

ABSTRAK DAN EKSEKUTIF SUMMARY
LAPORAN PENELITIAN FUNDAMENTAL



KAREKTERISASI PROTEIN ADHESIN
Streptococcus pneumoniae(*Pneumococcus*) SEBAGAI
TARGET PENGEMBANGAN VAKSIN BERBASIS
PROTEIN

Oleh :

dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes (0018037204)
dr. Enny Suswati, M.Kes (0014027001)

UNIVERSITAS JEMBER

DESEMBER, 2013

KARAKTERISASI PROTEIN ADHESIN
Streptococcus pneumoniae(*Pneumococcus*) SEBAGAI TARGET
PENGEMBANGAN VAKSIN BERBASIS PROTEIN

Peneliti : Diana Chusna Mufida *, Enny Suswati*
Mahasiswa terlibat : Abcarina, Endivia Rizki M, Rahma Fadilah, Sanny
Sumber dana : DP2M DIKTI

ABSTRAK

Pneumonia merupakan penyebab kematian kedua tertinggi setelah diare di antara balita di Indonesia pada tahun 2007. Studi mikrobiologik menemukan penyebab utama bakteriologik pneumonia pada anak balita adalah *Streptococcus pneumoniae*. *Streptococcus pneumoniae* mempunyai berbagai macam faktor virulensi, diantaranya adalah fimbria atau pili dan protein permukaan. Tujuan penelitian pada tahun 1 adalah identifikasi protein adhesi *S. pneumoniae* yang berasal dari pili maupun protein permukaan. Protein pili maupun permukaan yang telah diidentifikasi diperbanyak dan selanjutnya dipotong pada band tertentu untuk dielektroelusi dan dialiasis. Protein yang telah didialisis tersebut dilakukan uji adhesi. Uji adhesi mempergunakan protein pili dan protein permukaan, disalutkan pada enterosit mencit dengan konsentrasi 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 dan 1/32 tanpa disalut protein pili sebagai kontrol. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa protein pili mempunyai berat molekul dominan dengan berat molekul 78, 52, 50 kDa dan protein permukaan dengan berat molekul 50, 36, 23 dan 19 kDa. Dan hasil uji adhesi menunjukkan bahwa protein pili dengan berat molekul 78 dan 52 merupakan protein adhesi dan protein permukaan dengan berat molekul 19 dan 23 juga merupakan protein adhesi. Persentase besarnya pengaruh tersebut dapat dilihat dari besarnya *Adjusted R Square* pada pili dengan berat molekul 78 kDa yaitu 0,963 yang berarti terdapat pengaruh konsentrasi sebesar 96.3 % terhadap besarnya indeks adhesi. Protein pili dengan berat molekul 52 kDa mempunyai *Adjusted R Square* 0.506. Protein permukaan dengan berat molekul 19 kDa mempunyai *Adjusted R Square* 0.702. Protein permukaan dengan berat molekul 23 kDa mempunyai *Adjusted R Square* 0.976. Hasil ini menunjukkan bahwa protein permukaan dengan berat molekul 23 kDa dapat merupakan protein adhesin yang paling kuat, selanjutnya diikuti oleh protein pili dengan berat molekul 78 kDa.

Kata kunci : protein adhesi, *Streptococcus pneumoniae*

KARAKTERISASI PROTEIN ADHESIN
Streptococcus pneumoniae(*Pneumococcus*) SEBAGAI TARGET
PENGEMBANGAN VAKSIN BERBASIS PROTEIN

Peneliti : Diana Chusna Mufida *, Enny Suswati*
Mahasiswa terlibat : Abcarina, Endivia Rizki M, Rahma Fadilah, Sanny
Sumber dana : DP2M DIKTI
Kontak email : dianachusna@yahoo.com
Diseminasi : -

Latar Belakang dan Tujuan

Latar Belakang

Streptococcus pneumoniae (Pneumococcus) merupakan mikroorganisme yang pathogen terhadap manusia yang dapat menyebabkan berbagai macam penyakit yaitu pneumonia, otitis media, meningitis serta bacteremia. Di negara berkembang diperkirakan 5 juta anak pertahun meninggal karena pneumonia yang disebabkan oleh pneumococcus. Sedangkan insidensi pneumonia oleh pneumococcus terjadi 1000 kasus per 100.000 (Schmidt et al,2006).

Untuk dapat menyebabkan infeksi, pada fase awal bakteri pathogen harus bisa melakukan kolonisasi pada tempat yang sesuai di jaringan target pejamu. Kecocokan (tropisme) berhubungan dengan kemampuan bakteri melewati barier mukosa dan invasi ke pejamu. Kolonisasi dimulai dengan penempelan bakteri dengan reseptor yang ada di lapisan mukosa. Penempelan diperantarai oleh protein adhesi bakteri, yang sebagian merupakan lektin baik pada bakteri Gram negative maupun Gram positif (Wizemann *et al*, 1999). Pada penempelan awal diperankan oleh pili dan sifat penempelannya adalah anchoring, setelah itu dilanjutkan dengan penempelan melalui outer membrane protein, yang sifat penempelannya bersifat doching. Setelah melakukan pelekatan maka bakteri akan berkembang biak disertai dengan produksi

bahan-bahan metabolisme bakteri yang dapat merugikan sel inang (Salyer and White,2002).

Seperti bakteri patogen lainnya, permukaan sel pneumokokus yang terdapat berbagai faktor virulensi yang memperantarai adhesi, kolonisasi ke sel host dan juga berperan invasi. Salah satu faktor virulensi yang menonjol adalah pili bakteri berupa protein filamen tipis memanjang dari dinding sel yang mempunyai peranan adhesi dan kolonisasi bakteri pada sel epitel nasofaring. Pili bakteri Gram-positif merupakan sub unit protein rantai tunggal yang tersusun secara kovalen, biasanya terdiri dari suatu adhesin pada ujung distal, sebuah pili utama yang membentuk poros polimer dan pili kecil yang memediasi pelekatan ke sel host. Disamping berperan penting dalam memediasi pelekatan bakteri ke sel inang, kolonisasi dan invasi ke jaringan, pili meningkatkan daya virulensi bakteri serta memacu respon inflamasi. Penelitian yang dilakukan oleh Barocchi *et al*, 2005, menunjukkan bahwa pili bakteri *Pneumococcus* memacu respon imun , yang pada penelitian ini indikator yang diukur adalah TNF.

Disamping pili, pneumokokus juga memiliki protein permukaan yang berperan dalam proses adhesi. Penelitian yang dilakukan oleh Frolet *et al*, 2010 menunjukkan bahwa protein permukaan yang berperan dalam proses adhesi adalah *choline binding protein* (Cbps) , protein tersebut mampu berikatan dengan elastin yang terdapat di paru dan pembuluh darah. Selain memediasi kolonisasi ke pejamu, penempelan bakteri juga berperan dalam regulasi dan ekspresi gen yang mengkode berbagai macam protein yang berperanan dalam invasi ke pejamu. Protein tersebut dapat memediasi hubungan yang lebih erat dengan sel epitel, memicu penyusunan kembali filament aktin sel epitel dan menginduksi perubahan signalling sel- host. Pada beberapa kasus bakteri juga mensekresi protein yang menyisip ke sel mamalia dan digunakan sebagai reseptor penempelan dengan pejamu. Setelah penempelan bakteri pathogen ke pejamu, memacu ekspresi faktor virulensi yang berperan dalam inflamasi local ataupun invasi. Pemahaman mengenai mekanisme penempelan dan karakterisasi protein adhesi, sangat diperlu dipelajari untuk dikembangkan sebagai vaksin berdasar molekul adhesi.

Vaksin pneumonia saat ini dirancang untuk melindungi orang dewasa terhadap lebih dari dua lusin strain *S. pneumoniae* tidak efektif pada anak-anak. Vaksin pneumokokus yang beredar saat ini terdiri dari potongan-potongan karbohidrat alami yang ada pada permukaan bakteri. Ketika digunakan dalam vaksin, potongan-potongan dari karbohidrat merangsang sistem kekebalan tubuh untuk membuat antibodi terhadap target karbohidrat bakteri. Problem dari vaksin tersebut bahwa sistem kekebalan tubuh anak yang sangat muda (lebih muda dari dua tahun) tidak menanggapi secara alami karbohidrat. Disamping itu tiap-tiap strain mempunyai karbohidrat yang berbeda-beda, sehingga strain yang berbeda tidak dapat menanggapi karbohidrat strain yang lainnya.

Saat ini sedang dikembangkan suatu vaksin berbasis molekul adhesi. Vaksin yang berdasar molekul adhesi dan telah digunakan dimasyarakat adalah pertactin, yang merupakan molekul adhesi *Bordetella pertussis*. Vaksin ini diberikan bersama-sama dengan difteri dan tetanus dan memiliki kelebihan tidak menimbulkan demam. Hal ini berlawanan dengan pemberian vaksin berupa bakteri yang dilemahkan, akan menimbulkan demam, sehingga menyebabkan sebagian ibu agak keberatan kalau anaknya divaksinasi. Untuk dapat mengembangkan vaksin berbasis molekul adhesi, maka langkah awal kita adalah identifikasi dan karakterisasi dari molekul adhesi tersebut.

Tujuan penelitian pada tahun pertama ini adalah

Identifikasi protein adhesin *S. pneumonia* yang berasal dari pili maupun protein permukaan bakteri

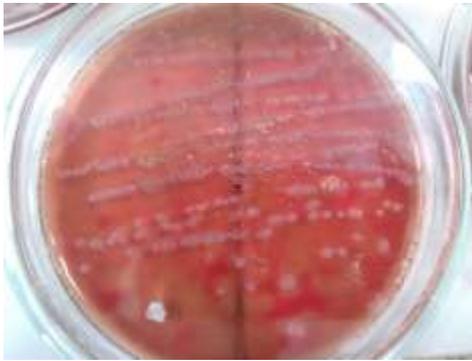
Metodologi yang digunakan

Bakteri yang akan digunakan adalah *Pneumokokus* galur lokal yang berasal dari sputum pasien pneumonia. Bakteri yang telah diisolasi, dikultur pada media bifasik untuk memperbanyak pertumbuhan pili, selama 2x24 jam dan selanjutnya dipanen. Setelah dipanen dan dibersihkan media pertumbuhannya, dilakukan pemotongan pili sampai supernatan berwarna seperti PBS dan dilanjutkan dengan

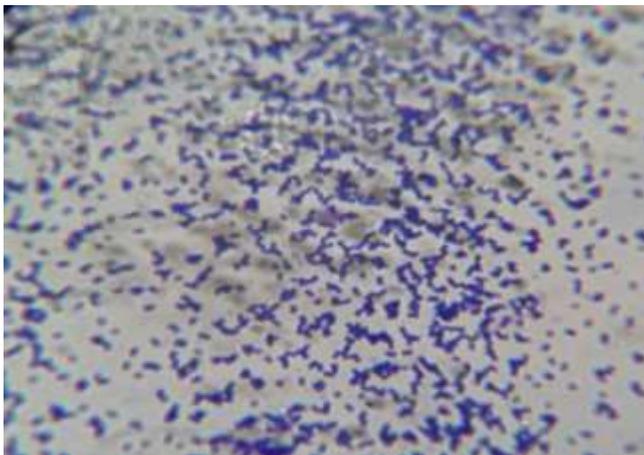
isolasi protein permukaan menggunakan detergen. Supernatant yang mengandung protein pili dan protein permukaan di elektroforesis untuk menentukan berat moleku. Hasil dari elektroforesis, akan terbentuk pita-pita dengan berat molekul tertentu. Berat molekul protein yang dominan di potong , dielusi dan dialysis. Larutan dialysis yang mengandung protein tersebut diuji hemaglutinasi dan uji adhesi.

Hasil

Bakteri *Pneumococcus* yang diperoleh dari penderita pneumonia, ditanam pada media agar darah dan dilakukan pengecatan Gram.



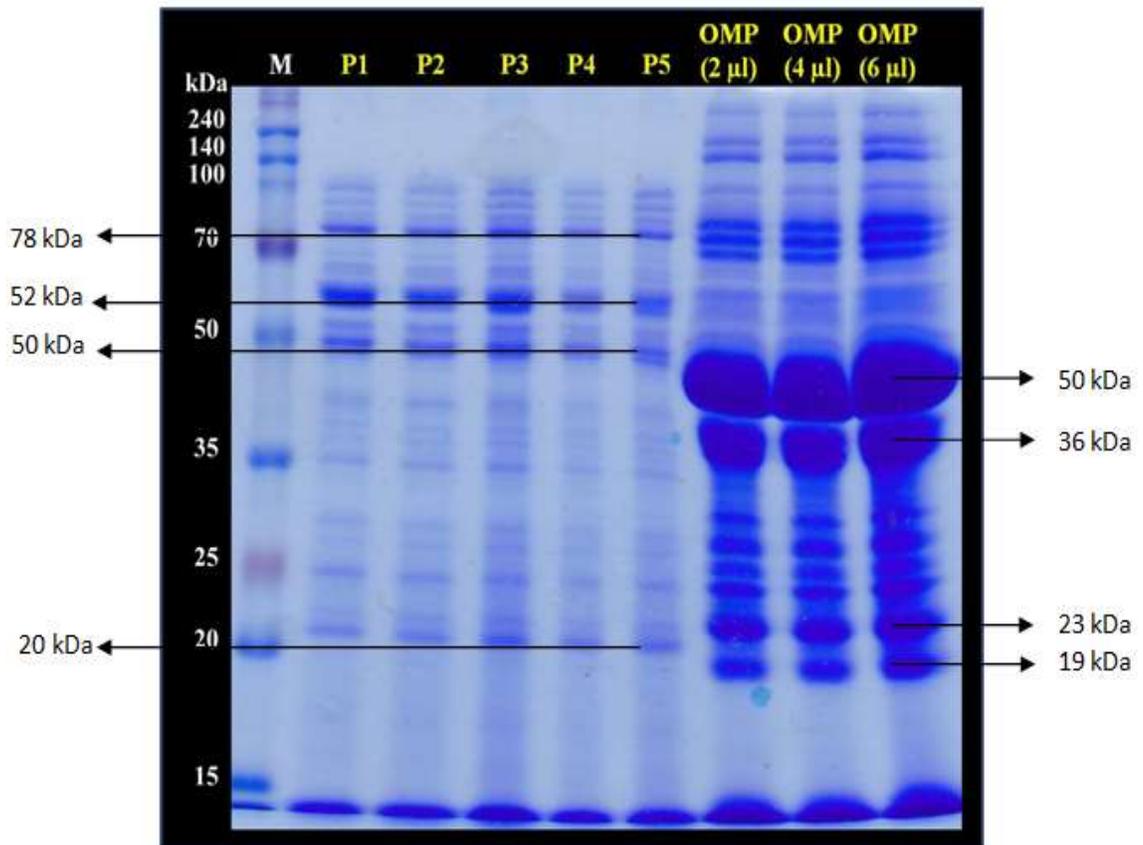
Gb 1. Koloni *S. pneumoniae* pada media BAP



Gb 2. Morfologi *S. pneumoniae*, dengan pewarnaan Gram

Pada media BAP, tampak koloni bakteri dengan hemolisis α . Pewarnaan Gram menunjukkan morfologi bakteri berbentuk kokus, berwarna ungu, berderet atau berpasangan dua-dua.

Supernatan yang merupakan potongan pili dan protein permukaan di lakukan SDS PAGE dengan hasil sebagai berikut :



Gambar 3. Hasil SDS-PAGE potongan pili dan protein permukaan *S. pneumoniae*
Keterangan : M merupakan marker, P1-5, berturut-turut potongan pili ke 1 sd ke 5
OMP merupakan protein permukaan .

Protein yang dominan dipotong pada pita berat molekul tersebut, dielektroelusi dan didialisis dengan hasil merupakan protein larutan, dan selanjutnya dilakukan uji hemaglutinasi dan adhesi.

Tabel 1. Hasil uji hemaglutinasi protein pili dan protein permukaan *S. pneumoniae*

	Pengenceran protein									
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
PILI78kDa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PILI52kDa	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
PILI50kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PILI20kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PP 23kDa	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
PP 19 kD	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Protein yang mampu menghambat proses hemaglutinasi selanjutnya dilakukan uji adhesi.

Tabel 2. Hasil perhitungan indeks adhesi pili 78 kDa

ulangan	Indeks adhesi						
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	0 µl
I	36	55	74	75	110	122	560
II	35	54	82	106	128	193	552
III	41	55	72	78	113	115	572
Rata-rata	44	54.67	76	86.33	117	143.3	561.33

Perhitungan indeks adhesi ini selanjutnya di uji statistic secara regresi linier, dengan hasil R^2 0.693

Tabel 3. Hasil perhitungan indeks adhesi pili 52 kDa

ulangan	Indeks adhesi						
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	0 μ l
I	172	208	220	228	228	240	560
II	132	157	168	174	191	193	552
III	144	149	170	177	183	212	572
Rata-rata	149.33	171.33	186	193	200.66	215	561.33

Perhitungan indeks adhesi ini selanjutnya di uji statistik secara regresi linier, dengan hasil R^2 0.506

Tabel 4. Hasil perhitungan indeks adhesi protein permukaan 19 kDa

ulangan	Indeks adhesi						
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	0 μ l
I	72	152	156	160	192	280	560
II	98	164	178	188	210	258	552
III	64	172	182	200	224	264	572
Rata-rata	78	162.67	172	182.67	208.67	267.33	561.33

Setelah dilakukan regresi linier diperoleh R^2 0.702

Tabel 5. Hasil perhitungan indeks adhesi protein permukaan 23 kDa

ulangan	Indeks adhesi						
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	0 μ l
I	124	140	274	360	440	536	560

II	128	136	270	372	448	520	552
III	136	152	250	368	420	516	572
Rata-rata	129.33	142.67	264.667	366.67	436	524	561.33

Perhitungan indeks adhesi ini selanjutnya di uji statistik secara regresi linier, dengan hasil R^2 0.976

Kesimpulan

Pada penelitian ini, dapat disimpulkan *S. Pneumonia* mempunyai protein adhesi pada pili dengan berat molekul 78 kDa dan 52 kDa, serta protein adhesin yang berasal dari permukaan dengan berat molekul 23kDa dan 19 kDa.

Daftar Pustaka

- Cundell D.R., Weisser, J.N., Young and Tuomanen (1995) Relationship between colonial morphology and adherence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity* 63: 2493- 2498
- Frolet C, Beniazza M, Roux L et al, 2010. New Adhesin Functions of Surface-Exposed Pneumococcal proteins. *BMC Microbiology* 10: 190 : 1471-2180.
- Lee S.F and Boran TL. 2003. Roles of Sortase in Surface Expression of the Major Protein Adhesin P1, Saliva-Induced Aggregation and Adherence, and Cariogenicity of *Streptococcus mutans* 71:2: 676-681.
- Marc J. S, Jan W, Maikel P., Margriet J. B. M. V, Peter S, Sander J. H. D, et al, 2001. Mice Lacking the Multidrug Resistance Protein 1 Are Resistant to *Streptococcus pneumoniae*-Induced Pneumonia. *Journal of Immunology* 166: 4059–4064.
- Mitchell T.J., Alexander J.E.Morgan P.J. and Andrew P.W., 1997. Molecular analysis of virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*, *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 83: 52S-71S
- Nakasone and Iwanaga, M, 1999. Characterization of Outer Membrane Protein OmpU of *Vibrio cholerae*. *Infect.Immun.* 66: 472-4728
- Ofek , I, Hasty D.L and Sharon N, 2003. Anti adhesion therapy of bacterial diseases : prospects and problem. *FEM* 38: 181-191.

