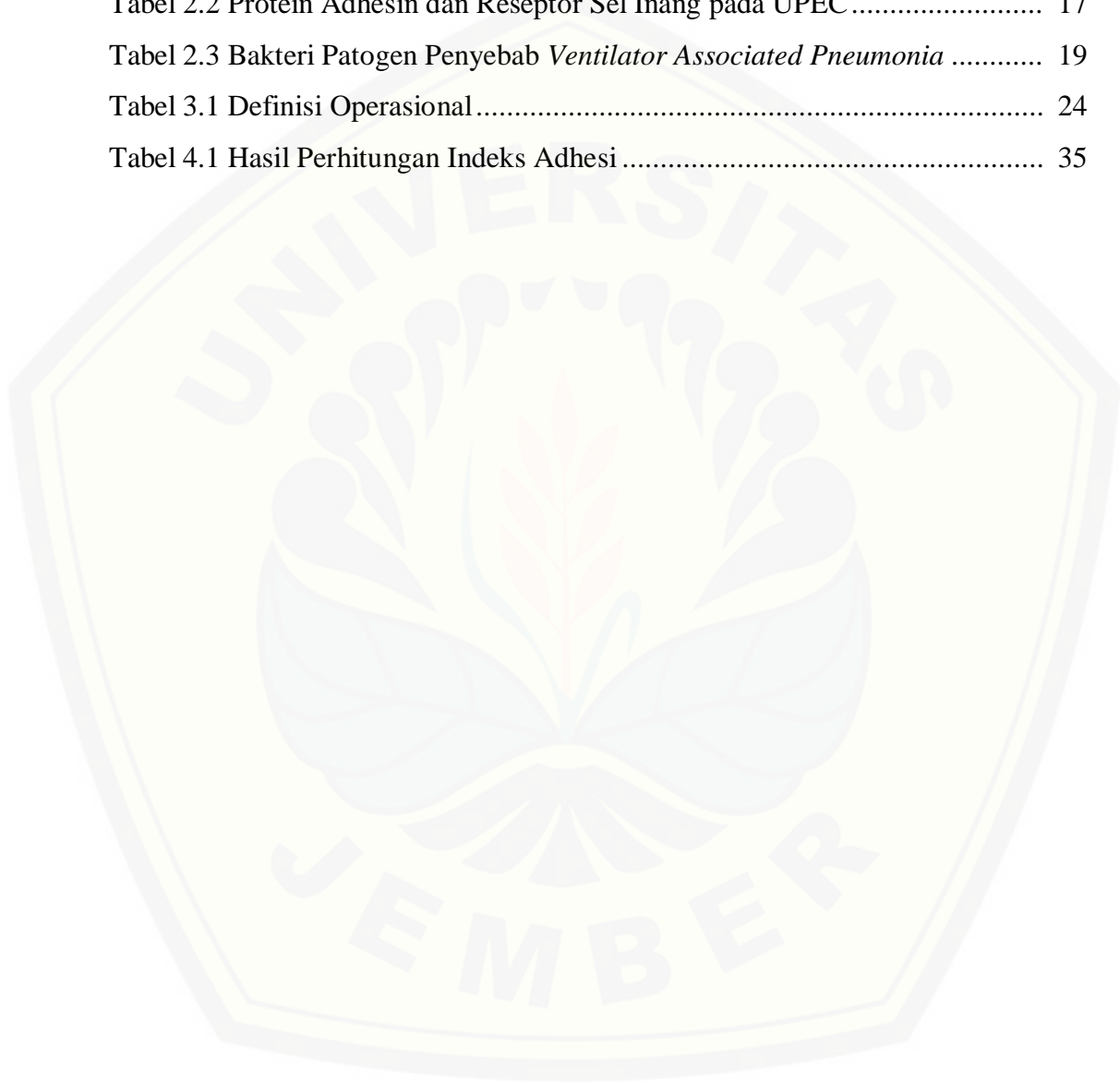
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
HALAMAN PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Escherichia coli</i>	5
2.1.1 Taksonomi dan Morfologi.....	5
2.1.2 Epidemiologi dan Transmisi.....	7
2.1.3 Struktur Antigen.....	8
2.1.4 Patogenesis.....	9
2.1.5 Klasifikasi.....	9
2.1.6 Faktor Virulensi.....	10
2.1.7 Manifestasi Klinis.....	18
2.2 <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (SDS PAGE)	20
2.3 Hemaglutinasi	21
2.4 Enterosit	21
2.5 Kerangka Konsep Penelitian	22
2.6 Hipotesis	23
BAB 3. METODE PENELITIAN	24
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	24
3.1.1 Tahap Isolasi Pili.....	24
3.1.2 Tahap Uji Hemaglutinasi.....	24
3.1.3 Tahap Uji Adhesi.....	24
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	24

3.3 Sampel Penelitian	24
3.4 Instrumen Penelitian	25
3.4.1 Alat Penelitian.....	25
3.4.2 Bahan Penelitian.....	25
3.5 Batasan Operasional	26
3.5.1 Variabel	26
3.5.2 Definisi Operasional.....	26
3.6 Prosedur Penelitian	27
3.6.1 Identifikasi Bakteri <i>E. coli</i>	27
3.6.2 Kultur <i>E. coli</i>	27
3.6.3 Isolasi Pili <i>E. coli</i>	27
3.6.4 Identifikasi Berat Molekul Pili (SDS-PAGE).....	28
3.6.5 Pemurnian Pili <i>E. coli</i>	28
3.6.6 Isolasi Eritrosit Mencit	29
3.6.7 Uji Hemaglutinasi	29
3.6.8 Isolasi Sel Enterosit Mencit	29
3.6.9 Uji Adhesi	30
3.7 Analisis Data	31
3.8 Alur Penelitian	31
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	33
4.1 Hasil	33
4.1.1 Identifikasi, Kultur, dan Isolasi Protein Pili Bakteri <i>E.coli</i> .	33
4.1.2 Identifikasi Berat Molekul Protein Pili (SDS-PAGE)	33
4.1.3 Pemurnian Protein Pili <i>E. coli</i>	34
4.1.4 Uji Hemaglutinasi Protein Pili <i>E. coli</i>	35
4.1.5 Uji Adhesi Protein Pili <i>E. coli</i>	35
4.2 Analisis Data	37
4.3 Pembahasan	38
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	43
5.1 Kesimpulan	43
5.2 Saran	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Antigen K pada <i>E. coli</i> Mengacu pada Antigen Kapsul Polisakarida Asam.....	7
Tabel 2.2 Protein Adhesin dan Reseptor Sel Inang pada UPEC	17
Tabel 2.3 Bakteri Patogen Penyebab <i>Ventilator Associated Pneumonia</i>	19
Tabel 3.1 Definisi Operasional	24
Tabel 4.1 Hasil Perhitungan Indeks Adhesi	35



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 <i>Escherichia coli</i> pada Medium <i>Eosin Methylen Blue</i> (EMB).....	5
Gambar 2.2 Dinding Sel <i>Escherichia coli</i>	6
Gambar 2.3 Skema Kerangka Konsep	20
Gambar 4.1 Hasil Identifikasi Bakteri <i>E. coli</i>	32
Gambar 4.2 Profil Protein Pili 85 kDa <i>E. coli</i> Hasil SDS PAGE.....	32
Gambar 4.3 Hasil Uji Hemaglutinasi.....	33
Gambar 4.4 Hasil Uji Adhesi	34

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 3.1 Alur Prosedur Penelitian Isolasi Pili	46
Lampiran 3.2 Alur Prosedur Penelitian Identifikasi Berat Molekul Protein Pili .	47
Lampiran 3.3 Alur Prosedur Penelitian Pemurnian Pili	48
Lampiran 3.4 Alur Prosedur Penelitian Uji Hemaglutinasi	49
Lampiran 3.5 Alur Prosedur Penelitian Isolasi Sel Enterosit Mencit	50
Lampiran 3.6 Alur Prosedur Penelitian Uji Adhesi	51
Lampiran 4.1 Surat Keterangan Persetujuan Etik	52
Lampiran 4.2 Surat Rekomendasi Bebas Plagiasi	53
Lampiran 4.3 Dokumentasi Hasil Penelitian.....	54
Lampiran 4.4 Analisis Data.....	56

DAFTAR SINGKATAN

<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
HAP	: <i>Hospital-Acquired Pneumonia</i>
VAP	: <i>Ventilator-Associated Pneumonia</i>
MDR	: <i>Multi Drug Resistant</i>
ESBL	: <i>beta-lactamase extended spectrum</i>
EMBA	: <i>Eosin Methylen Blue Agar</i>
EPEC	: <i>Enteropathogenic E. coli</i>
ETEC	: <i>Enterotoxigenic E. coli</i>
EHEC	: <i>Enterohemorrhagic E. coli</i>
EAEC	: <i>Enteraggregative E. coli</i>
EIEC	: <i>Enteroinvasive E. coli</i>
DAEC	: <i>Diffusely Adherent E. coli</i>
ExPEC	: <i>Extraintestinal Pathogenic E. coli</i>
MLST	: <i>Multilocus Sequence Typing</i>
UPEC	: <i>Uropathogenic E. coli</i>
SPEC	: <i>Septicemic Pathogenic E. coli</i>
NSEC	: <i>Neonatal Septicemic E. coli</i>
NMEC	: <i>Neonatal Meningitis E. coli</i>
APEC	: <i>Avian Pathogenic E. coli</i>
CU	: <i>Chaperon Usher</i>
CS1	: <i>Coli Surface Antigen 1</i>
GSP	: <i>General Secretory Pathway</i>
OMP	: <i>Outer Membrane Protein</i>
TAA	: <i>Trimeric AT Adhesin</i>
FHA	: <i>Filamentous Hemagglutinin</i>
SGB	: <i>Streptococcus Group B</i>
PMN	: <i>Polimorfonuklear</i>
LOS	: <i>Lipooligosakarida</i>
MAC	: <i>Membrane Attack Complex</i>

MV	: Ventilasi Mekanik
ETT	: <i>Endotracheal Tube</i>
SDS PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
LPS	: Lipopolisakarida
NB	: <i>Nutrient Broth</i>
SIM	: <i>Sulfide Indole Motility</i>
MR-VP	: <i>Methyl Red-Voges Proskauer</i>
TSIA	: <i>Triple Sugar Iron Agar</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
TCA	: <i>Trichloroacetic Acid</i>
NOG	: <i>n-octyl-β-Dglucopyranoside</i>
DTT	: <i>dithiothretiol</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Escherichia coli (*E. coli*) merupakan bakteri berbentuk batang yang termasuk ke dalam kelompok bakteri Gram negatif. *Escherichia coli* dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok yaitu bakteri komensal yang tidak menyebabkan penyakit pada traktus gastrointestinal, strain penyebab diare atau yang menginfeksi usus, dan strain penyebab penyakit di luar traktus intestinal (ExPEC) (Poolman, 2017). Famili Enterobacteriaceae menjadi penyebab terjadinya infeksi nosokomial pada pasien *hospital-acquired pneumonia* (HAP) dan *ventilator-associated pneumonia* (VAP). Infeksi *E. coli* menjadi penyebab kelima terbanyak dalam angka kejadian infeksi nosokomial di *United States* sebesar 5,5% sedangkan di Eropa menjadi penyebab ketiga terbanyak sebesar 11,18% (Luyt, 2018).

Escherichia coli termasuk dalam bakteri *Multi Drug Resistant* (MDR). Bakteri MDR merupakan bakteri yang resisten terhadap tiga atau lebih obat antibiotik. Menurut Adult ICU of the Federal University of Uberlândia (Adult ICU/UFU), *Escherichia coli* resisten terhadap obat antibiotik karena memproduksi enzim *beta-lactamase extended spectrum* (ESBL) (Souza-Oliveira, 2016). Tingginya tingkat resistensi antibiotik disebabkan karena *E. coli* memiliki membran luar pada lapisan peptidoglikannya. Penetrasi antibiotik beta-laktam pada *E. coli* dapat melalui pori-pori di membran luarnya. Perubahan protein pada membran tersebut akan mempengaruhi ukuran pori-pori yang membuat resistensi antibiotik terhadap bakteri (Murray *et al.*, 2013). Proliferasi dari strain MDR terhadap beberapa obat dalam beberapa tahun terakhir menyebabkan peningkatan insiden rawat inap, kegagalan pengobatan, dan kematian. Ada beberapa strategi alternatif untuk mencegah dan mengobati strain ExPEC, salah satu contohnya yaitu pengembangan vaksin. Saat ini, kandidat vaksin ExPEC4V dirancang untuk mencegah infeksi saluran kemih dan komplikasi seperti bakterimia. Kandidat vaksin ExPEC4V secara khusus menargetkan antigen O dari lipopolisakarida *E.*

coli. Antigen O adalah komponen permukaan luar yang utama dari bakteri Gram negatif dan lebih sering menginduksi sistem kekebalan tubuh inang. Produksi antibodi anti-O antigen telah terbukti memberikan efek perlindungan terhadap infeksi *E. coli* (Huttner dan Gambillara, 2018).

Pada membran luar *E. coli* juga terdapat protein permukaan yang berperan dalam faktor virulensi. Faktor virulensi tersebut yang menyebabkan patogenesis terjadinya sebuah infeksi (Husna, 2018). *Escherichia coli* memiliki faktor virulensi untuk menyebabkan penyakit pada inang dengan kemampuan perlekatan sel-sel epitel inang yang menentukan patogenitasnya. Kemampuan perlekatan sangat berpengaruh terhadap kolonisasi *E. coli* pada sel inang. Pili sebagai adhesin yang diproduksi *E. coli* memediasi terjadinya perlekatan spesifik pada permukaan sel (Antao *et al.*, 2009).

Faktor virulensi lainnya yang berperan dalam perlekatan *E. coli* pada sel inang yaitu protein hemagglutinin. Hemagglutinin merupakan protein permukaan yang memperantarai perlekatan sel bakteri terhadap eritrosit inang. Beberapa bakteri yang mempunyai protein hemagglutinin dapat lebih mudah melekat pada permukaan mukosa inang (Abrar *et al.*, 2013). *Escherichia coli* yang mempunyai protein hemagglutinin memiliki kemampuan adhesi lebih tinggi dibandingkan dengan yang tidak mempunyai protein hemagglutinin pada sel epitel pipi sapi (Abrar, 2009).

Penelitian yang dilakukan oleh Sukarjati, 2008 menyatakan bahwa protein pili hemagglutinin *E. coli* dengan berat molekul 32,2 kDa yang diisolasi dari semen laki-laki infertil berfungsi sebagai adhesin pada spermatozoa manusia. Pili adhesin 32,2 kDa *E. coli* terbukti dapat menghambat perlekatan *E. coli* pada spermatozoa manusia secara *in vitro*. Hal tersebut menunjukkan bahwa pili adhesin 32,2 kDa termasuk protein yang imunogenik (Sukarjati, 2008; Sukarjati *et al.*, 2018). Protein imunogenik yang mampu memicu respon humoral maupun imunitas seluler memiliki berat molekul sebesar 10-100 kDa. Protein pili 85 kDa *E. coli* menjadi salah satu pili yang mempunyai sifat imunogenik berdasarkan ketebalan dari band di gel SDS PAGE (Parslow *et al.*, 2001; Dita *et al.*, 2019). Penelitian tentang peran pili *E. coli* dengan berat molekul 85 kDa sebagai protein

adhesin dan hemagglutinin belum ada yang melaporkan. Oleh karena itu, peneliti tertarik melakukan sebuah penelitian untuk mengetahui Peran Pili 85 kDa Bakteri *E. coli* sebagai Protein Adhesin dan Hemagglutinin.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, rumusan masalah dari penelitian ini yaitu “Apakah pili 85 kDa bakteri *E. coli* memiliki peran sebagai protein adhesin dan hemagglutinin?”

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah tersebut, tujuan penelitian dapat dibagi menjadi tujuan umum dan tujuan khusus.

1.3.1 Tujuan umum

Untuk mengetahui peran pili 85 kDa bakteri *E. coli* sebagai protein adhesin dan hemagglutinin

1.3.2 Tujuan khusus

- a. Untuk mengetahui hubungan antara titer pili 85 kDa *E. coli* dengan indeks adhesi
- b. Untuk mengetahui titer tertinggi pili 85 kDa dalam hemagglutinasasi

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang didapatkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Bagi peneliti dan institusi pendidikan: dapat memberikan pemahaman mengenai infeksi yang disebabkan oleh bakteri *E. coli*, khususnya dengan mengetahui peran faktor virulensi pili dengan berat molekul 85 kDa sebagai protein adhesin dan hemagglutinin.
- b. Bagi masyarakat: dapat memahami bahaya dan cara penularan infeksi yang disebabkan oleh bakteri *E. coli*

- c. Bagi kesehatan: hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar untuk mengembangkan protein imunogenik pili 85 kDa *E. coli* sebagai target potensial produksi vaksin berbasis protein.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

2.1.1 Taksonomi dan Morfologi

Escherichia coli memiliki susunan taksonomi sebagai berikut.

Domain	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

Escherichia coli (*E. coli*) merupakan bakteri berbentuk batang yang termasuk ke dalam kelompok bakteri gram negatif. *Escherichia coli* merupakan kelompok famili dari Enterobacteriaceae sama seperti *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, dan *Enterobacter* spp. Famili Enterobacteriaceae bersifat motil dengan flagela peritriks maupun nonmotil, tumbuh pada medium atau ekstrak daging tanpa penambahan natrium klorida atau suplemen lainnya, tumbuh dengan baik pada agar MacConkey, dapat tumbuh pada keadaan aerobik maupun anaerobik (merupakan anaerob fakultatif), memfermentasi dan tidak mengoksidasi glukosa, sering disertai produksi gas, bersifat katalase-positif, oksidase-negatif, dan mereduksi nitrat menjadi nitrit serta memiliki kandungan DNA G + C 39-59%. Morfologi *E. coli* dapat dilihat secara khas dalam medium solid *in vitro*, tetapi terlihat sangat beragam dalam spesimen klinis. *Escherichia coli* akan membentuk koloni yang sirkular, konveks, dan halus dengan tepi yang tegas (Jawetz *et al.*, 2013). *Escherichia coli* dapat tumbuh pada suhu 15-45 °C, tetapi ada beberapa strain yang dapat bertahan hidup pada suhu tinggi sebesar 60 °C selama 15 menit atau 55 °C selama 50 menit (Greenwood *et al.*, 2007).

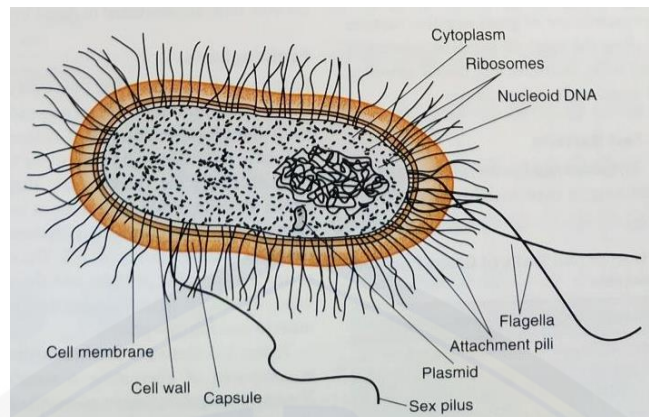
Pada uji indol, *E. coli* secara khas memberikan hasil positif. Selain itu, *E. coli* juga akan memberikan hasil positif pada uji lisin dekarboksilase dan

fermentasi manitol serta menghasilkan gas dari glukosa. Identifikasi *E. coli* melalui gambaran hemolisis pada agar darah didapatkan dari isolat urin. Morfologi khas koloni *E. coli* yang terbentuk adalah warna ‘berkilau’ atau disebut *green metallic sheen* (lihat Gambar 2.1) pada medium diferensial seperti agar *Eosin Methylen Blue* (EMB). Pada pemeriksaan glukuronidase- β dengan menggunakan substrat 4-methylumbelliferyl- β -glucoronide (MUG), hasil positif didapatkan dari 90% isolat *E. coli* (Jawetz *et al.*, 2013).



Gambar 2.1 *Escherichia coli* pada medium *Eosin Methylen Blue* (EMB). Pada gambar menunjukkan *green methallic sheen* yang merupakan ciri khas terbentuknya koloni *E. coli* (Jasmadi *et al.*, 2014).

Bentuk bakteri ditentukan oleh dinding selnya yang kaku. Bentuk bakteri di mikroskop adalah salah satu kriteria paling penting yang digunakan dalam identifikasi. Dinding sel merupakan komponen terluar yang umum ada pada bakteri. Beberapa bakteri memiliki komponen permukaan di luar dinding sel seperti kapsul, flagela, dan pili (lihat Gambar 2.2). Dinding sel terletak di luar membran sitoplasmik dan tersusun dari peptidoglikan. Peptidoglikan dapat memberikan dukungan struktural dan mempertahankan bentuk karakteristik sel (Levinson, 2012).



Gambar 2.2 Dinding sel *Escherichia coli* yang terdiri dari berbagai komponen (Levinson, 2012).

Lapisan peptidoglikan bakteri Gram negatif lebih tipis daripada bakteri Gram positif. Hal tersebut membuat bakteri Gram positif memiliki asam teikoat yang menonjol di luar peptidoglikan sedangkan bakteri Gram negatif tidak memiliki. Namun, bakteri Gram negatif memiliki komponen lapisan luar yang kompleks dan terdiri dari lipopolisakarida, lipoprotein, dan fosfolipid. Komponen tersebut terletak di antara lapisan membran luar dan membran sitoplasma yang disebut dengan ruang periplasmik (Levinson, 2012).

2.1.2 Epidemiologi dan Transmisi

Berdasarkan penelitian Balia *et al.* (2011), *Escherichia coli* ditemukan pada sampel daging sapi di Bandung yang telah terkontaminasi. Penularan *E. coli* sehingga dapat menjadi patogen di dalam tubuh manusia dapat melalui beberapa cara. Salah satu cara penularannya yaitu melalui konsumsi daging yang tidak dimasak dengan baik. Hal penting yang perlu diperhatikan yaitu memasak daging atau produk makanan lain dengan baik sebelum dikonsumsi karena *E. coli* dapat mati pada suhu 60 °C selama 30 menit. Beberapa cara penularan lain yaitu dapat melalui kontak langsung dengan hewan dan dari air yang telah terkontaminasi (Arnia dan Warganegara, 2012; Ateba dan Mbewe, 2011; Sa'idah *et al.*, 2011; Jasmadi *et al.*, 2014).

2.1.3 Struktur Antigen

Famili Enterobacteriaceae memiliki beberapa struktur antigen. Struktur antigen tersebut terdiri dari lebih dari 150 antigen O somatik (lipopolisakarida) yang stabil-panas, lebih dari 100 antigen K (kapsul) yang labil-panas, dan lebih dari 50 antigen H (flagela). Susunan antigen O merupakan unit berulang polisakarida dan berada di bagian terluar lipopolisakarida dinding sel. Melalui aglutinasi bakteri, antigen O dapat terdeteksi. Antigen O memiliki sifat resisten terhadap panas dan alkohol. Penyakit pada manusia yang spesifik berkaitan dengan ditemukannya antigen O, contohnya antigen O spesifik *E. coli* ditemukan pada diare dan infeksi saluran kemih (Jawetz *et al.*, 2013).

Pada beberapa famili Enterobacteriaceae, terdapat antigen K yang berada pada luar antigen O. Antigen K dapat berupa polisakarida (lihat Tabel 2.1) dan protein. Aglutinasi oleh antiserum O dapat diganggu oleh antigen K. Selain itu, antigen K dapat berkaitan dengan virulensi bakteri. Misalnya, antigen K1 *E. coli* banyak ditemukan pada meningitis neonatorum dan antigen K *E. coli* menyebabkan perlekatan bakteri ke sel epitel sebelum menginvasi saluran cerna atau saluran kemih (Jawetz *et al.*, 2013).

Tabel 2.1 Antigen K pada *E. coli* mengacu pada antigen kapsul polisakarida asam yang terbagi menjadi dua kelompok

Property	Group I	Group II
Molecular weight (Da)	>100.000	< 50.000
Acidic component	Hexuronic acid	Glucuronic acid, phosphate, NeuNAc, KDO,
Heat stability (100 °C, pH 6)	All stable	Mostly labile
O groups	O8, O9	Many
Chromosome site	<i>His</i>	<i>SerA</i>
Expressed at 17-20 °C	Yes	No
Electrophoretic mobility	Low	High

KDO, ketodeoxyoctonate; NeuNAc, *N*-acetylneuraminic acid

Sumber: Greenwood *et al.*, 2007

Selain antigen O dan antigen K, struktur antigen yang terakhir yaitu antigen H. Letak antigen H terdapat pada flagela dan mempunyai sifat akan terdenaturasi atau rusak oleh panas atau alkohol. Pada bakteri yang motil, antigen H dapat dipertahankan dengan pemberian formalin. Antigen H juga dapat mengaglutinasi antibodi anti-H terutama pada IgG. Fungsi susunan asam amino pada protein flagela (flagellin) menjadi penentu antigen H (Jawetz *et al.*, 2013).

Adanya antigen spesifik ditunjukkan dari klasifikasi antigen Enterobacteriaceae. Susunan antigen dari *E. coli* yang memungkinkan adalah O55:K5:H21. Beberapa antigen K Enterobacteriaceae dapat bereaksi silang dengan polisakarida kapsular virus atau bakteri lainnya, seperti *Haemophilus influenza* atau *Neisseria meningitidis*. Sehingga, *E. coli* O75:K100:H5 dapat menginduksi antibodi yang mengenali *H. influenza* tipe b (Jawetz *et al.*, 2013).

2.1.4 Patogenesis

Paradigma umum mekanisme patogen *E. coli* terkait dengan virulensi *E. coli* melibatkan adhesi, injeksi protein ke dalam sel inang, subversi mekanisme pensinyalan, dan kolonisasi. Hal tersebut menyebabkan gangguan respon imun, gangguan potensi membran, dan manipulasi sitoskeletal. Selama tahap injeksi, *E. coli* biasanya mengeluarkan efektor ke dalam sel inang menggunakan satu atau lebih sistem sekresi protein untuk bisa lolos dari respon imun atau untuk mengubah jalur pensinyalannya. Membran inang berpotensi mengalami gangguan dan terinduksi apoptosis (Tang dan Jr, 2014).

2.1.5 Klasifikasi

Escherichia coli dapat dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu bakteri komensal yang tidak menyebabkan penyakit pada traktus gastrointestinal, strain penyebab diare atau yang menginfeksi usus, dan strain penyebab penyakit di luar traktus interstinal. Strain yang dapat menginfeksi usus diantaranya *enteropathogenic E. coli* (EPEC), *enterotoxigenic E. coli* (ETEC), *enterohemorrhagic E. coli* (EHEC), *enteroaggregative E. coli* (EAEC), *enteroinvasive E. coli* (EIEC), dan *diffusely adherent E. coli* (DAEC). Sedangkan

strain yang dapat menginfeksi di luar usus yaitu *extraintestinal pathogenic E. coli* (ExPEC) (Poolman, 2017).

Berbeda dengan *E. coli* komensal dan patogen intestinal, ExPEC berasal dari *phylogroup* B2. *Multilocus Sequence Typing* (MLST) dari ExPEC menunjukkan gen spesifik tertentu yang bertanggung jawab menjadi penyebab infeksi ekstraintestinal pada manusia yaitu ST69, ST117, dan ST131. *Extraintestinal Pathogenic E. coli* menonjol diantara strain *E. coli* lainnya karena mempunyai faktor virulensi yang unik dan mampu menginfeksi berbagai jaringan ekstraintestinal. Penyakit yang disebabkan oleh infeksi ExPEC yaitu *uropathogenic E. coli* (UPEC), *septicemic pathogenic E. coli* (SPEC), *neonatal septicemic E. coli* (NSEC), *neonatal meningitis E. coli* (NMEC) and *avian pathogenic E. coli* (APEC). *Uropathogenic E. coli* mengarah ke gangguan dari infeksi saluran kemih, sistitis, hingga infeksi sistemik seperti pielonefritis. *Neonatal septicemic E. coli* dan *neonatal meningitis E. coli* menunjukkan septikemia dan meningitis pada bayi baru lahir. *Septicemic pathogenic E. coli* juga terlibat dalam *community-acquired septicaemia* pada orang dewasa. Selain itu, ExPEC juga berperan menjadi penyebab pneumonia nosokomial, selulitis, prostatitis, peritonitis, osteomielitis, infeksi intra-abdominal, dan infeksi pada kulit serta jaringan lunak (Tapader *et al.*, 2019).

2.1.6 Faktor Virulensi

Beberapa faktor virulensi dapat menyebabkan infeksi dan penyakit yang diakibatkan oleh *E. coli*. Faktor virulensi tersebut dapat berupa adhesin (adhesin fimbrial dan adhesin afimbrial), protein hemaglutinin, kapsul, lipopolisakarida (endotoksin), resistensi serum, dan siderofor (Ragione dan Woodward, 2002).

a. Protein Adhesin

Salah satu faktor virulensi pada sebagian besar bakteri patogen terdapat pada kemampuan perlekatannya (adhesi) pada berbagai macam permukaan biotik maupun abiotik. Struktur permukaan yang memperantarai perlekatan bakteri dibagi berdasarkan mekanisme adhesi dan struktur bakteri menjadi fimbrial

adhesin dan non-fimbrial adhesin. Istilah adhesin non-fimbrial dan afimbrial sering digunakan secara sinonim untuk struktur permukaan perlekatan mono- atau oligomer. Perbedaan antara keduanya yaitu adanya (non-fimbrial) atau tidak adanya (afimbrial) *membrane anchor* yang khas pada proteinnya (Gerlach dan Hensel 2007).

Jenis adhesin bervariasi tergantung pada sifat bakteri Gram. Bakteri Gram positif memiliki adhesin dalam bentuk protein atau polisakarida pada membran permukaan. Adhesin tersebut disekresikan dalam bentuk kapsul atau vesikel. Pada bakteri Gram negatif, adhesin dimiliki dalam bentuk fimbriae atau pili (Patel *et al.*, 2017).

1) Adhesin Fimbrial

Fimbriae atau pili adalah kelompok dengan ciri kaku dan pelengkap berfilamen lurus pada permukaan bakteri. Pili umumnya terdapat pada bakteri Gram negatif yang berada pada membran luar. Struktur permukaannya terdiri dari ratusan hingga ribuan subunit yang memediasi adhesi melalui interaksi spesifik dengan struktur permukaan (reseptor) pada sel inang. Fimbriae juga mampu memediasi adhesi yang tidak spesifik dengan meningkatkan hidrofobisitas permukaan bakteri (Lindahl *et al.*, 1981; Gerlach dan Hensel, 2007).

a) Pili Tipe 1 dan Pili P

Pili tipe 1 dan pili P berkaitan dengan pielonefritis yang berada pada membran luar melalui jalur *chaperon usher* (CU). Kedua tipe pili ini ditemukan pada strain UPEC dan menunjukkan ikatan dengan spesifisitas yang berbeda. Pili P dikodekan *pap operon* yang terikat melalui adhesin PapG ke terminal glukosa dari glikolipid pada permukaan sel inang. Spesifisitas inang dan jaringan bervariasi karena adanya perbedaan adhesin PapG untuk mengenali tetapi masih terkait dengan gen *Gala-(1-4)-Gal Sugars* (Feria *et al.*, 2001; Gerlach dan Hensel, 2007). Gen tersebut merupakan cluster gen fim yang mengkode pili tipe 1 dengan FimH menjadi pilus adhesin. Varian FimH berada pada *E. coli* non-patogen menunjukkan afinitas tinggi terhadap reseptor *trimannose-containing glycoprotein*

Uropathogenic E. coli juga mengekspresikan varian FimH terhadap residu *monomannose* yang ditemukan banyak di permukaan glikoprotein sel saluran kemih. Pengikatan reseptor FimH-mediated terbukti memediasi internalisasi sel kandung kemih yang menghasilkan persistensi bakteri dan infeksi saluran kemih kronis (Martinez *et al.*, 2000; Gerlach dan Hensel, 2007).

b) Adhesin Afa/Dr

Adhesin Afa/Dr (*diffuse adherence fibrillar adhesin/Dr blood group antigen*) merupakan adhesin yang termasuk ke dalam jenis fimbrial adhesin, afimbrial adhesin, dan non-fimbrial adhesin yang disatukan melalui *chaperon usher*. Adhesin ini sebagian besar berasal dari *Diffusely Adherent E. coli* (DAEC). Afa/Dr mengkodekan regulator transkripsi, *periplasmic chaperone*, protein pada membran luar, invasin, dan adhesin Afa/Dr itu sendiri (Servin, 2005; Gerlach dan Hensel, 2007). Adhesin Afa membentuk struktur yang berhubungan dengan membran luar amorf (selubung afimbrial) (Garcia *et al.*, 2000; Gerlach dan Hensel, 2007). Beberapa reseptor dari adhesin Afa/Dr telah memiliki karakterisasi yaitu fimbrial adhesin Dr menunjukkan pengikatan kolagen IV serta pelengkap yang mengatur protein DAF (CD55) (Nowicki *et al.*, 1988; Gerlach dan Hensel, 2007).

c) Pili CS

Pembentukan pili *coli surface antigen 1* (CS1) dari ETEC menunjukkan kesamaan fungsional yang tinggi pada jalur *chaperone/usher* tetapi protein yang terlibat tidak memiliki kesamaan urutan yang terdeteksi. Maka, sistem pembentukan pili CS disebut 'Jalur *Chaperon Usher* alternatif' (Soto dan Hultgren, 1999; Gerlach dan Hensel, 2007). Empat gen yang terkait yaitu *cooABCD* sangat penting untuk biogenesis pili CS. Keempat protein adalah *general secretory pathway* (GSP) yang diangkut secara dependen ke dalam periplasma dimana *periplasmic chaperon* CooB menstabilkan CooA, C, dan D. Pili minor CooD diperkirakan memulai pilus pembentukan yang letaknya di ujung pilus. *Outer Membrane Protein* (OMP) CooC adalah perantara CooD dan pili mayor CooA disekresikan (Starks *et al.*, 2006; Gerlach dan Hensel, 2007). CS1 memperantarai ikatan *E. coli* ke sel epitel usus dan

memediasi aglutinasi eritrosit sapi. Analisis mutasional menyebutkan bahwa adhesi dan hemaglutinasi sangat bergantung pada residu asam amino dalam pilin minor CooD (Sakellaris *et al.*, 1999; Gerlach dan Hensel, 2007).

d) Pili Tipe IV

Pili tipe IV terbentuk di membran sitoplasma oleh polimerasi subunit pilin. Pembentukan struktur pilus diekstrusi melewati *outer membrane* dan membentuk permukaan perlekatan yang panjang dan fleksibel (Craig *et al.*, 2004; Gerlach dan Hensel, 2007). Komponen pembentukan pili tipe IV secara structural terkait dengan protein homolog disebut 'pseudopilin' yaitu T2SS. Berdasarkan urutan asam amino dan panjangnya, pili tipe IV dikelompokkan menjadi dua subkelas yaitu tipe IVa dan IVb. Pili terpolimerasi dari subunit tipe IVa dan IVb yang berbeda secara signifikan dalam diameter serta struktur heliksnya (Hansen dan Hutan, 2006; Gerlach dan Hensel, 2007).

e) Curli

Jenis fimbrial adhesin lainnya adalah curli atau *aggregative fibers* (agf) tipis. Adhesin ini umumnya ada pada genom *Salmonella spp.* dan strain *E. coli*. Biosintesis curli pada *E. coli* sama seperti *S. typhimurium* yang tergantung ekspresi dua operon berorientasi secara divergen yaitu CsgDEFG dan CsgBA (Hammar *et al.*, 1995; Romling *et al.*, 1998; Gerlach dan Hensel, 2007). CsgD adalah sebuah regulator transkripsi dari LuxR dan mempromosikan ekspresi dari beberapa gen yang berhubungan dengan biofilm dan operon CsgBA (Brombacher *et al.*, 2003; Gerlach dan Hensel, 2007). Curli juga terbukti memediasi adhesi bakteri ke protein matriks fibronektin dan laminin manusia, plasminogen, protein fase kontak, serta molekul *major histocompatibility complex class I* (Ben Nasr *et al.*, 1996; Olsen *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 2006; Gerlach dan Hensel, 2007). Curli berkumpul di permukaan bakteri melalui presipitasi nukleasi ekstraseluler yaitu serat utama subunit csgA berpolimerasi pada permukaan yang terpapar nukleator CsgB (Hammar *et al.*, 1996; Gerlach dan Hensel, 2007). CsgE dan CsgF adalah dua protein periplasma yang diperlukan untuk perlekatan curli yang optimal dan berinteraksi dengan OMP CsgG. OM lipoprotein CsgG

ditunjukkan menjadi bagian integral dari kompleks sekresi yang diperantarai CsgE dan CsgF. Hal ini kemungkinan yang memfasilitasi transportasi CsgA dan CsgB melewati OM (Robinson *et al.*, 2006; Gerlach dan Hensel, 2007).

2) Adhesin Non-fimbrial

Adhesin non-fimbrial adalah protein permukaan berbentuk mono- atau oligomer yang tidak dibentuk melalui jalur *chaperon usher* dan tanpa subunit yang terpisah untuk ujung perlekatan dan badan pilus (Gerlach dan Hensel, 2007).

a) *Autotransported adhesins*

Kelompok Oca dari substrat T5SS-*secreted* umumnya disebut *trimeric AT adhesin* (TAA) (Linke *et al.*, 2006; Gerlach dan Hensel, 2007). YadA adalah *trimeric AT adhesin* dengan karakteristik terbaik dan adhesin utama dari enteropatogenik *Yersinia* spp. YadA memiliki berat molekul sebesar 28 nm dari *outer membrane* bakteri (Hoiczzyk *et al.*, 2000; Gerlach dan Hensel, 2007). YadA memediasi pengikatan ke beberapa protein *extracellular matrix* (ECM) seperti kolagen, laminin, dan fibronectin (Nummelin *et al.*, 2004; Gerlach dan Hensel, 2007). BadA dari *Bartonella henselae* juga terbukti memediasi pengikatan untuk protein ECM seperti kolagen dan fibronectin tetapi perlekatan yang mirip rambutnya diketahui lebih panjang yaitu 100 hingga 300 nm (Riess *et al.*, 2004; Gerlach dan Hensel, 2007). *Bordetella pertussis* memiliki T5SS yang diperankan oleh *filamentous hemagglutinin* (FHA) (Mazar dan Cotter, 2006; Gerlach dan Hensel, 2007) dengan fungsi memediasi pengikatan ke beberapa ligan (Coutte *et al.*, 2003; Gerlach dan Hensel, 2007).

b) *Integral Outer Membrane Adhesins*

Outer membrane protein (OMP) yang mengandung β -barell memiliki fungsi dalam adhesi (Niemann *et al.*, 2004; Gerlach dan Hensel, 2007). OmpA pada *E. coli* mempunyai peran utama dalam menembus *blood-brain barrier* yang bisa menyebabkan meningitis pada neonatus. Reseptor OmpA diidentifikasi sebagai Ecgp (glikoprotein berat molekul 96 kDa) pada permukaan sel endotel mikrovaskular otak manusia (Prasadarao, 2002;

Gerlach dan Hensel, 2007). Intimin merupakan OMP yang ditemukan pada EPEC, EHEC, dan *Citrobacter* spp. yang berhubungan dengan invasin (Batchelor *et al.*, 2000; Gerlach dan Hensel, 2007).

b. Protein Hemagglutinin

Protein hemagglutinin adalah adhesin bakteri Gram negatif yang diperankan oleh suatu protein dan mampu mengaglutinasi eritrosit mamalia (Martino *et al.*, 1995; Hidayati, 2010). Proses perlekatan bakteri pada sel epitel trakea diperankan oleh protein hemagglutinin (Darmawati, 1998; Abrar, 2009). Bakteri *Vibrio cholerae* biotype E1 Tor, *Salmonella typha*, *Klebsiella pneumonia*, *Streptococcus* Group B (SGB) (Wahyuni, 1998; Abrar, 2009) dan *Staphylococcus aureus* juga ditemukan protein hemagglutinin (Abrar, 2002; Abrar, 2009). Protein hemagglutinin difungsikan oleh bakteri-bakteri tersebut untuk melekat pada sel epitel usus halus, eritrosit tikus, permukaan sel epitel trakea, sel Hella dan sel epitel ambing (Abrar, 2009). Pili dengan adanya protein hemagglutinin juga berperan dalam meningkatkan pembentukan antibodi sebagai pelindung terhadap infeksi oleh bakteri tertentu (Darmawati, 1998; Abrar, 2009).

Keberadaan hemagglutinin merupakan salah satu faktor virulensi pada *E. coli* penyebab diare pada sapi. Hemagglutinin berperan dalam adhesi yang spesifik terhadap bakteri pada sel-sel epitel usus. Bakteri dengan hemagglutinin mempunyai kemampuan adhesi yang lebih tinggi daripada yang tidak memiliki hemagglutinin. Hal tersebut dapat mempengaruhi patogenitas bakteri yang berhubungan dengan tahap awal dari proses infeksi yaitu adhesi (Abrar, 2009).

c. Kapsul

Bakteri mensintesis polimer ekstrasel (polisakarida) yang menghasilkan kapsul. Kapsul tersebut akan berkondensasi dan membentuk lapisan di sekeliling sel. Bakteri dengan kapsul akan lebih tahan terhadap efek fagositosis dari sistem pertahanan tubuh daripada bakteri yang tidak mempunyai kapsul (Syahrurachman *et al.*, 2010).

Granulosit polimorfonuklear (PMN) dari kapsul memiliki kemampuan perlindungan bakteri dari fagositosis, pencegahan aktivasi respon imun awal, pencegahan bakteri mati oleh serum bakterisidal, penghambatan diferensiasi makrofag, dan penghambatan aktivasi atau *uptake* komponen komplemen, terutama C3b. Pencegahan aktivasi respon imun tubuh terjadi saat perlekatan bakteri pada sel yang menjadi penyebab pembatasan sinyal inflamasi dini. Hal tersebut menyebabkan induksi kurang kuat dari respon imun tubuh. Strain yang diekspresikan antigen kapsul K1 dan K2 merupakan strain kapsul polisakarida yang ditemukan sangat mematikan (Podschun *et al.*, 1998; Paczosa *et al.*, 2016).

d. Lipopolisakarida

Dinding sel bakteri Gram negatif terdapat lipopolisakarida yang dilepaskan ketika bakteri lisis. Lipopolisakarida memiliki sifat stabil terhadap panas. Lipopolisakarida mempunyai berat molekul antara 3000 hingga 5000 (lipooligosakarida, LOS) serta beberapa juta (lipopolisakarida) (Jawetz *et al.*, 2013).

Lipopolisakarida memiliki efek patofisiologi yang serupa tanpa melihat jenis bakterinya, kecuali untuk *Bacteroides* sp. karena strukturnya yang berbeda dan kurang toksik. Lipopolisakarida yang terikat dengan protein bersirkulasi di aliran darah. Lipopolisakarida akan berinteraksi dengan reseptor makrofag dan monosit serta sel lain dari sistem retikuloendotelial IL-1, TNF, dan sitokin lain, kaskade koagulasi, dan komplemen yang diaktivasi. Gejala-gejala yang akan ditemukan secara klinis dan eksperimental yaitu demam, leukopenia, hipoglikemia, hipotensi, syok, koagulasi intravaskuler, dan kematian akibat disfungsi organ masif (Jawetz *et al.*, 2013).

e. Resistensi Serum

Efek serum bakterisidal merupakan pertahanan tubuh pertama terhadap mikroorganisme asing yang masuk selain proses fagositosis oleh granulosit polimorfonuklear. Protein komplemen memediasi terjadinya aktivitas serum bakterisidal. Protein komplemen diakumulasi menjadi *membrane attack complex*

(MAC) di permukaan mikroorganisme setelah terjadi *cascade-like activation* (Podschun *et al.*, 1998).

Sifat resistensi serum tergantung pada strain bakteri yang terlibat. Bakteri Gram negatif dengan strain komensal lebih sensitif terhadap efek serum bakterisida manusia daripada bakteri Gram negatif dengan strain patogenik yang menunjukkan sifat resistensi serum. Resistensi terhadap serum sering ditunjukkan oleh isolat klinis *Enterobacter* yang berpengaruh pada timbulnya infeksi dan keparahan gejala. Hal tersebut dapat terjadi karena sistem serum bakterisidal mempunyai peran utama dalam mencegah mikroorganisme yang masuk untuk menyerang sel dan bertahan di dalam darah. Proses pertahanan tersebut dapat diganggu dengan adanya resistensi serum (Podschun *et al.*, 1998).

f. Siderofor

Pasokan besi yang disediakan oleh tubuh berperan untuk menghambat perkembangan bakteri yang berada di dalam jaringan tubuh. Pertumbuhan dan perkembangan bakteri selama proses infeksi membutuhkan besi yang berfungsi sebagai katalis redoks pada protein dalam proses transportasi oksigen dan elektron. Tubuh menyediakan suplai zat besi bebas dengan jumlah yang sangat rendah karena di intraseluler besi akan terikat dengan protein seperti hemoglobin, ferritin, hemosiderin, dan mioglobin, sedangkan di ekstraselular terikat dengan afinitas tinggi *iron-binding proteins* seperti laktoferin dan transferin. Suplai zat besi akan diambil bakteri dari tubuh manusia dengan cara mensekresi *high-affinity, low-molecular-weight iron chelators* yang disebut dengan siderofor. Siderofor secara kompetitif memiliki afinitas yang lebih tinggi untuk mengikat besi dibandingkan dengan afinitas protein. Terdapat dua kelompok siderofor yang akan disintesis oleh bakteri pada saat kekurangan besi yaitu siderofor *enterobactin* tipe fenolat dan siderofor *aerobactin* tipe hidroksamat. Kedua siderofor tersebut diduga memiliki kerjasama dalam pengikatan zat besi yaitu dengan cara siderofor *enterobactin* tipe fenolat mendapat zat besinya dari transferin sedangkan siderofor *aerobactin* tipe hidroksamat mendapat zat besinya langsung dari sel tubuh (Podschun *et al.*, 1998; Agustina, 2013).

2.1.7 Manifestasi Klinis

Manifestasi klinis dari *E. coli* tergantung pada lokasi infeksi. Strain satu dengan strain yang lain akan berbeda gejala atau tanda infeksi yang dihasilkan.

a. Infeksi Saluran Kemih

Infeksi saluran kemih yang mengenai kandung kemih disebabkan oleh sejumlah kecil tipe antigen O dan memproduksi secara spesifik faktor virulensi yang menyebabkan kolonisasi sehingga muncul infeksi klinis. Strain tersebut termasuk dalam *Uropathogenic E. coli* (UPEC). *Uropathogenic E. coli* secara khas merupakan strain penghasil hemolisin yang bersifat sitotoksik dan memfasilitasi invasi jaringan. Antigen K diekspresikan pada strain penyebab pielonefritis tersebut dan membentuk pilus spesifik yaitu fimbria P yang berikatan dengan antigen grup P darah (Jawetz *et al.*, 2013).

Protein adhesin dari UPEC dapat melekat pada sel saluran kemih inang. UPEC mempunyai adhesin pada permukaannya sebagai monomer, oligomer sederhana, atau komponen dari serat supramolekul yang disebut fimbriae atau pili (Hultgren *et al.*, 1996; Mulvey, 2002). Pili adhesin yang paling sering dikaitkan dengan UPEC yaitu pili tipe 1, P, S/F1C, dan Dr adhesin (Tabel 2.2) (Johnson, 1991; Mulvey, 2002).

b. Penyakit Diare Terkait *E. coli*

Sifat virulensi menentukan klasifikasi dari *E. coli* dan setiap strain menyebabkan penyakit diare melalui mekanisme yang berbeda. Gen pada plasmid mengkodekan sifat perlekatan pada sel epitel usus besar atau usus halus. Strain *E. coli* yang menjadi penyebab penyakit diare yaitu EPEC, ETEC, *Shiga toxin producing E. coli* (STEC), EIEC, dan EAEC (Jawetz *et al.*, 2013).

Tabel 2.2 Protein adhesin dan reseptor sel inang pada UPEC

Organel	Adhesin Spesifik	Reseptor Inang	Sel Inang	Manifestasi Klinis
Pili tipe 1	FimH	Mannosylated glycoproteins (e.g. UP1a and CD48), Tamm–Horsfall protein, kolagen tipe I dan IV, laminin, fibronektin	Sel epitel ginjal dan kandung kemih, sel bukal, eritrosit, sel mast, makrofag, neutrofil, matriks ekstraseluler	Sistitis, sepsis, meningitis
Pili P	PapG(I, II, III)	GbO3, GbO4, GbO5	Sel epitel ginjal, eritrosit	Pielonefritis
Pili S/FIC	SfaS, SfaA/FocH	Sialic acid residues, plasminogen/ β -GalNac-1,4-Gal	Sel epitel ginjal dan kandung kemih, eritrosit, sel endothelial	Ascending UTIs, sepsis, meningitis
Adhesin Dr	Various	DAF (CD55), CD66e, type IV collagen, α 5 β 1 integrin	Sel epitel ginjal dan kandung kemih, eritrosit, neutrofil, interstitial compartments of kidney	Sistitis, pielonefritis, diare, sepsis

Sumber: Mulvey, 2002

c. *Ventilator Associated Pneumonia (VAP)*

The Centers for Disease Control (CDC)/National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) mendefinisikan VAP sebagai pneumonia yang terjadi dalam kurang lebih dua hari dari pemberian ventilasi mekanik (MV) melalui *endotracheal tube (ETT)*. *Escherichia coli* termasuk bakteri yang dapat menyebabkan gejala-gejala klinis VAP (lihat pada Tabel 2.2). Kriteria untuk

mendiagnosis VAP didasarkan pada kombinasi temuan radiografi, laboratorium, dan klinis. Ketika ada penyakit pernapasan atau jantung yang mendasarinya seperti sindrom gangguan pernapasan, penyakit paru-paru kronis, atau paten duktus arteriosus, hasil radiografi menunjukkan infiltrat fokal baru atau progresif, konsolidasi, kavitas, atau pneumatocele. Temuan klinis dan laboratorium diperlukan untuk mendiagnosis VAP pada pasien usia di bawah satu tahun dengan adanya tiga dari beberapa kriteria yaitu ketidakstabilan suhu, leukopenia (≤ 4000 sel darah putih/ mm^3) atau leukositosis (≥ 15000 sel darah putih/ mm^3), sputum purulen onset baru atau perubahan karakter sputum, apnea atau takipnea atau retraksi dinding dada, *wheezing* atau *rales* atau ronki, dan/atau bradikardi (< 100 denyut/menit) atau takikardi (> 170 denyut/menit) (Hooven dan Polin, 2019).

Tabel 2.3 Bakteri-bakteri patogen penyebab *ventilator associated pneumonia*

VAP Pathogens Ranked From Most Common to Least Common
Pathogen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enterobacter spp. <i>Klebsiella</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Citrobacter</i> spp. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Group B <i>Streptococcus</i>

Sumber: Hooven dan Polin, 2019

2.2 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya. Protein dari SDS-PAGE memiliki banyak pengaplikasian termasuk penentuan berat molekul, penentuan kemurnian sampel, ekspresi kuantifikasi, *western blotting* (*immunoblotting*), dan pengisolasian protein untuk pengurutan peptida

atau sebagai penghasil antibodi. Ada dua metode pada elektroforesis yaitu DNA *agarose gel electrophoresis* dan SDS-PAGE. Kedua metode tersebut memiliki kesamaan yaitu berfungsi sebagai pemisah molekul berdasarkan ukuran yang menggunakan perbedaan muatan listrik (Carson *et al.*, 2019).

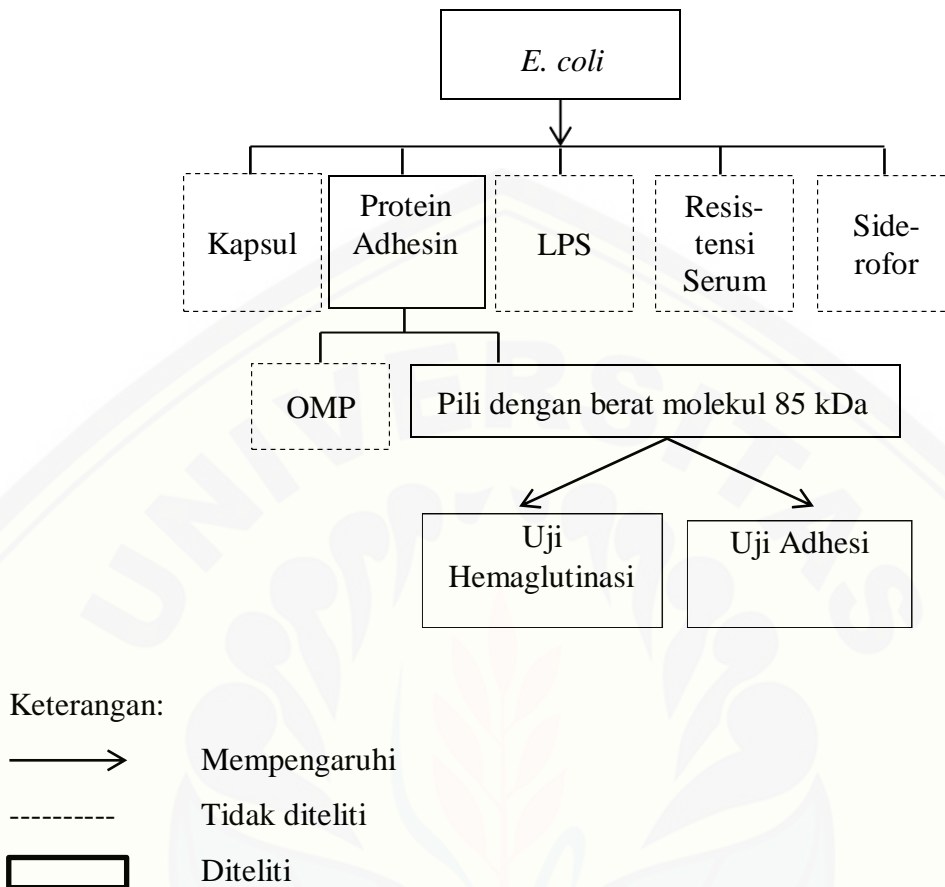
2.3 Aglutinasi

Pengikatan antara antibodi dan hasil partikulat antigen dalam penggumpalan disebut aglutinasi. Infeksi bakteri menginduksi produksi antibodi serum spesifik terhadap permukaan antigen sel bakteri. Adanya antibodi tersebut dapat dideteksi oleh reaksi aglutinasi bakteri. Serum dari pasien yang terinfeksi bakteri dilakukan pengenceran bertingkat di dalam *microplate* v. Tabung terakhir yang mengalami aglutinasi menunjukkan titer serum antibodi pasien. Contoh dua seri pengenceran serum disiapkan dan jika pengenceran 1/640 menunjukkan aglutinasi tetapi pengenceran 1/1280 tidak maka titer serum pasien adalah 1/640 (Goldsby, 2007).

2.4 Enterosit

Enterosit memiliki peran yang jelas dalam pencernaan dengan memastikan penyerapan ion, air, nutrisi, vitamin, dan penyerapan garam empedu yang tidak terkonjugasi. Enterosit tidak hanya melibatkan proses kimiawi makanan tetapi juga induksi imunologis terhadap protein yang dicerna. CD23 adalah molekul yang biasanya ada pada permukaan enterosit, baik pada manusia maupun pada tikus. Transfer IgE yang besar dimediasi CD23 dari basal ke apikal enterosit ditemukan pada individu yang alergi, diikuti oleh pengikatan alergen intraluminal dan kembalinya kompleks antigen-antibodi dalam lamina propia yang memungkinkan aktivasi sel mast. Mencit yang mengalami imunodefisiensi kombinasi berat memiliki persentase enterosit yang terinfeksi lebih tinggi mencapai konsentrasi patogen terbesar dalam epitel usus (Miron, 2012).

2.5 Kerangka Konsep Penelitian



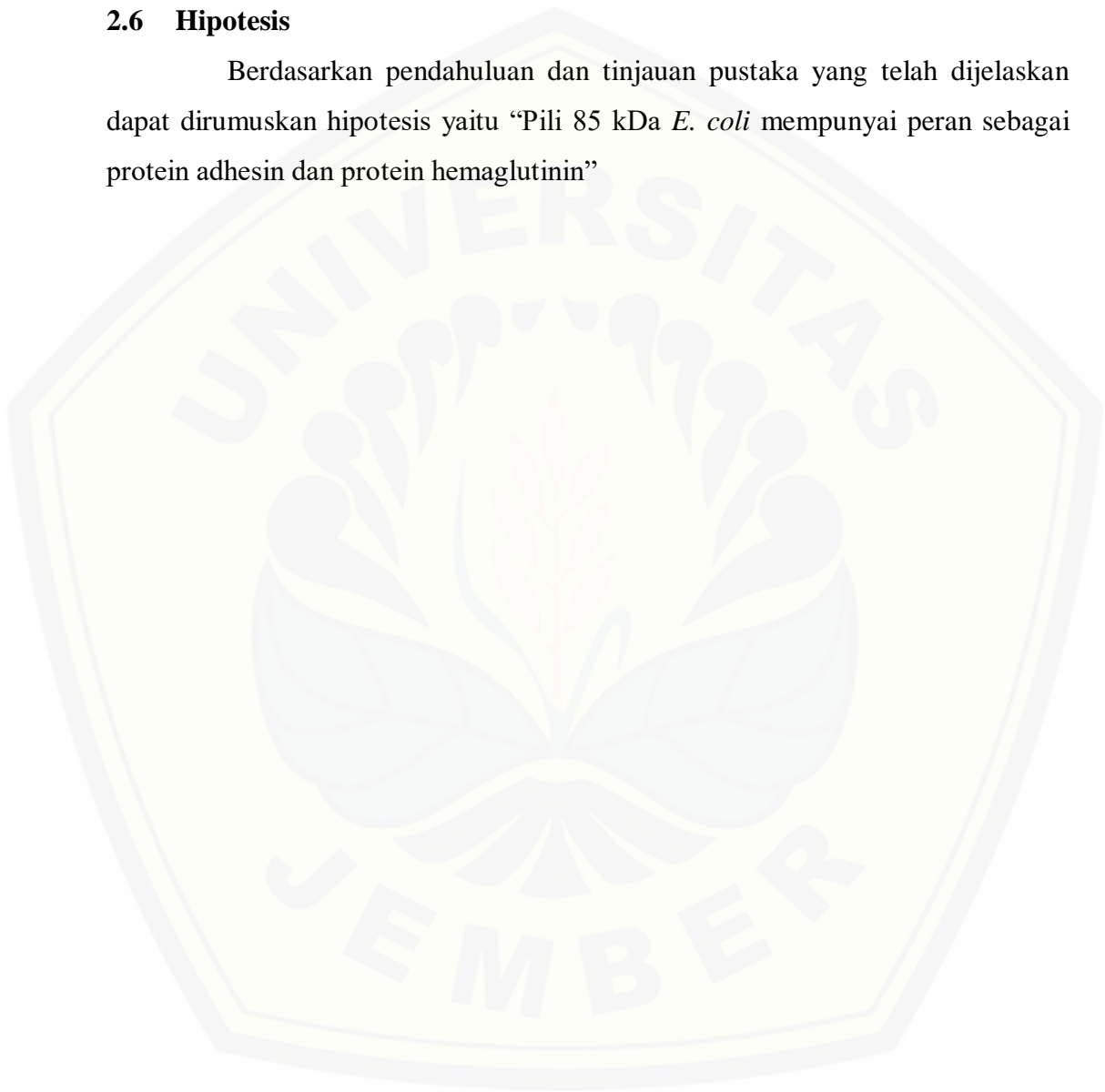
Gambar 2.3 Skema kerangka konsep

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki faktor-faktor virulensi dalam menyebabkan penyakit pada sel inang. Faktor virulensi tersebut yaitu kapsul, protein adhesin, lipopolisakarida (LPS), resistensi serum, dan siderofor. Diantara kelima faktor tersebut, salah satu faktor yang penting adalah protein adhesin. Pada *E. coli*, protein adhesin terdiri dari fimbrial protein (pili) dan afimbrial protein (OMP). Pili merupakan salah satu faktor virulensi penting yang memiliki peran dalam proses hemaglutinasi, adhesi, kolonisasi, dan invasi ke dalam sel inang. Untuk mengetahui peran dari pili tersebut, pili diidentifikasi terlebih dahulu berat molekulnya menggunakan SDS-PAGE. Hasil dari elektroforesis tersebut berupa *band* (pita) pili yang terdiri dari beberapa berat molekul, kemudian pilih pili yang memiliki berat molekul 85 kDa. Pili dengan berat molekul 85 kDa tersebut kemudian dilakukan uji hemaglutinasi

menggunakan darah merah mencit dan uji adhesi menggunakan enterosit mencit untuk membuktikan bahwa pili tersebut memiliki peran sebagai protein hemaglutinin dan protein adhesin.

2.6 Hipotesis

Berdasarkan pendahuluan dan tinjauan pustaka yang telah dijelaskan dapat dirumuskan hipotesis yaitu “Pili 85 kDa *E. coli* mempunyai peran sebagai protein adhesin dan protein hemaglutinin”



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan menggunakan jenis penelitian eksperimental. Penelitian ini dilakukan dengan mendapatkan pili berat molekul 85 kDa dari bakteri *E. coli* dan akan dilakukan karakterisasi menggunakan uji adhesi serta hemaglutinasi. Tahap-tahap penelitian ini terdiri dari:

3.1.1 Tahap Isolasi Pili

Tahap ini dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan pili dengan berat molekul 85 kDa dari bakteri *E. coli*.

3.1.2 Tahap Uji Hemaglutinasi

Tahap ini bertujuan untuk mengetahui bahwa pili dengan berat molekul 85 kDa merupakan suatu protein hemaglutinin.

3.1.3 Tahap Uji Adhesi

Tahap ini bertujuan untuk mengetahui bahwa pili dengan berat molekul 85 kDa merupakan suatu protein adhesin. Analisis pada tahap ini dilakukan untuk membandingkan titer pengenceran pili dan indeks adhesi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Waktu yang diperlukan untuk melakukan penelitian yaitu selama tiga bulan dimulai dari bulan September 2019 hingga Desember 2019.

3.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang diambil adalah stok bakteri *E. coli* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember

3.4 Instrumen Penelitian

3.4.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada saat melakukan penelitian yaitu *object glass*, *cover glass*, *beaker glass*, labu Erlenmeyer, tabung reaksi, tabung *falcon*, tabung *ependorf*, *plate*, ose bulat, ose lurus, botol Scoth, mikroskop, SDS-PAGE, autoklaf, sterilisator, inkubator, *shaking incubator*, *shaking waterbath*, sentrifus, spektrofotometri, *microplate V*, seperangkat alat elektroelusi, seperangkat alat dialisis, *dialisa tube*, vortex, *magnetic stirrer*, kompor listrik, bunsen, timbangan digital, *refrigerator*, pipet tetes, pipet ukur, dan *micropipette*.

3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada saat melakukan penelitian yaitu:

- A. Bakteri: isolat *E. coli*
- B. Media pembiakan bakteri: Media *Nutrient Broth* (NB), *Nutrient Agar* (NA), *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA), serbuk gula (glukosa, laktosa, maltosa, mannitol, dan sukrosa), *Sulfide Indole Motility* (SIM), *Methyl Red-Voges Proskauer* (MR-VP), *Citrate* (uji sitrat), *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)
- C. Pewarnaan Gram
- D. Hewan coba: mencit strain BALB/C
- E. Reagen kimia: *Phosphate Buffered Saline* (PBS), *Trichloroacetic Acid* (TCA), *n-octyl- β -Dglucopyranoside* (NOG), *buffer sample*, *dithiothretiol* (DTT), *Bromophenol Blue*, *Commassie Brilliant Blue R-250*, membran nitroselulosa, *Ethylenediaminetetraacetic Acid* (EDTA), aquades, reagen Kovac, reagen MR, dan reagen VP.
- F. Minyak emersi

3.5 Batasan Operasional

3.5.1 Variabel

Variabel pada penelitian ini yaitu:

- a. Variabel independen : Titer pili 85 kDa
- b. Variabel dependen : - Hemaglutinasi
- Indeks adhesi

3.5.2 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Jenis Data
Titer pili	Protein dinding luar yang dibuat dengan berbagai pengenceran dan ditambahkan pada sediaan sel enterosit	<i>Micropipette</i>	Menghitung konsentrasi pili tiap titer pengenceran	Kuantitatif	Rasio
Hemaglutinasi	Kemampuan pili dalam menggumpalkan eritrosit pada beberapa pengenceran	<i>Micropipette V</i>	Identifikasi adanya proses aglutinasi pada eritrosit	Kualitatif	Nominal
Indeks adhesi	Jumlah rata-rata bakteri yang menempel pada setiap 100 enterosit	Mikroskop perbesaran 1000x	Menghitung jumlah bakteri yang menempel pada enterosit dengan perbesaran 1000x	Kuantitatif	Rasio

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Identifikasi Bakteri *E. coli*

Bakteri *E. coli* yang didapat ditanam pada media *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA) dilakukan pewarnaan gram. Setelah tetesan terakhir menggunakan safranin, preparat didiamkan selama 45 detik sampai satu menit lalu keringkan menggunakan tisu dengan tidak mengusap bagian atas *object glass*. Setelah pewarnaan gram, preparat dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Identifikasi kemudian dilanjutkan dengan uji biokimia menggunakan fermentasi karbohidrat, SIM (*Sulfide Indole Motility*), atau tes TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*). *Sulfide Indole Motility* menunjukkan hasil positif pada indol dengan menunjukkan warna merah pada media dan kekeruhan di sekitar tusukan yang menandakan hasil uji motilitas positif. TSIA menunjukkan hasil positif dengan adanya perubahan pada media menjadi kuning yang menandakan kondisi asam (Romadhon, 2016).

3.6.2 Kultur dan Isolasi Pili *E. coli*

Escherichia coli diambil dari media *Eosin Methylen Blue Agar* untuk ditanam pada *Nutrient Slant* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Hasil kultur diinokulasi ke tabung Erlenmeyer 500 mL yang mengandung larutan BHI Broth dan diinkubasi selama 24 jam. Bakteri sebanyak 10 mL dituangkan ke dalam 50 botol 250 mL yang sudah mengandung 25 mL media TCG dan diinkubasi pada 37°C selama 48 jam. Media TCG berfungsi sebagai media untuk memperbanyak pili bakteri. Selanjutnya, kultur *E. coli* dikumpulkan bersama dalam tabung Erlenmeyer 1000 mL dan siap untuk pemotongan pili (Sukarjati *et al.*, 2018).

3.6.3 Pemotongan Pili *E. coli*

Pili *E. coli* yang siap dipotong dimasukkan ke *pili cutter*. Pili dilakukan dengan menggunakan alat *pili cutter* pada 4 °C 3000 rpm selama 30 detik. Sampel disentrifugasi pada 4 °C, 6000 rpm selama 15 menit. Supernatan dikumpulkan dalam tabung dan pelet disuspensi menggunakan PBS pH 7,4 dengan

perbandingan 1: 1. Pemotongan tersebut diulang hingga 5 kali. Selanjutnya, supernatan disentrifugasi dalam 4 °C 12000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan supernatan dan pelet (Sukarjati *et al.*, 2018).

Pili yang diperoleh didialisis dengan menggunakan larutan PBS pH 7,4 pada 4 °C selama 2 x 24 jam untuk menghilangkan TCA yang tersisa. Hasil dialisis diendapkan menggunakan 35% amonium sulfat dan disentrifugasi 6000 rpm 4°C. Supernatan kemudian dibuang dan pelet dicampur dengan PBS secukupnya serta dialisis dilakukan kembali. Hasil dialisis merupakan pili protein dan disimpan pada suhu -20 °C untuk digunakan tahap selanjutnya (Sukarjati *et al.*, 2018).

3.6.4 Identifikasi Berat Molekul Pili (SDS – PAGE)

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) digunakan untuk mengidentifikasi berat molekul pili *E. coli*. Saat proses elektroforesis, gel yang digunakan adalah *mini slab* 12,5% dan *stacking gel* 4%. *Protein marker* yang digunakan adalah *stained broad range*. Pada proses pewarnaan gel atau *staining* menggunakan bahan pewarna *Commasie Brilliant Blue R-250*. Pada saat *running* elektroforesis dengan SDS-PAGE, *voltase* yang digunakan sebesar 120 mV dengan arus 400 mA dan *dirunning* selama 90 menit Hasil sampel pili *E. coli* diambil sebanyak 500 µL setelah didialisis. Kemudian sampel ditambahkan dengan 500 µL *buffer sample* (warna pelacak *Bromophenol Blue*). Setelah ditambahkan *buffer sample*, sampel dipanaskan di air pada suhu 100 °C selama 5 menit (Sukarjati *et al.*, 2018).

3.6.5 Pemurnian Pili *E. coli*

Berat molekul gel hasil SDS-PAGE dihitung kemudian dipotong lurus sesuai dengan berat molekul yang diinginkan. Hasil potongan *band* pada gel dikumpulkan kemudian dimasukkan ke lembar *nitroselulosa* untuk dilakukan elektroelusi menggunakan alat elektroforesis horizontal dengan *running buffer*. Tegangan elektroforesis yang dibutuhkan sebesar 125 mV selama 2 jam. *Beaker glass* yang berisi 1 liter PBS steril pH 7,4 disiapkan untuk dialisis hasil

elektroforesis dan diberi *magnetic stirrer* kemudian diletakan di kulkas selama 2x24 jam. Dalam 48 jam dialisis tersebut, PBS steril diganti sebanyak 2 kali. Cairan hasil dari dialisis selama 48 jam siap untuk dilakukan uji hemaglutinasi (Sukarjati *et al.*, 2018).

3.6.6 Isolasi Eritrosit Mencit

Darah sebanyak 1 L dikumpulkan dalam tabung yang berisi 3 mL natrium sitrat 3,5% dengan EDTA (1 mg / ml) dan disentrifugasi selama 10 menit pada 4 °C. Plasma dan leukosit dihilangkan dan eritrosit diresuspensi serta dicuci 3 kali dalam buffer PBS-glukosa dengan volume lima kali lipat lebih banyak (138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ dan 5 mM glukosa, pHH 7.4). Kondisi pencucian sentrifugasi sama dan pelet dibilas dengan buffer setiap kali untuk menghilangkan lapisan leukosit (Belosludtsev, 2018).

3.6.7 Uji Hemaglutinasi

Metode dari Li *et al.* (1999) digunakan untuk melakukan uji hemaglutinasi. Serial pengenceran pada *microplate V shape* dibuat untuk pengenceran protein pili dimana setiap sumur volumenya 50 µl. Pengenceran dilakukan dengan cara menambahkan 50 µl PBS secara bertingkat atau serial pada tiap sumuran yaitu 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1.024 dan menambahkan 50 µL pili pada sumuran pertama. Selanjutnya ambil campuran pada sumuran pertama sebanyak 50 µL lalu diencerkan ke sumuran berikutnya hingga sumuran terakhir. Darah merah mencit 0,5% sebanyak 50 µL ditambahkan di setiap sumuran dengan volume yang sama. Letakkan *microplate V shape* pada *rotator plate* selama 1 menit kemudian biarkan pada suhu kamar dalam waktu 1 jam dan amati. Pengamatan adanya aglutinasi eritrosit dari pengenceran yang tertinggi hingga terendah dilakukan untuk menentukan besarnya titer (Li *et al.*, 1999).

3.6.8 Isolasi Enterosit Mencit

Metode Weisser digunakan untuk mengisolasi enterosit mencit. Mencit

betina galur BALB/C merupakan galur mencit yang akan digunakan pada metode ini. Mencit dianestesi menggunakan kloroform pada *beaker glass*, kemudian dilakukan pembedahan dengan tujuan mengambil enterosit pada bagian usus halus. Usus halus mencit dibuka dan dibersihkan dari kotoran lalu dipotong kecil-kecil. Lalu usus halus mencit dicuci dengan PBS steril pH 7,4 yang terdapat 1 mM DTT pada suhu 4 °C. Setelah dicuci, enterosit dimasukkan ke dalam cairan yang mengandung PBS pH 7,4 kemudian diletakkan pada *shaking waterbath* selama 15 menit dengan suhu 37 °C. Supernatan dibuang dan jaringan yang mengendap dipindahkan ke dalam cairan PBS pH 7,4 yang terdapat 1,5 mM EDTA dan 0,5 mM DTT. Jaringan tersebut diletakkan pada *shaking waterbath* lagi selama 15 menit dengan suhu 37 °C, kemudian supernatan yang dihasilkan dibuang. Cuci kembali jaringan yang mengendap dengan PBS lalu disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 1000 rpm dan diulang sebanyak tiga kali. Endapan hasil sentrifus (jaringan enterosit) ditambahkan dengan PBS steril. Enterosit tersebut dianalisis menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 560 nm hingga mencapai konsentrasi 10^6 /mL untuk selanjutnya siap dilakukan uji adhesi (Nagayama *et al.*, 1995).

3.6.9 Uji Adhesi

Metode yang dimodifikasi oleh Nagayama *et al.* (1995) digunakan untuk melakukan uji adhesi dengan cara mengkultur bakteri *E. coli* dalam *lactose broth* pada suhu 37 °C selama 24 jam. Bakteri hasil kultur disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit untuk mendapatkan panen dari bakteri tersebut. Endapan hasil sentrifus ditambahkan PBS dan konsentrasi bakteri dibuat 10^8 /mL menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 600 nm. Proses selanjutnya adalah preparasi dosis pili dengan cara membuat beberapa pengenceran mulai dari 0 (kontrol), 1/10, 1/100, 1/1000, dan 1/10000. Suspensi enterosit diberikan pada setiap dosis sebanyak 300 μ l lalu digoyang perlahan pada *shaking incubator* pada suhu 37 °C selama 30 menit.

Suspensi bakteri *E. coli* ditambahkan pada setiap campuran antara pili dan suspensi enterosit tersebut sebanyak 300 μ l lalu diinkubasi pada inkubator

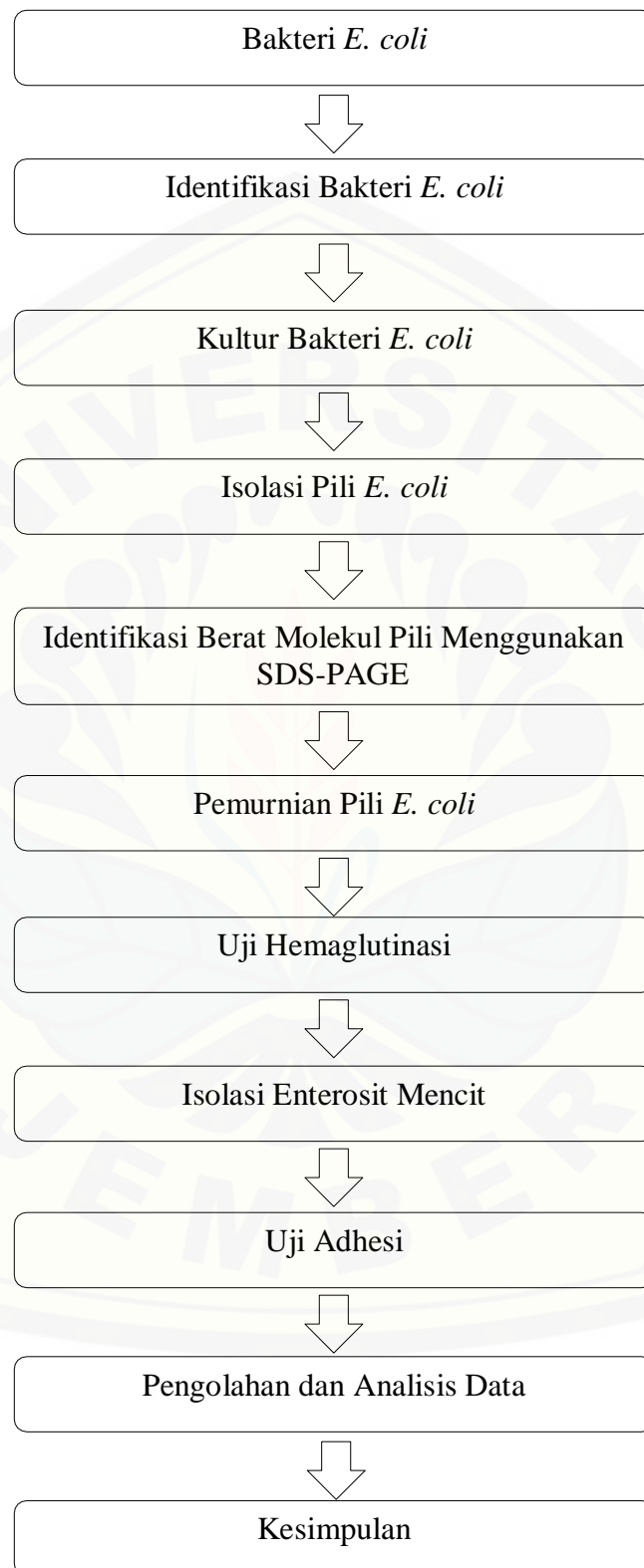
pada suhu 37 °C selama 30 menit. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm pada suhu 4 °C selama 3 menit. Cuci sebanyak dua kali endapan hasil sentrifus tersebut menggunakan PBS. Endapan diambil dan dibuat preparat hapusan pada *object glass* yang selanjutnya diwarnai dengan pewarnaan Gram. Preparat yang telah dilakukan pewarnaan gram selanjutnya diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali dan dihitung jumlah bakteri yang menempel pada enterosit untuk mengetahui indeks adhesi. Indeks adhesi adalah jumlah rata-rata bakteri yang menempel pada epitel dan penghitungannya dilakukan pada 100 epitel enterosit (Nagayama *et al.*, 1995).

3.4 Analisis Data

Data penelitian adanya protein hemaglutinin dan adhesin pada pili 85 kDa *E. coli* dikerjakan secara deskriptif. Sedangkan pada perhitungan hubungan antara dosis pili 85 kDa *E. coli* dengan indeks adhesi dilakukan analisis data menggunakan uji statistik korelasi – regresi dengan batas signifikan 0,05 ($p < 0,05$) yang sebelumnya telah dilakukan uji normalitas (Dahlan, 2008).

3.5 Alur Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai dari identifikasi bakteri *E. coli* yang telah didapatkan lalu dilanjutkan dengan proses kultur bakteri *E. coli*. Kemudian dilakukan isolasi pili dan identifikasi berat molekul pili menggunakan elektroforesis SDS- PAGE. Setelah dilakukan identifikasi berat molekul dan didapatkan pili dengan berat molekul 85 kDa, pili 85 kDa dilakukan uji hemaglutinasi dan uji adhesi. Data yang diperoleh kemudian dilakukan analisis data dan penarikan kesimpulan.



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Protein pili 85 kDa bakteri *E. coli* memiliki sebagai protein adhesin dan tidak memiliki peran sebagai protein hemagglutinin.

5.2 Saran

- a. Peran protein pili 85 kDa *E. coli* sebagai protein adhesin dapat dikembangkan dengan uji secara in vivo untuk mengetahui adanya respon imun pada jaringan inang
- b. Hasil penelitian protein pili 85 kDa *E. coli* sebagai protein adhesin dapat dijadikan sebagai dasar penelitian selanjutnya terhadap upaya pengembangan vaksin *E. coli* berbasis protein
- c. Hasil penelitian dapat dilanjutkan dengan tahapan uji pre-formulasi (uji imunogenitas), uji stabilitas (uji potensi), studi toksikologi (uji pre-klinis), dan uji klinis (*clinical trials*)

DAFTAR PUSTAKA

Abrar, M., Wibawan, I.W.T., Priosoeryanto, B.P., Soedarwanto, M., dan Pasaribu, F.H. 2013. Peranan hemaglutinin *Staphylococcus aureus* dalam proses adhesi pada sel epitel ambing sapi perah. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 7(1) : 43-46.

Abrar, M. 2009. Peranan hemaglutinin *Escherichia coli* dalam proses adhesi. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 3(1):194-198.

Agustina, D. 2013. Respons imunoglobulin G terhadap protein hemaglutinin pili *Klebsiella pneumoniae* berat molekul 12,8 kDa sebagai protein adhesin. *Tesis*. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Agustina, D., Nadyatara, K., Mufida, D.C., Elfiah, U., Shodikin, M.A., Suswati, E. 2019. Faktor Virulensi *Outer Membrane Protein* 20 kDa *Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemaglutinin dan Adhesin. *eJKI* 7(3): 200-204

Antão, E.M., Wieler, L.H., dan Ewers, C. 2009. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *BioMed Central*. 1(22) : 1-12.

Balia, R.T., Harlia, E., dan Suryanto, D. 2011. Deteksi *Coliform* pada daging sapi giling spesial yang dijual di Hipermarket Bandung. Universitas Padjadjaran. Bandung.

Carson, S., Miller, H. B., Witherow, D. S., dan Srougi, M. C. (2019). Expression of fusion protein from positive clones, SDS-PAGE and Western Blot: Part I. *Molecular Biology Techniques*, 75–82.

Dita, R.F., Agustina, D., Rachmawati, D.A., Suswati, E., Mufida, D.C., dan Shodikin, M.A. 2019. Peran protein pili 38,6 kDa *Klebsiella pneumoniae* sebagai protein hemaglutinin dan adhesin yang berfungsi sebagai faktor virulensi. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*. 5(2):1-8

Duffy, G. 2014. *Escherichia coli* Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), including Non-O157. *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd Edition). 713-717

Ehara, M., M. Ishibashi, Y. Ichinose, M. Iwanagat, S. Shimotorit, dan T. Naito. 1987. Purification and partial characterization of fimbriae of *Vibrio cholerae* O1. *Vaccine*. 5: 283-288.

Evans, D. G., D. J. Evans Jr., J. J. Moulds, dan D. Y. Graham. 1988. N-acetylneuraminyllactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a putative colonization factor antigen. *Infection and Immunity*. 56(11): 2896-2906.

Firani, N., Sumarno, Kumboyono. 2013. Pengembangan Kandidat Vaksin Oral Berbasis Protein Adhesin BM 38kD *M. tuberculosis* pada Kondisi Malnutrisi. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*.

Fitrawati, F., Wibowo, M.H., Amanu, S., Sutrisno, B. 2015. Isolasi dan Identifikasi *Egg Drop Syndrome Virus* dengan Uji Hemaglutinasi dan Hemaglutinasi Inhibisi. *Jurnal Sain Veteriner*. 33(1): 59-68

Gerlach, R. dan Hensel, M. 2007. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(6), 401-415.

Greenwood, D., Slack, R., Peutherer, J., dan Barer, M. 2007. *Medical Microbiology*. 17th Ed. Philadelphia : Elsevier Limited

Hahn, E., Wild, P., Schraner, E.M., Bertschinger, H.U., Haner, M., Muller, S.A., dan Aebi, U. 2000. Structural analysis of F18 fimbriae expressed by porcine toxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Structural Biology*. 132, 241-250

Hidayati, D., 2010. Identifikasi molekul pili *Pseudomonas aeruginosa* pada Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) culture. *Jurnal of Experimental Life Science*. ISSN: 2087-2852.

Hooven, T.A. dan Polin, R.A. 2019. *Chapter 8 - Ventilator-Associated Pneumonia*. The Newborn Lung. 3rd Ed, 147-159

Husna, C. A. 2018. Peranan protein adhesi matriks ekstraselular dalam patogenitas bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Averrous*. 4(2) : 1-12

Huttner, A., & Gambillara, V. 2018. The development and early clinical testing of the ExPEC4V conjugate vaccine against uropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*.

Indriani, R. dan Dharmayanti, N.L.P.I. 2016. Respon Titer Antibodi dan Proteksi Virus Newcastle Disease Genotype I,II, VI, dan VII sebagai Vaksin terhadap Infeksi Isolat Virus Newcastle Disease Chicken/Indonesia/GTT/11. *Jurnal Biologi Indonesia*. 12(2): 211-218

Jasmadi, Haryani, Y., dan Jose, C. 2014. Prevalensi bakteri *Coliform* dan *Escherichia coli* pada daging sapi yang dijual di pasar tradisional dan pasar modern di Kota Pekanbaru. *JOM FMIPA*. 1(2) : 1-9

Jawetz, Melnick, dan Adelberg. 2013. *Mikrobiologi Kedokteran*. 25th Ed. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC

La Ragione, R. dan Woodward, M. 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Research in Veterinary Science*, 73(1), 27-35

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

Levinson, W. 2012. *Review of Medical Microbiology and Immunology*. 12th Ed. United States of America : The McGraw-Hill Companies

Li, X., D. E. Johnson, dan H. L. T. Mobley. 1999. Requirement of MrpH for mannose-resistant *Proteus*-like fimbria-mediated hemagglutination by *Proteus mirabilis*. *Infection and Immunity*. 67(6): 2822–2833.

Luyt, C.E, Hekimian, G., Koulenti, D., dan Chastre, J. 2018. Microbial cause of ICU-acquired pneumonia : hospital-acquired pneumonia versus ventilator-associated pneumonia. *Wolters Kluwer Health*. 24(5) : 332-338.

McCracken, V. J. dan R. G. Lorenz. 2001. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cellular Microbiology*. 3(1): 1-11.

Mubarokah, S.N., Sumarno, Muliarta, I.K.G. 2009. *Outer Membrane Protein* 49,4 kDa dari *Porphyromonas gingivalis* merupakan Protein Hemagglutinin dan Adhesin terhadap Netrofil. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 25(2): 49-59

Mufida, D. C., C. Bumi, dan H. Fatmawati. 2009. Peran protein membran luar 55 kDa *Salmonella typhi* isolat Jember sebagai protein hemagglutinin dan adhesin. *Journal of Biological Researches*. 15(1): 11-16.

Mulvey, M.A. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*. 4(5), 257-271

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., dan Pfaller, M.A. 2013. *Medical Microbiology*. 7th Ed. Philadelphia : Elsevier Saunders

Nachammai, S.M., Jayakumar, K., Suresh, V., Kousalya, M., Aravazhi, A.N. 2016. Haemagglutination and Resistance to the Bactericidal Activity of Serum as the Urovirulence Markers of Uropathogenic *Escherichia coli*. *International of Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. (5)9: 514-523

Nagayama, K., T. Oguchi, M. Arita, dan T. Honda. 1995. Purification and characterization of a cell-associated hemagglutinin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*. 63(5): 1987–1992.

Paczosa, M. K. dan J. Mecsas. 2016. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80(3): 629–661.

Patel, S., Mathivanan, N., dan Goyal, A. 2017. Bacterial adhesin, the pathogenic weapons to trick host defense arsenal. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 93, 763-771

Podschun, R. dan U. Ullmann. 1998. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors.

Poolman, J.T. 2017. *Escherichia coli*. *International Encyclopedia of Public Health 2nd edition*. 2 : 583-593.

Romadhon, Z. 2016. Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella sp* pada Siomay yang Dijual di Kantin SD Negeri di Kelurahan Pisangan, Cirendeu, dan Cempaka Putih. *Skripsi* . Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah.

Santoso, S. 2002. Protein Adhesin *Salmonella typhi* sebagai Faktor Virulensi Berpotensi Imunogenik pada Produksi S-IgA Protektif. *Tesis*. Surabaya. Universitas Airlangga

Seo, H., Nandre, R.M., Nietfeld, J., Chen, Z., Duan, Q., Zhang, W. 2019. Antibodies Induced by Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Adhesin Major Structural Subunit and Minor Tip Adhesin Subunit Equivalently Inhibit Bacteria Adherence *In Vitro*. *PLOS ONE*. 14(5): 1-16

Souza-Oliveira, A.C, Cunha, T.M., Passos, L.B.D.S., Lopes, G.C., Gomes, F.A., dan Röder, D.V.D.D.B. 2016. Ventilator-associated pneumonia : the influence of bacterial resistance, prescription errors, and de-escalation of antimicrobial therapy on mortality rates. *Sociedade Brasileira De Infectologia*. 611 : 1-7.

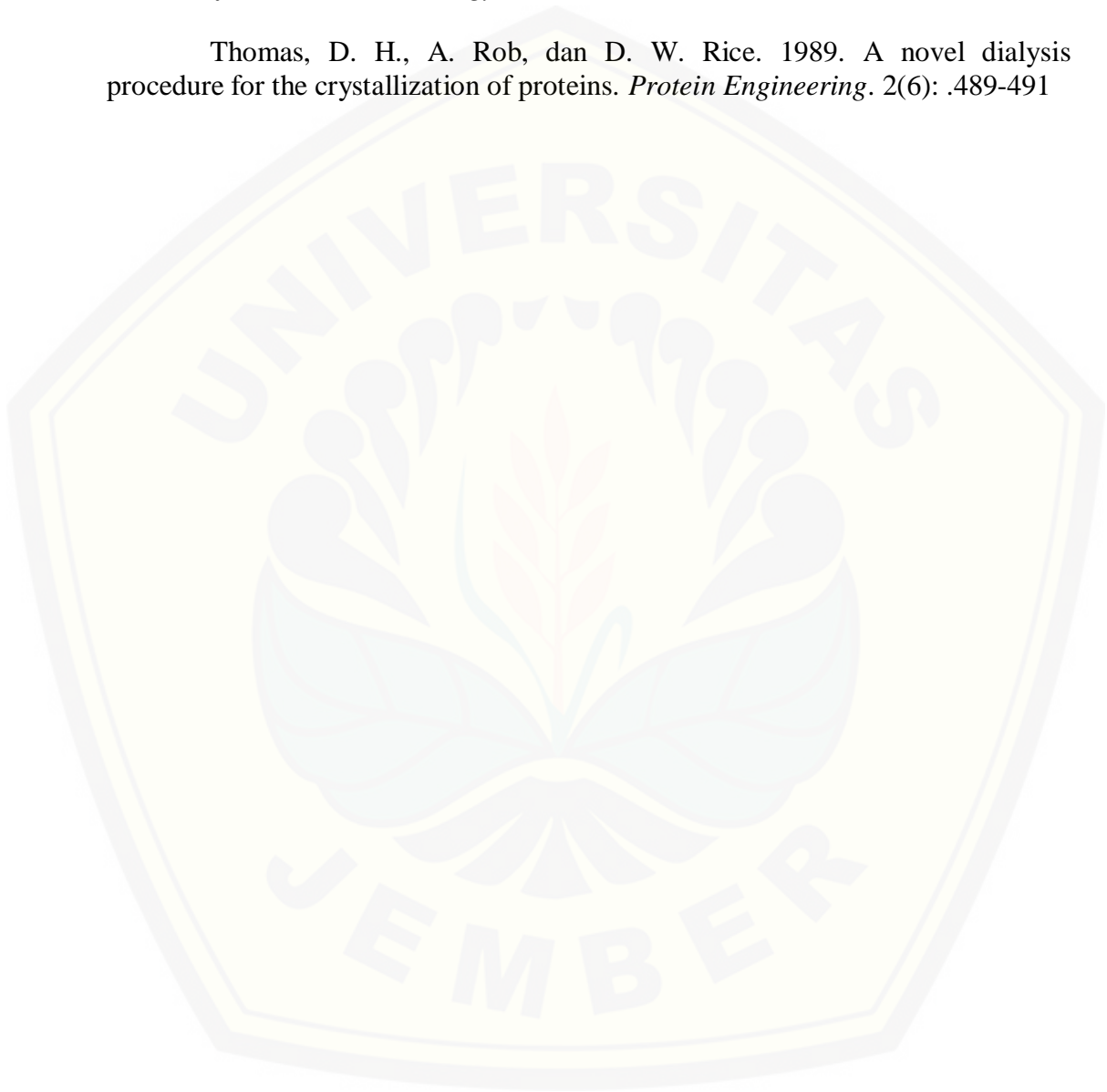
Sukarjati, Amilah, S., dan Sudjarwo. 2019. Toxicity of 32,2 kDa MW *Escherichia coli* pili adhesin isolated from infertile male semen in reproductive system. *Fol Med Indones*. 55(3) : 188-197

Syahrurachman, A., A. Chatim, A. Soebandrio, A. Karuniawati, A. U. S. Santoso, M. F. Harun, B. Bela, F. Soemarsono, H. A. Rahim, H. Karsinah, L. Isjah, L. H. Moehario, Mardiasuti, M. Lintong, M. Triyatni, N. Asmono, P. Sudarmono, R. I. Sastrosoewignjo, R. Utji, R. Sardjito, S. Josodiwondo, Suharto, S. Sumaatmadja, Sujudi, S. Assani, T. Hutabarat, T. M. Sudiro, U. Warsa. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi Revisi. Tangerang: Binarupa Aksara Publisher.

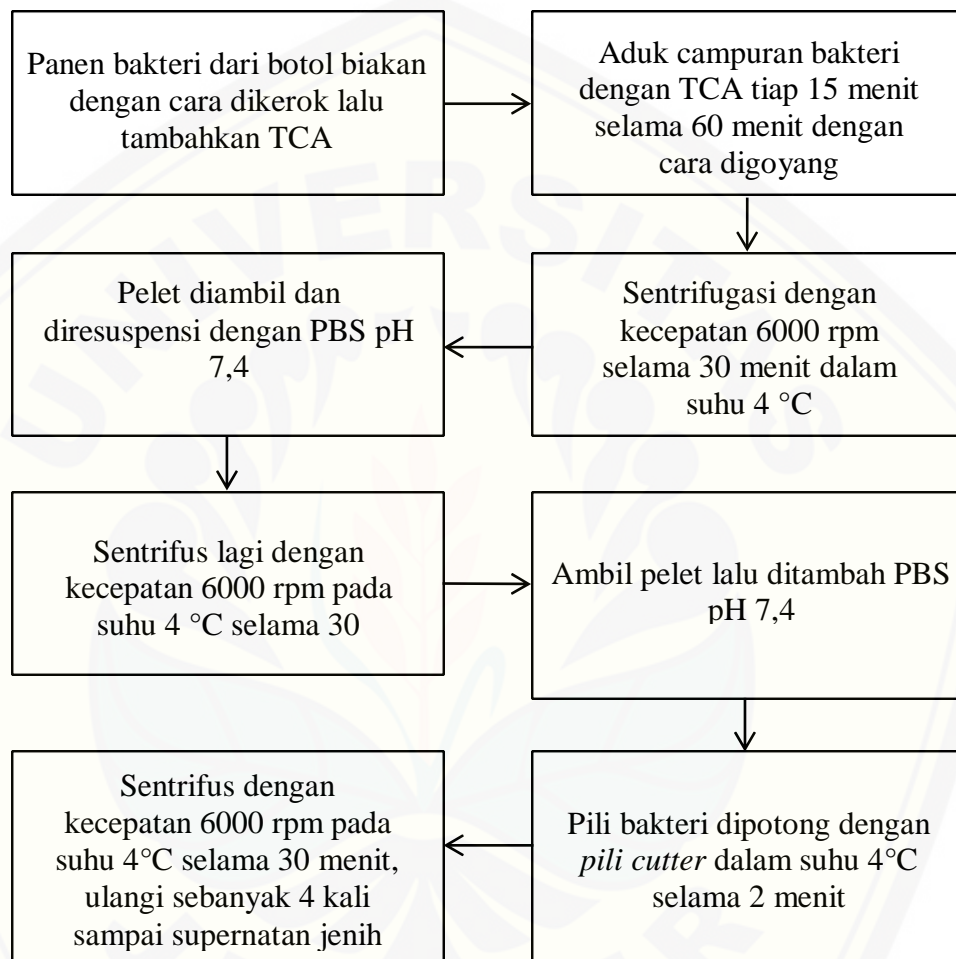
Tang, F. dan Jr, M.H.S. 2014. Transport protein promoting *Escherichia coli* pathogenesis. *Microbial Pathogenesis*. 71-72, 41-45

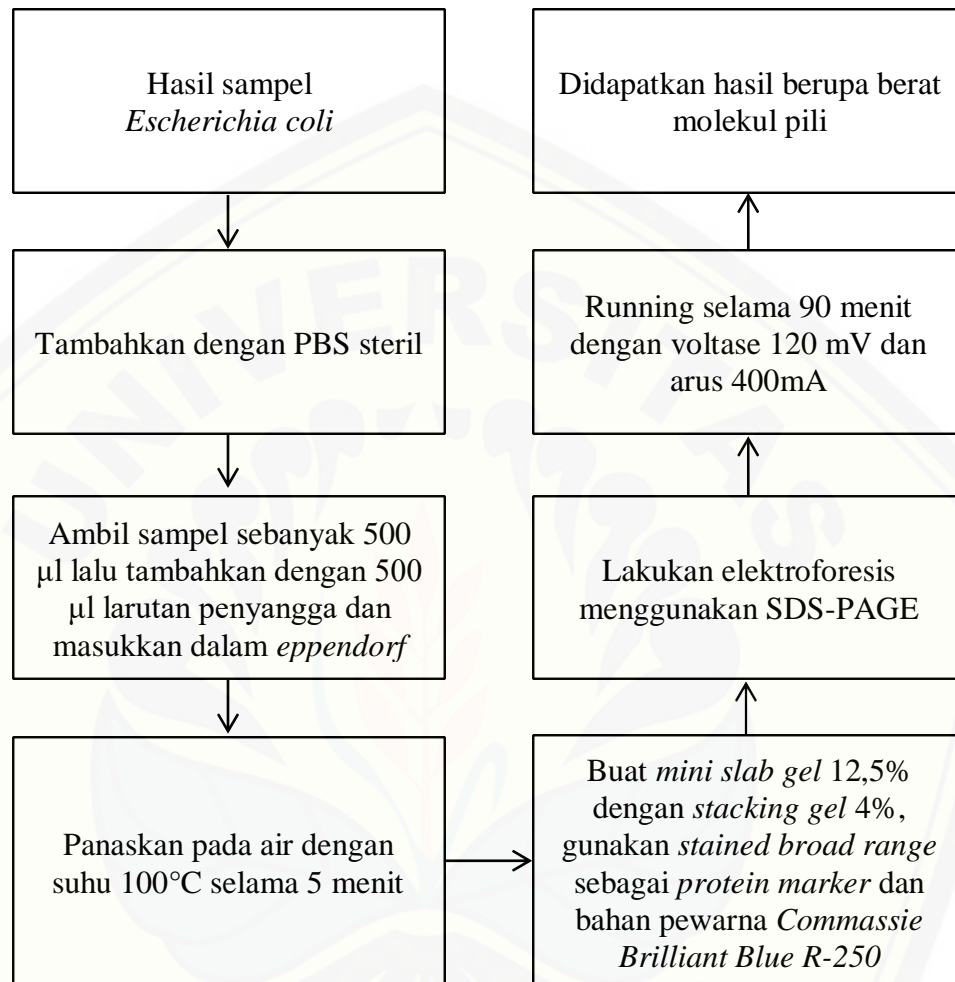
Tapader, R., Basu, S., dan Pal, A. 2019. Secreted proteases: a new insight in the pathogenesis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*

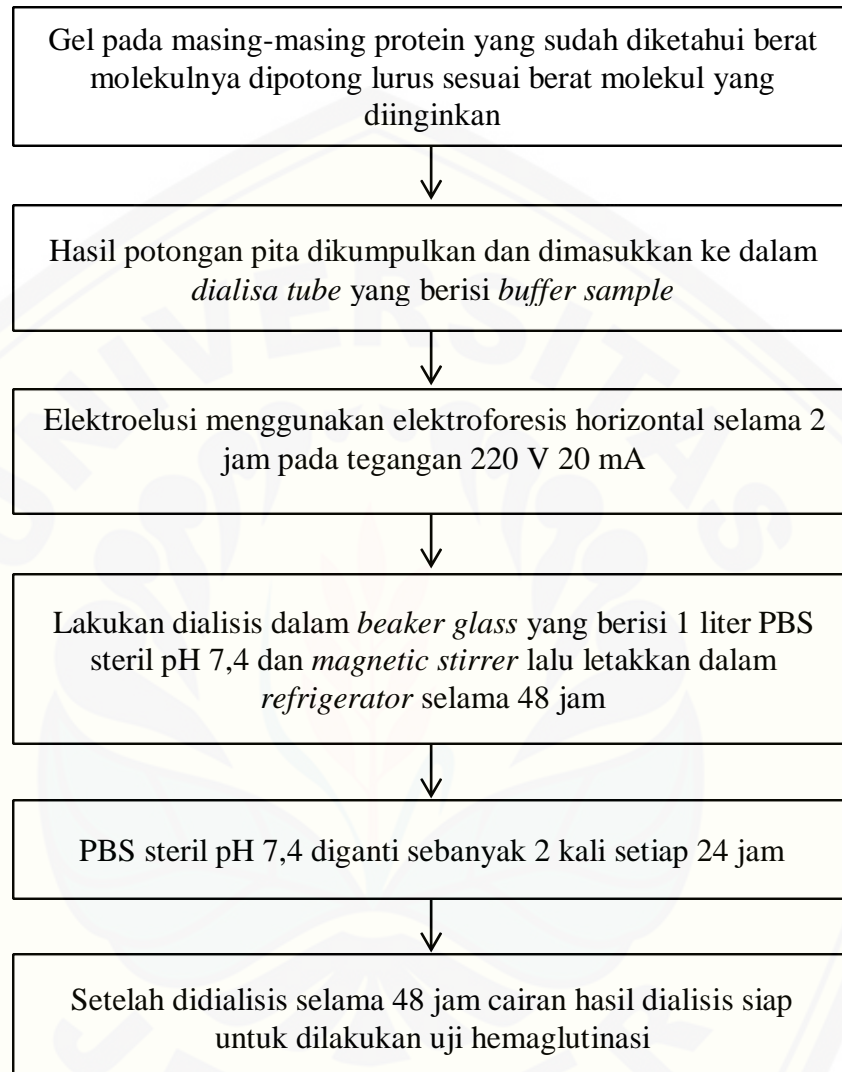
Thomas, D. H., A. Rob, dan D. W. Rice. 1989. A novel dialysis procedure for the crystallization of proteins. *Protein Engineering*. 2(6): .489-491

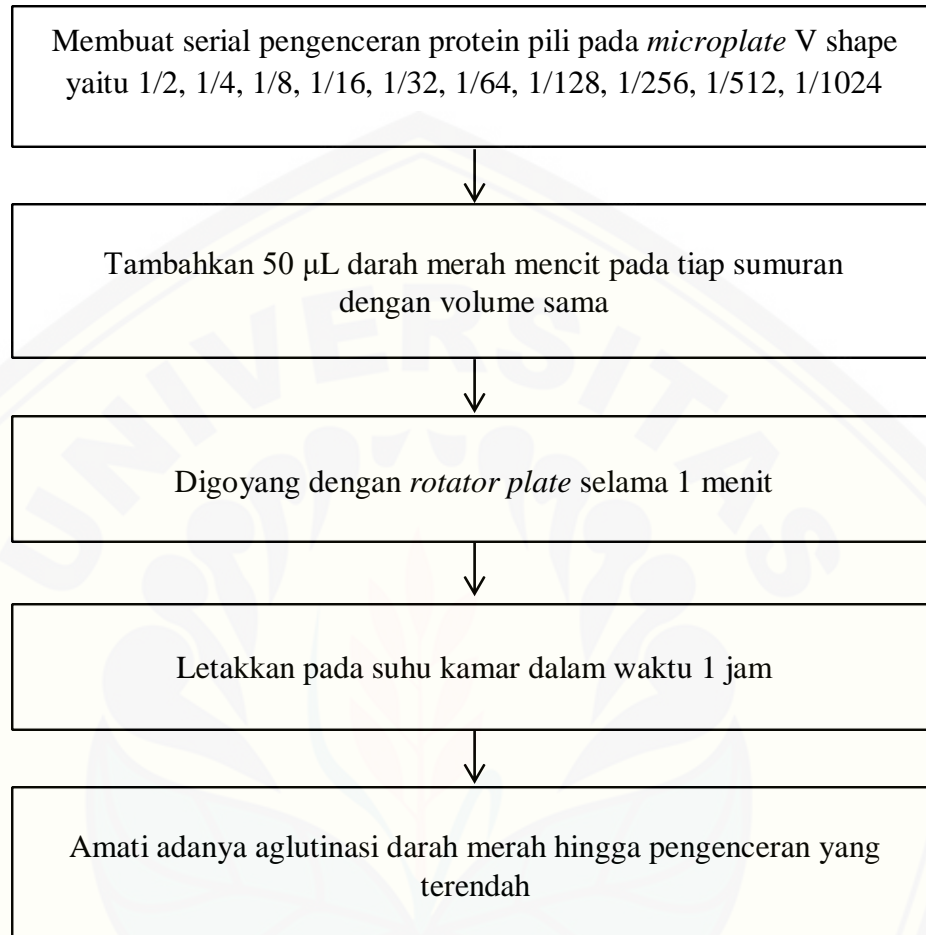


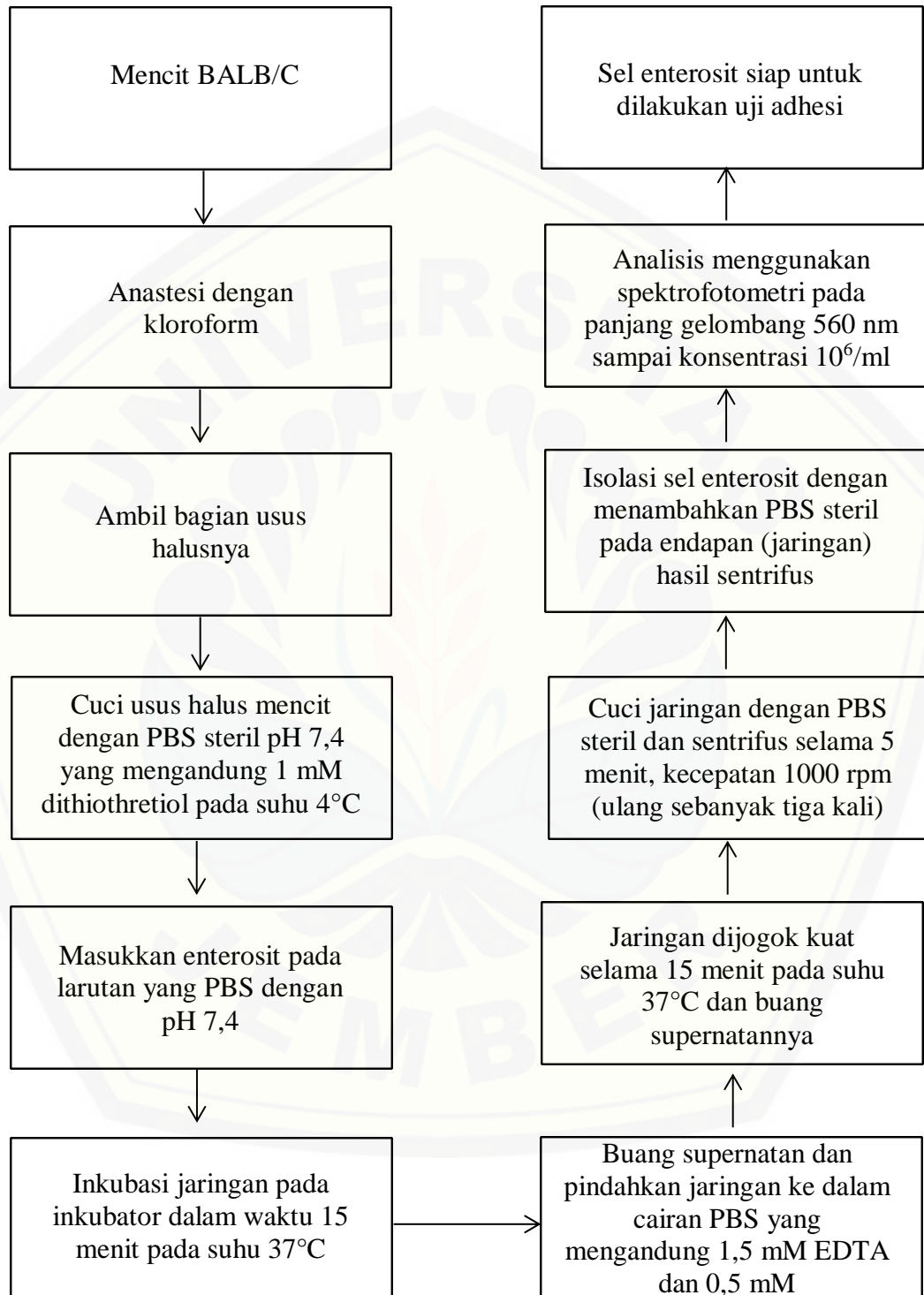
LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Alur Prosedur Penelitian Isolasi pili *E. coli*

Lampiran 3.2 Alur Prosedur Penelitian Identifikasi Berat Molekul Protein Pili (SDS-PAGE)

Lampiran 3.3 Alur Prosedur Penelitian Pemurnian pili *E. coli*

Lampiran 3.4 Alur Prosedur Penelitian Uji Hemaglutinasi

Lampiran 3.5 Alur Prosedur Penelitian Isolasi Sel Enterosit Mencit

Lampiran 3.6 Alur Prosedur Penelitian Uji Adhesi



Lampiran 4.1 Surat Keterangan Persetujuan Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember
68121 – Email : fk_unej@telkom.net**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK***ETHICAL APPROVA*

Nomor : 1.336/H25.1.11/KE/2019

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

PERAN PILI 43 kDa BAKTERI Escherichia coli SEBAGAI ADHESIN DAN HEMAGLUTININ

Nama Peneliti Utama : Siti Marissa Aisyah
Name of the principal investigator

NIM : 162010101052

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 19 Desember 2019
Ketua Komisi Etik Penelitian



Lampiran 4.2 Surat Rekomendasi Bebas Plagiasi

KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERANAlamat : Jalan Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto. Kotak Pos Jember 68121
Telp/Fax. (0331) 337877, 324446, *Faksimili (0331) 337877
E mail : fk@unej.ac.id Laman://www.fk.unej.ac.idSURAT REKOMENDASI BEBAS PLAGIASI

Nomor : 722 /UN25.1.11/PT/2020

Komisi Bimbingan KTI dan Publikasi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya peningkatan kualitas dan originalitas karya tulis ilmiah mahasiswa berupa skripsi, telah melakukan pemeriksaan plagiasi atas skripsi mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember di bawah ini:

Nama : Siti Marissa Aisyah
NIM. : 162010101052
Angkatan : 2016

Judul Skripsi : Peran Protein Pili 85 kDa Bakteri *Escherichia Coli* Sebagai Protein Adhesin dan Hemaglutinin

Bersama ini kami merekomendasikan dan menyatakan “ Bebas Plagiasi “

Demikian surat rekomendasi ini, atas perhatian saudara kami mengucapkan terima kasih.



Mengetahui,
Wakil Dekan I
H. Ancah Caesarina Novi M. Ph.D
NIP. 19820309 200812 2 002

26 FEB 2020

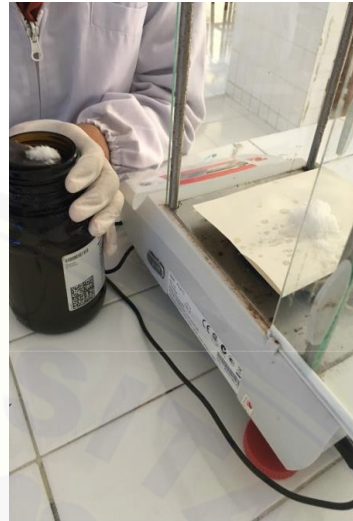
Komisi Bimbingan KTI & Publikasi
Ketua,

Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes
NIP. 19740604 200112 2 002

Lampiran 4.3 Dokumentasi Hasil Penelitian



Proses panen bakteri
Escherichia coli



Pembuatan larutan PBS
sebagai pelarut



Elektroforesis dengan
SDS PAGE



Elektroelusi dengan
elektroforesis horizontal



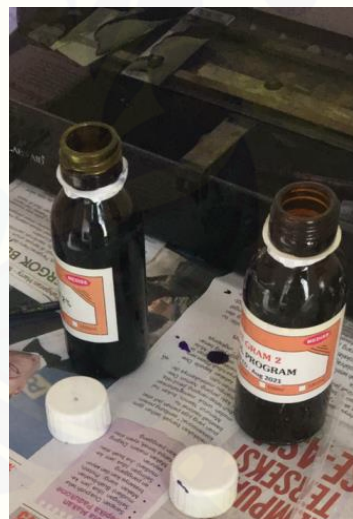
Dialisis dengan
magnetic stirrer



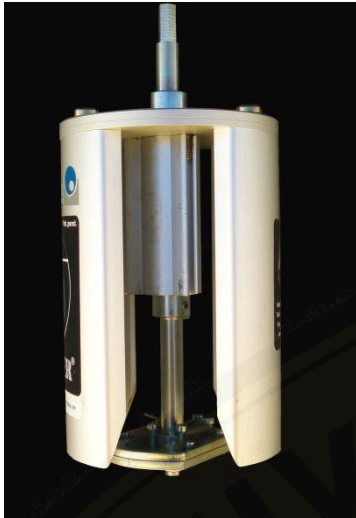
Hasil pemurnian protein
pili



Proses pembedahan
mencit untuk uji adhesi



Pewarnaan Gram untuk
pembuatan preparat



Pili cutter



Lampiran 4.4 Analisis Data

1. Hasil Uji Normalitas

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro Wilk		
	<i>Statistic</i>	<i>df</i>	<i>Sig.</i>	<i>Statistic</i>	<i>df</i>	<i>Sig.</i>
Indeks Adhesi	0.148	6	0.200*	0.976	6	0.932

*This is a lower bound of true significance

a. Lilliefors Significance Correction

2. Hasil Uji Korelasi Pearson

	Indeks Adhesi	Titer
Indeks Adhesi	<i>Pearson Correlation</i>	1
	<i>Sig. (2-tailed)</i>	-0.921**
	<i>N</i>	0.009
Titer	<i>Pearson Correlation</i>	1
	<i>Sig. (2-tailed)</i>	-0.921**
	<i>N</i>	0.009

**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

3. Hasil Uji Regresi Linier

<i>Model</i>	<i>R</i>	<i>R Square</i>	<i>Adjusted R Square</i>	<i>Std. Error of the Estimate</i>
1	0.921 ^a	0.848	0.810	118.30790

a. Predictors: (Constant), Titer

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized	t	Sig.
		B	Std. Error	Coefficients Beta		
1	(Constant)	979.920	60.110		16.302	0.000
	Titer	-658.992	139.414	-0.921	-4.727	0.009

a. Dependent Variable: Indeks Adhesi

