

PUBLIKASI JURNAL

**The Role of Pili Protein 38,6 kDa *Klebsiella pneumoniae*
as a Hemagglutinin and Adhesin Protein
which Serves as a Virulence Factor**

dr. Muhammad Ali Shodikin, M.Kes., Sp.A

NIP. 197706252005011002

Tenaga Pengajar Mikrobiologi Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Jember



**KEMENTRIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN
PENDIDIKAN TINGGI**

UNIVERSITAS JEMBER

Karya Ilmiah di publikasikan pada:

Journal of Agromedicine and Medical Sciences ,

Vol. 5 No.2 (2019) Fakultas Kedokteran Universitas Jember

ISSN 2460-9048

*Agromedicine
and
Medical Sciences*

AMS



The Corelation of Personal Protective Equipment (PPE) Usage and Soil-Transmitted Helminths Infection Status in Plantation Workers of Kaliputih Jember

Ivan Iqbal Baidowi, Yunita Armiyanti, Zahrah Febianti, Bagus Hermansyah, Yudha Nurdian

The Role of Pili Protein 38,6 kDa Klebsiella pneumoniae as a Hemagglutinin and Adhesin Protein which Serves as a Virulence Factor

Regina Finka Dita, Dini Agustina, Dwita Aryadina Rachmawati, Enny Suswati, Diana Chusna Mufida, Mohammad Ali Shodikin

Comparison Profile of Nutrition Status in Stage V Chronic Kidney Disease Patients Hemodialyzing Using New and Reuse Dialyzer (Experimental Study in Hemodialysis Installation of RSD dr. Soebandi Jember)

Yuli Hermansyah, Ika Aulia Kurniasari, Heni Fatmawati

The Larvacidal Activity of Ethanol Extracts of Phyllanthus acidus Leaves on The Culex quinquefasciatus Instar III/IV Larvae

Affifatun Hasanah, Bagus Hermansyah, Cholís Abrori

Cocoa Ethanol Extract Potency Toward Nematocyst Tubul Firing Inhibition of Physalia Utriculus Toxin In Vitro

Sarwendah Siswi Winasis, Al Munawir, Adelia Handoko

Correlation of Cholinesterase Levels to Lung Function in Farmer Exposed by Organophosphate Pesticides in Sukorambi Village, Jember Regency

Puput Sagita Mey Sandra, Kristianningrum Dian Sofiana, Ika Rahmawati Sutejo

Risk Factors Affecting Carpal Tunnel Syndrome in Women Laborer of Tobacco Warehouse in Ajung, Jember

Dasarina Rizqi Amalia, Ida Srisurani Wiji Astuti, Yudha Nurdian

Antioxidant Effect of Kenitu leaf Etanol Extract (Chrysophyllum Cainito L.) on Wistar Rat Induced Cyclophosphamid

Ekvan Danang Setya Pramudito, Erfan Efendi, M. Ali Shodikin

Diazinon Toxicity to Kidney and Liver of Wistar Male Rats in terms of Biochemical and Histopathological Parameters

Desie Dwi Wisudanti, Firman Herdiana, Tegar Syaiful Qodar

HOME / Editorial Team

Editor in Chief

[dr. Rena Normasari, M.Biomed](#)

School of Medicine, University of Jember, Indonesia

Associate Editors

[Dr. rer. biol. hum. dr. Erma Sulistyarningsih, M.Si](#)

School of Medicine, University of Jember, Indonesia

Editorial Board

[Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes](#)

School of Medicine, University of Jember, Indonesia

[dr. Dwita Aryadina Rachmawati, M.Kes](#)

School of Medicine, University of Jember, Indonesia

[dr. Ancah Caesarina Novi Marchianti, Ph.D](#)

School of Medicine, University of Jember, Indonesia

[dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech](#)

School of Medicine, University of Jember, Indonesia

[dr. Desje Dwi Wisudanti, M. Biomed](#)

School of Medicine, University of Jember, Indonesia

[dr. Dini Agustina, M.Biomed](#)

School of Medicine, University of Jember, Indonesia

[dr. Zahrah Febianti, M.Biomed](#)

School of Medicine, University of Jember, Indonesia

ADDITIONAL MENU

[Focus and Scope](#)

[Editorial Team](#)

[Publication Ethics](#)

[Author Guidelines](#)

[Peer-review Process](#)

[Open Access Policy](#)

[Indexing and Abstracting](#)

[Archiving](#)

INFORMATION

[Chart Flow](#)

[Visitor Statistics](#)

ISSN

p-ISSN : 2460-9048

e-ISSN :

TOOL



arammarly

Digital Repository Universitas Jember

ARTICLES

The Correlation Between The Use of Personal Protective Equipment (PPE) and Soil-Transmitted Helminths Infection in the Workers of Kaliputih Plantation Jember Regency

Ivan Iqbal Baidowi, Yunita Armiyanti, Zahrah Febianti, Yudha Nurdian, Bagus Hermansyah

8



The Role of Pili Protein 38,6 kDa Klebsiella pneumoniae as a Hemagglutinin and Adhesin Protein which Serves as a Virulence Factor

Regina Finka, Dini Agustina, Dwita Aryadina Rachmawati, Enny Suswati, Diana Chusna Mufida, Ali Shodikin

9-16



Comparison Profile of Nutrition Status in Stage V Chronic Kidney Disease Patients Hemodialyzing Using New and Reuse Dialyzer

Yuli Hermansyah, Ika Aulia Kurniasari, Heni Fatmawati

17-23



The Larvicidal Activity of Ethanol Extracts of Phyllanthus acidus Leaves on The Culex quinquefasciatus Instar III/IV Larvae

Affatun Hasanah, Bagus Hermansyah, Cholis Abrori

24-29



Potential of Cocoa Ethanol Extract Toward Nematocyst Tubul Firing Inhibition of Physalia Utriculus Toxin In Vitro

Sarwendah Siswi Winasis, Al Munawir, Adelia Handoko

30-34



Correlation of Cholinesterase Levels to Lung Function in Farmer Exposed by Organophosphate Pesticides in Sukorambi Village, Jember Regency

Puput Sagita Mey Sandra, Kristianingrum Dian Sofiana, Ika Rahmawati Sutejo

35-40



Risk Factors Affecting Carpal Tunnel Syndrome in Women Laborer of Tobacco Warehouse Ajung District, Jember

Dasarina Rizqi Amalia, Ida Srisurani Wiji Astuti, Yudha Nurdian

41-45



Antioxidant Effect of Kenitu leaf Etanol Extract (Chrysophyllum Cainito L.) on Wistar Rat Induced Cyclophosphamid

Ekvan Danang Setya Pramudito, Erfan Efendi, Muhammad Ali Shodikin

46-50



Diazinon Toxicity to Kidney and Liver of Wistar Male Rats in terms of Biochemical and Histopathological Parameters

Desie Dwi Wisudanti, Firman Herdiana, Tegar Syaiful Qodar

51-60



ISSN

p-ISSN : 2460-9048

e-ISSN :

TOOL



TEMPLATE JURNAL



COUNTER

9,486 Total Pageviews



00008664

Peran Protein Pili 38,6 kDa *Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin yang Berfungsi sebagai Faktor Virulensi

The Role of Pili Protein 38,6 kDa Klebsiella pneumoniae as a Hemagglutinin and Adhesin Protein which Serves as a Virulence Factor

Regina Finka Dita¹, Dini Agustina², Dwita Aryadina Rachmawati³, Enny Suswati², Diana Chusna Mufida²,
Mohammad Ali Shodikin²

¹Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember

²Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember

³Laboratorium Ilmu Kesehatan Masyarakat Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Jalan Kalimantan No. 37 Kampus Tegalboto, Jember 68121

e-mail korespondensi: reginafinkadita@gmail.com

Abstrak

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri penyebab infeksi pada berbagai bagian tubuh. Adanya protein pada pili yang akan berikatan dengan reseptor permukaan sel (protein adhesin) dan molekul gula membran sel (protein hemagglutinin) menjadi faktor yang sangat berpengaruh terhadap kemampuan *K. pneumoniae* untuk masuk ke dalam tubuh manusia. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui peran protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* sebagai protein hemagglutinin dan adhesin yang berfungsi sebagai faktor virulensi. Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni dengan metode elektroforesis (SDS-PAGE) untuk mendapatkan protein. Protein yang diperoleh kemudian diuji hemagglutinasi dan uji adhesi dengan menggunakan sel eritrosit dan enterosit mencit BALB/C untuk mengetahui perannya sebagai protein hemagglutinin dan adhesin. Kesimpulan penelitian ini protein pili 38,6 kDa *Klebsiella pneumoniae* berperan sebagai protein hemagglutinin dan adhesin yang berfungsi sebagai faktor virulensi.

Kata kunci: *Klebsiella pneumoniae*, Protein 38,6 kDa, Hemagglutinin, Adhesin

Abstract

Klebsiella pneumoniae is an infectious bacteria in various parts of the body. The presence of proteins in pili that will bind to cell surface receptors (adhesin proteins) and cell membrane sugar molecules (hemagglutinin proteins) is a very influential factor in the ability of *K. pneumoniae* to enter the human body. The purpose of this study was to determine the role of pili 38.6 kDa *K. pneumoniae* protein as a hemagglutinin and adhesin protein which functions as a virulence factor. This type of research is pure experimental research using the electrophoresis method (SDS-PAGE) to obtain protein. The protein obtained was then tested for hemagglutination and adhesion test using erythrocyte cells and enterocytes of BALB / C mice to determine their role as hemagglutinin and adhesin proteins. Conclusion of this study pili protein 38.6 kDa *Klebsiella pneumoniae* acts as a hemagglutinin and adhesion protein which functions as a virulence factor.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, 38,6 kDa Protein, Hemagglutinin, Adhesin

Pendahuluan

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri Gram negatif dari famili *Enterobacteriaceae*, non-motil, berbentuk batang pendek dan bersifat fakultatif anaerob (Brooks *et al.*, 2003). *K. pneumoniae* menjadi penyebab infeksi pada berbagai organ tubuh diantaranya 20,1% infeksi intraabdominal di Cina (Zhang *et al.*, 2017), 29% pneumonia di beberapa Rumah Sakit di Indonesia (Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2014), serta 18,1% Infeksi Saluran Kemih (ISK) di RSUD dr Soetomo (Sutandhio *et al.*, 2015). Angka kejadian ISK akibat *K. pneumoniae* di RSD Soebandi Jember mengalami peningkatan dari 5% pada tahun 2016 menjadi 11,7% pada tahun 2017 (Syahputra, 2018).

K. pneumoniae telah dilaporkan mengalami resistensi terhadap beberapa jenis antibiotik (Kazimoto *et al.*, 2018). Oleh karena itu, faktor virulensi *K. pneumoniae* yang dapat menyebabkan bakteri ini mampu menginvasi sel inang dan menimbulkan patogenitas perlu diketahui. *K. pneumoniae* memiliki beberapa faktor virulensi, salah satunya yaitu pili (Li *et al.*, 2014). Pili berperan dalam tahap awal perlekatan *K. pneumoniae* pada permukaan sel inang. Hal ini karena pili mengandung protein yang dapat berikatan dengan molekul gula penyusun membran sel inang, yang disebut dengan protein hemagglutinin serta protein yang dapat berikatan dengan reseptor permukaan sel inang yang disebut dengan protein adhesin (Savage, 2003; Khater *et al.*, 2015).

Protein yang bersifat imunogenik memiliki berat molekul 10-100 kDa (Parslow *et al.*, 2001). Hasil elektroforesis studi pendahuluan diketahui protein pili 38,6 kDa memiliki pita paling tebal yang menunjukkan bahwa konsentrasi protein dengan berat molekul tersebut paling tinggi diantara berat molekul lainnya. Selain itu, peran protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* belum ada yang melaporkan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peran protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* sebagai protein hemagglutinin dan adhesin yang berfungsi sebagai faktor virulensi.

Metode

Sampel Bakteri

Sampel penelitian ini adalah *K. pneumoniae* yang terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas

Kedokteran Universitas Jember serta sel eritrosit dan sel enterosit mencit strain BALB/C usia 6-8 minggu dengan berat 25 gram dan dalam kondisi sehat.

Identifikasi Bakteri

Koloni bakteri yang didapat kemudian diperiksa karakterisasi morfologi koloni pada media *MacConkey* agar kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan dilanjutkan dengan pewarnaan Gram dan uji biokimia (Ling *et al.*, 1988 dalam Khan *et al.*, 2018).

Kultur Bakteri

Isolasi bakteri dengan menggunakan metode Ehara yaitu biakan yang tumbuh pada media *MacConkey* agar diambil kemudian dimasukkan kedalam botol yang telah diisi dengan BHI sebanyak 1000 ml lalu dikocok kuat selama 30 menit pada waterbath suhu 37°C. Suspensi bakteri diambil 10 ml dan dimasukkan ke media TCG dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (Ehara *et al.*, 1987 dalam Sumarno *et al.*, 2015).

Isolasi Pili *K. pneumoniae*

Bakteri ditambahkan TCA sampai konsentrasi 3% lalu dikocok rata dan diletakkan pada suhu kamar selama 1 jam dengan pengulangan kocokan setiap 15 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet diambil dan diresuspensi dengan PBS pH 7,4 dengan perbandingan 1:10. Pemotongan pili menggunakan pili *cuter* (*mixer*). Pili bakteri dipotong selama 30 detik dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C, dan diulangi sampai supernatan jernih dengan masa istirahat setiap pengulangan yaitu 1 menit. Hasil pemotongan pili disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit, kemudian diambil supernatannya (Ehara *et al.*, 1987 dalam Sumarno *et al.*, 2015).

Isolasi Protein Pili *K. pneumoniae*

Identifikasi berat molekul protein pili *K. pneumoniae* dilakukan dengan menggunakan SDS-PAGE dari metode penelitian Laemmli. Sampel protein dipanaskan selama 5 menit pada suhu 100°C dalam larutan penyangga yang mengandung 5 mM pH 6,8 Tris HCL, 2-*mercapto ethanol* 5%, *sodium dodecyl sulfate* 2,5%, gliserol 10%, dengan warna pelacak *bromophenol blue*. Isolasi protein ini menggunakan *mini slab gel* 12,5% dengan *stacking gel* 4%. Voltase yang digunakan 125 mV dengan waktu *running* 90

menit. Pewarna yang digunakan yaitu *coomassie brilliant blue* dan molekul standar *pre stained broad range* (Laemmli, 1970 dalam Podmirseg *et al.*, 2016).

Pemurnian Protein Pili *K. pneumoniae*

Proses pemurnian protein pili ini menggunakan metode Thomas, gel hasil SDS-PAGE dipotong melintang dan dimasukkan pada *dialise tube* yang berisi larutan *buffer*. Selanjutnya dilakukan elektroelusi pada *electroelusion chamber* yang berisi larutan *buffer* dengan tegangan 20 V dan arus 0,3 A selama 2 jam. Hasilnya kemudian didialisis dengan memasukkannya ke dalam *beaker glass* berisi akuades steril pada *magnetic stirrer* dalam refrigerator selama 24 jam. Proses diulang dengan menggunakan *beaker glass* yang berisi cairan PBS steril selama 24 jam. Protein yang diperoleh ditampung pada *ependrof* dan ditambahkan etanol absolut dingin dan didiamkan selama 1 malam pada *refrigerator*. Proses selanjutnya yaitu protein disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C, supernatan yang berisi etanol dibuang dengan cara *tapping* dalam *refrigerator* sampai etanol habis menguap. Hasil dari proses ini adalah *Crude* protein yang dapat disimpan dalam *deep freeze* dengan larutan buffer Tris HCL 0,5 M pH 6,8 (Thomas *et al.*, 1989 dalam Dos Santos *et al.*, 2017).

Uji Hemaglutinasi

Uji ini merujuk pada metode yang digunakan pada penelitian Li yaitu pengenceran sampel dibuat pada *microplate* U dengan volume 50 µl. Suspensi darah mencit dengan konsentrasi 0,5% dimasukkan pada setiap sumur *microplate* U lalu digoyangkan menggunakan *rotator plate* selama 1 menit. Kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 1 jam. Sampel yang diuji adalah *Crude* protein dan protein pili *K. pneumoniae*. Darah yang digunakan adalah darah mencit. Besar titer ditentukan dengan mengamati adanya penggumpalan eritrosit pada pengenceran terendah (Li *et al.*, 1999 dalam Norsworthy dan Pearson, 2017).

Isolasi Sel Enterosit Mencit

Mencit yang digunakan adalah mencit strain BALB/C betina, usia 6-8 minggu, berat 25 gram, dan dalam kondisi sehat. Isolasi ini menggunakan metode Weisser Honda. Mencit dianestesi dan diambil bagian usus halus, selanjutnya dicuci menggunakan PBS pH 7,4 yang mengandung 1 mM *dithiothreitol* pada suhu 4°C. Kemudian usus halus tersebut dimasukkan ke dalam cairan yang berisi PBS

pH 7,4 dan diinkubasi pada *shaking incubator* selama 15 menit pada suhu 37°C. Supernatan dibuang dan jaringan dimasukkan ke dalam cairan yang berisi 1,5 mM EDTA dan 0,5 mM *dithiothreitol* dan dikocok kuat selama 5 menit pada suhu 37°C dan supernatan dibuang, hasilnya dicuci dengan PBS dan disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Enterosit diisolasi dengan melakukan suspensi PBS steril sampai konsentrasi 10⁶/ml (Honda *et al.*, 1988 dalam Baker-Austin *et al.*, 2017).

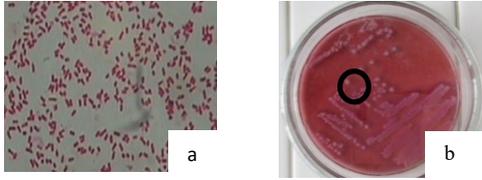
Uji Adhesi

Metode yang digunakan adalah modifikasi Honda. *K. pneumoniae* dibiakkan pada media *lactose broth* dengan suhu 37°C. Kemudian dipanen dengan melakukan sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm dengan suhu 4°C selama 10 menit. Suspensi endapan dengan PBS. Kandungan bakteri dibuat 10⁸/ml menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Selanjutnya sebanyak 500 µl suspensi bakteri diambil untuk masing-masing dosis protein pili. Protein pili 38,6 kDa dibuat pengenceran 1/10000, 1/20000, 1/40000, 1/80000, 1/160000, 1/32000 serta kontrol negatif yang tidak diberi protein. Setiap dosis tersebut ditambahkan 500 µl suspensi enterosit mencit. Homogenat tersebut diinkubasi pada *waterbath* dengan digoyang pelan pada suhu 37°C selama 30 menit, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit dan proses sentrifugasi diulangi sebanyak 2 kali. Suspensi diambil sebanyak 10 µl dengan dua kali pengulangan dan dilakukan preparasi dan pewarnaan gram. Kemudian dilakukan penghitungan indeks adhesi menggunakan mikroskop (Honda *et al.*, 1988 dalam Baker-Austin *et al.*, 2017).

Hasil

Identifikasi Bakteri

Sampel diidentifikasi dengan pengecatan Gram untuk mengetahui morfologi bakteri. Hasilnya didapatkan bakteri berwarna merah yang menunjukkan ciri bakteri Gram negatif serta berbentuk batang pendek (Gambar 1 (a)). Selain itu, bakteri juga dikultur pada media *MacConkey* untuk mengetahui karakteristik dan sifat koloni bakteri. Sampel bakteri mampu hidup pada media *MacConkey* dengan karakteristik koloni yang mukoid (Gambar 1 (b)).



Gambar 1. Hasil Identifikasi Bakteri. (a) Pengamatan Gram dilihat dengan mikroskop perbesaran 1000x yang menunjukkan bakteri berwarna merah dan berbentuk batang pendek; (b) Lingkaran menunjukkan koloni mukoid pada kultur pada media MacConkey.

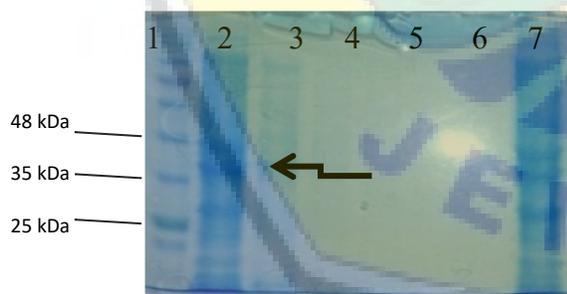
Identifikasi bakteri secara biokimia dilakukan dengan menggunakan uji IMViC (*Indol, Methyl Red, Voges-Proskauer, Simmon's Citrate*) serta uji *Tripel Sugar Iron Agar* (TSIA). Hasil uji biokimia sampel dapat dilihat pada Tabel 1 (Gambar tidak disertakan).

Tabel 1 Hasil Uji Biokimia *Klebsiella pneumoniae*

Nama Uji Biokimia	Hasil
Uji <i>Indol</i>	-
Uji <i>Methyl Red</i>	-
Uji <i>Voges-Proskauer</i>	+
Uji <i>Simmon's Citrate</i>	+
TSIA (<i>Tripel Sugar Iron Agar</i>)	Asam/Asam, gas (+), H ₂ S (-)

Isolasi Protein Pili *K. pneumoniae*

Hasil pematangan pili kemudian dielektroforesis (SDS-PAGE) untuk mendapatkan profil protein pili *K. pneumoniae* (Gambar 2).



Gambar 2 Profil subunit protein pili *K. pneumoniae* hasil elektroforesis (SDS-PAGE). (1) protein marker *prestained broad range ncalai tesque*; (2) sel utuh *K. pneumoniae*; (3) potongan pili pertama; (4) potongan pili kedua; (5) potongan pili ketiga; (6) potongan pili keempat; (7) potongan pili kelima; (8) bakteri yang telah dipotong pilinya. Tanda panah menunjukkan protein pili 38,6 kDa

Uji Hemaglutinasi

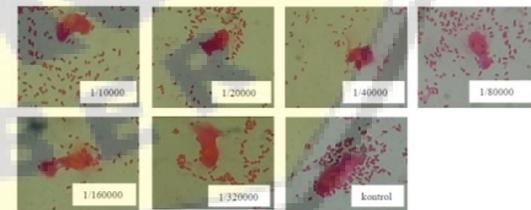
Protein yang telah dielektroelusi dan dialisis, kemudian dilakukan pengecekan konsentrasi protein dengan menggunakan spektrofotometri, didapatkan konsentrasi sampel 4,70 mg/ml. Selanjutnya dilakukan uji hemaglutinasi dengan menggunakan eritrosit mencit untuk mengetahui titer hemaglutinasi. Konsentrasi protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* diencerkan secara dilusi bertingkat pada sumuran 3-12. Pada menit ke-62, pengamatan uji hemaglutinasi dapat dibaca dan diinterpretasikan. Hasilnya diperoleh uji hemaglutinasi protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* positif yang ditandai oleh tidak terbentuknya cincin merah pada dasar sumuran dengan titer tertinggi yaitu 1/2. Hasil uji hemaglutinasi dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3 Hasil Uji Hemaglutinasi

Uji Adhesi

Protein adhesin membuat *K. pneumoniae* mampu melekat pada permukaan sel inang, untuk mengetahui kemampuan protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* maka dilakukan uji adhesi dengan menggunakan sel enterosit mencit. Uji adhesi dilakukan pada kelompok kontrol yaitu kelompok yang tidak diberi protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* dan pada kelompok perlakuan yang diberikan protein pili 38,6 kDa dengan pengenceran 1/10.000, 1/20.000, 1/40.000, 1/80.000, 1/16.000, serta 1/32.000 (Gambar 4).



Gambar 4 Hasil Uji adhesi protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* dengan berbagai pengenceran dilihat dengan mikroskop Olympus® pada perbesaran 1000x.

Berdasarkan pengamatan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x terhadap uji adhesi protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* pada berbagai pengenceran (Gambar 4) dan berdasarkan hasil penghitungan indeks adhesi (Tabel 3), didapatkan hasil bahwa semakin tinggi konsentrasi protein pili

38,6 *K. pneumoniae* yang diberikan maka indeks adhesi akan semakin rendah.

Tabel 3 hasil Indeks Adhesi Protein Pili 38,6 kDa *K. pneumoniae*

Titer Pengenceran	Rerata
1/10000	240
1/20000	332,333
1/40000	336,333
1/80000	373,333
1/160000	578
1/320000	594,667
0	1784,667

Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dengan menggunakan *Statistical Package for Social Science* (SPSS) 25.0 dan diuji dengan menggunakan korelasi Spearman. Hasilnya diperoleh nilai p-value yaitu 0,000 ($p < 0,05$) sehingga titer pengenceran dengan indeks adhesi memiliki hubungan yang bermakna signifikan, dengan koefisien korelasi -0,964 yang berarti indeks adhesi dan titer pengenceran memiliki kekuatan hubungan sangat kuat dengan arah hubungan yang negatif (Dahlan, 2015). Data kemudian diuji dengan menggunakan uji regresi, didapatkan nilai R 0,508 yang menunjukkan kekuatan hubungan antar variabel sedang, serta nilai R² (koefisien determinasi) adalah 25,79% (Dahlan, 2015). Persamaan regresi yang diperoleh yaitu $y = -7 \cdot 10^6x + 808.560$.

Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel yang digunakan merupakan *K. pneumoniae* yang memiliki morfologi batang pendek dan berwarna merah. Warna merah merupakan karakteristik bakteri Gram negatif pada pengecatan Gram. Sampel mampu hidup pada media *MacConkey* dengan karakteristik koloni mukoid. Hasil ini memperkuat bukti bahwa sampel mampu memfermentasi laktosa (Brooks *et al.*, 2003); Juwita *et al.*, 2005).

Uji biokimia sampel penelitian dilakukan menggunakan uji IMVIC dan TSIA. Uji *Voges-Proskauer* didapatkan hasil positif karena terbentuk warna merah saat ditetesi dengan reagen *Voges-Proskauer*. Selain itu, uji *Cimmon's Citrate* juga bernilai positif karena terdapat perubahan agar dari hijau menjadi biru. Uji TSIA menunjukkan sifat asam/asam, bagian bawah agar terdapat gelembung udara yang menunjukkan bakteri menghasilkan gas

dan tidak terdapat perubahan warna menjadi hitam yang menunjukkan tidak terbentuknya H₂S (Leboffe *and* Pierce, 2011). Karakteristik hasil uji biokimia yang didapatkan menunjukkan bahwa sampel penelitian ini merupakan *K. pneumoniae* (Brooks *et al.*, 2003).

Bakteri yang telah diidentifikasi kemudian dipotong pilinya dengan menggunakan *pili cutter* sebanyak 5 kali pengulangan pemotongan. Hasil pemotongan tersebut kemudian dielektroforesis dengan metode SDS-PAGE yang hasilnya dapat dilihat pada lajur 3-7 (Gambar 2). Hasil tersebut memperlihatkan bahwa potongan pili ke-1 (lajur 3) lebih tampak warnanya dibandingkan dengan potongan pili lainnya (lajur 4-7). Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi protein potongan pili ke-1 lebih tinggi dibandingkan dengan potongan pili lainnya (Elfita, 2014). Pada potongan pili ke-1 dapat dilihat bahwa protein dengan berat molekul 38,6 kDa memiliki warna yang lebih gelap dibandingkan dengan berat molekul lainnya yang menunjukkan bahwa konsentrasi protein tersebut lebih tinggi daripada yang lainnya. Hal ini memungkinkan bahwa protein 38,6 kDa merupakan protein yang paling berperan dalam patogenitas yang ditimbulkan oleh pili *K. pneumoniae*. Selain itu protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* juga memiliki berat molekul diantara 10-100 kDa, sehingga protein ini memiliki sifat imunogenik (Parslow *et al.*, 2001).

Potongan pili yang diperoleh diprediksikan benar-benar merupakan pili bakteri *K. pneumoniae* karena dari hasil SDS-PAGE dapat dibandingkan beberapa pita protein termasuk protein pili 38,6 kDa yang tampak pada potongan pili juga terdapat pada *whole cell* (lajur 2) akan tetapi tidak terdapat pada sel bakteri yang telah dipotong pilinya (lajur 8). Pemeriksaan pasti bahwa bagian yang dipotong merupakan pili bakteri *K. pneumoniae* dapat dilakukan dengan menggunakan mikroskop elektron dan metode *western blot*. Namun, berdasarkan penelitian sebelumnya yang menggunakan metode serupa, prediksi dengan pengamatan pada hasil SDS-PAGE sudah mencukupi (Hidayati, 2010; Agustina *et al.*, 2012; Agustina *et al.*, 2014). Jenis pili dalam penelitian ini kemungkinan merupakan tipe 1 atau 3 karena kedua tipe tersebut merupakan tipe pili yang paling berperan penting dalam patogenitas *K. pneumoniae*. Akan tetapi perlu pemeriksaan lebih lanjut untuk memastikan hal tersebut dengan menggunakan *colony immunoblotting* untuk mengidentifikasi gen yang khas dimiliki oleh masing-masing tipe pili (Di Martino *et al.*, 2003).

Menurut Merchant dan Packer, pembacaan titer hemaglutinasi dimulai pada saat eritrosit yang terdapat di sumuran kontrol negatif (K) telah mengendap. Adanya protein yang berikatan dengan reseptor permukaan eritrosit akan membuat eritrosit mampu mengikat eritrosit lainnya sehingga mencegah eritrosit tersebut mengendap pada dasar sumuran *mikroplate* U. Pada kontrol negatif tidak terdapat protein sehingga eritrosit yang terdapat pada sumuran kontrol negatif akan mengendap terlebih dahulu (Fitrawati *et al.*, 2015). Pada penelitian ini pembacaan titer dapat dibaca pada menit ke-62 dengan titer HA tertinggi yaitu $\frac{1}{2}$ (Gambar 3). Hasil ini membuktikan bahwa protein pili 38,6 *K. pneumoniae* merupakan protein hemaglutinin yang mampu berikatan dengan reseptor permukaan sel eritrosit mencit yang berupa molekul glukosa. Uji hemaglutinasi yang positif berguna sebagai identifikasi kemampuan adhesi molekul protein (Darmawati *et al.*, 2018). Pada penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa protein hemaglutinin berperan dalam adhesi bakteri pada sel. Protein hemaglutinin *Salmonella thypi* dengan berat molekul 36 kDa yang diperoleh dari pili bakteri tersebut terbukti memiliki kekuatan adhesi pada permukaan sel vena umbilikal manusia (Soemarno *et al.*, 2002). Selain itu protein hemaglutinin *Salmonella thypi* dengan berat molekul 49,8 kDa juga mampu melekat pada permukaan sel enterosit mencit (Agustina *et al.*, 2012). Sedangkan pada penelitian sebelumnya didapatkan bahwa protein hemaglutinin pili 12,8 kDa *K. pneumoniae* juga berperan dalam adhesi pada sel enterosit mencit (Agustina *et al.*, 2014). Sehingga hasil positif protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* pada penelitian ini menunjukkan bahwa protein hemaglutinin ini berperan dalam adhesi pada sel. Oleh karena itu dilakukan uji adhesi untuk menguatkan hasil tersebut.

Hasil Gambar 4 menunjukkan bahwa pola adhesi sampel *K. pneumoniae* pada penelitian ini merupakan pola adhesi difus yaitu koloni melekat pada seluruh bagian sel inang sesuai dengan hasil penelitian (Agustina *et al.*, 2014). Pada lapang pandang tampak *K. pneumoniae* yang tidak menempel pada epitel sel enterosit. Jumlah *K. pneumoniae* yang tidak menempel ini dapat dikurangi dengan proses pencucian homogenat sebelum preparasi. Pencucian dengan menggunakan PBS sebelum preparasi dengan pewarnaan Gram dapat dilakukan 2-4 kali pengulangan. Apabila jumlah pengulangan yang terlalu sedikit maka lapang

pandang akan dipenuhi oleh *K. pneumoniae* yang tidak menempel pada sel enterosit. Sedangkan jumlah pengulangan yang terlalu banyak akan semakin meningkatkan kemungkinan hilangnya epitel sel enterosit. Keadaan ini akan tampak seakan-akan tidak ada bakteri yang menempel pada sel enterosit. Sehingga ketepatan pemilihan jumlah pengulangan pencucian diperlukan untuk memperoleh hasil yang maksimal (Letourneau *et al.*, 2011).

Uji adhesi berfungsi untuk menguatkan pembuktian bahwa protein hemaglutinin pili 38,6 *K. pneumoniae* berperan dalam adhesi *K. pneumoniae* pada permukaan sel inang. Pada penelitian ini digunakan sel enterosit mencit yang berfungsi sebagai sel inang. Selanjutnya penghitungan indeks adhesi dilakukan pada 100 sel enterosit dengan 3 kali pengulangan perhitungan oleh orang yang berbeda untuk mengurangi subjektivitas. Hasil perhitungan kemudian diolah secara statistik. Diperoleh hasil bahwa semakin tinggi kadar protein yang diberikan maka indeks adhesi akan semakin rendah. Hal ini dikarenakan reseptor permukaan sel enterosit telah dipenuhi oleh protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* sehingga bakteri *K. pneumoniae* tidak dapat melekat pada permukaan sel enterosit. Hasil ini membuktikan bahwa protein pili 38,6 *K. pneumoniae* merupakan protein adhesin yang berperan dalam perlekatan *K. pneumoniae* pada permukaan sel inang. Setelah melekat pada sel inang, *K. pneumoniae* akan mampu membentuk koloni dan menimbulkan patogenitas (Berne *et al.*, 2015). Protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* berdasarkan berat proteinnya dapat diketahui bahwa protein tersebut bersifat imunogenik, akan tetapi perlu pembuktian yang lebih lanjut. Jika hasilnya dibuktikan bahwa protein tersebut bersifat imunogenik, selanjutnya dapat dikembangkan antibodi yang dapat melawan sifat tersebut untuk pengembangan pencegahan infeksi oleh *K. pneumoniae*.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan kesimpulan yaitu protein pili dengan berat molekul 38,6 kDa *K. pneumoniae* merupakan protein hemaglutinin dan protein adhesin yang berfungsi sebagai faktor virulensi *K. pneumoniae*.

Daftar Pustaka

- Agustina D, Prawiro SR, As N. 2014. Inhibition of bacterial adhesion on mice enterocyte by the hemagglutinin pili protein 12 , 8 kda klebsiella pneumoniae antibody. *The Journal of Tropical Life Science*. 4(1):19–25.
- Agustina W, Fitri LE, Raras TYM, Siswanto B, Prawiro SR. 2012. Antibody protein hemagglutinin subunit pili with mw 49 , 8 kda shigella dysenteriae can inhibit shigella dysenteriae adhesion on mice enterocyte. *IOSR Journal of Pharmacy*. 2(5):13–20.
- Baker-Austin C, Trinanes J, Gonzalez-Escalona N, Martinez-Urtaza J. 2017. Non-cholera vibrios: the microbial barometer of climate change. *Trends in Microbiology*. 25(1):76–84.
- Berne C, Adrien D, Hardy GG, dan Yves BV. 2015. Adhesins involved in attachment to abiotic surface by gram-negative bacteria. *Microbiol Spectr*. 3(4):1–45.
- Brooks BW, Foran CM, Richards S, Weston J, Turner PK, Stanley JK, Solomon K, Slattery M, Point L. 2003. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. Edisi 25. San Francisco: McGraw Hill. / *Chemosphere*.
- Dahlan MS. 2015. *Statistik Untuk Kedokteran Dan Kesehatan*. Edisi 6th. Jakarta: salemba medica.
- Darmawati S, Santosa B, Indonesia D. 2018. Aktivitas hemagglutinas protein pilli salmonella typhi terhadap eritrosit manusia dan domba. *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus*. 1:86–90.
- Di Martino P, Cafferini N, Joly B, Darfeuille-michaud A. 2003. Klebsiella pneumoniae type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in Microbiology*. 154:9–16.
- Dos Santos R, Carvalho AL, Roque ACA. 2017. Renaissance of protein crystallization and precipitation in biopharmaceuticals purification. *Biotechnology Advances*. 35(1):41–50.
- Ehara M, Ishibashi M, Ichinose Y, Iwanaga M, Shimotori S, Naito T. 1987. Purification and partial characterization of fimbriae of vibrio cholerae o1. *Butterworth & Co*. 5(December):283–288.
- Elfita L. 2014. Analisis profil protein dan asam amino sarang burung walet (collocalia fuchiphaga) asal painan. *Valensi*. 4(1):61–69.
- Fitrawati F, Wibowo MH, Amanu S, Sutrisno B. 2015. Isolasi dan identifikasi egg drop syndrome virus dengan uji hemaglutinasi dan hemaglutinasi inhibisi. *Sain Veteriner*. 33(1):59–68.
- Hidayati DYN. 2010. Identifikasi molekul adhesi pili pseudomonas aeruginosa pada human umbilical vein endothelial cells (huvecs) culture. *J.Exp. Life Sci*. 1(1):7–14.
- Honda T, Ni Y, dan Miwatani T. 1988. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of kanagawa phenomenon-negative vibrio parahaemolyticus and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*. 56(4):961–965.
- Juwita U, Haryani Y, dan Jose C. 2005. Jumlah bakteri coliform dan deteksi escherichia coli pada daging ayam di pekanbaru. *JOM FMIPA*. 1(2):48–55.
- Kazimoto T, Abdulla S, Bategereza L, Juma O, Mhimbira F, Weisser M, Utzinger J, von Müller L, Becker SL. 2018. Causative agents and antimicrobial resistance patterns of human skin and soft tissue infections in bagamoyo, tanzania. *Acta Tropica*. 186:102–106.
- Khan LB, Swift S, Kamal T, Read HM. 2018. Tips & tools simulation of microbact strip assay using colored liquids to demonstrate identification of unknown gram-negative organisms. *Journal of Microbiology & Biology Education*. 19(2):19–22.
- Khater FD, Balestrino D, Charbonnel , Dufayard JF, Brisse S, dan Forestier C. 2015. In silico analysis of usher encoding genes in klebsiella pneumoniae and characterization of their role in adhesion and colonization. *PLoS ONE*. 10(3):1–24.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*. 227:680–685.
- Leboffe MJ and Pierce BE. 2011. *A Photographic Atlas for The Microbiology Laboratory*. Edisi 4th. USA: Morton Publishing Company.
- Letourneau J, Levesque C, Berthiaume F, Jacques M, Mourez M. 2011. In vitro assay of bacterial

- adhesion onto mammalian epithelial cells. *Journal of Visualized Experiments*. 1(51):3–6.
- Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. 2014. Molecular pathogenesis of klebsiella pneumoniae. - pubmed - ncbi. *Future Microbiol*. 9:1071–1081.
- Li XIN, Johnson DE, Mobley HLT. 1999. Requirement of mrph for mannose-resistant proteus -like fimbria-mediated hemagglutination by proteus mirabilis. *Infection and Immunity*. 67(6):2822–2833.
- Ling JM, Hut YW, French GL. 1988. Evaluation of the microbact-24e bacterial identification system. *J Clin Pathol*. 41(March):910–914.
- Norsworthy AN, Pearson MM. 2017. From catheter to kidney stone: the uropathogenic lifestyle of proteus mirabilis. *Trends in Microbiology*. 25(4):304–315.
- Parslow TG, Stites DP, Terr AI, dan Imboden J. 2001. *Medical Immunology*. Edisi 10th. USA: Mc Graw Hill.
- Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. 2014. *Pneumonia Komunitas*. Edisi 2. Jakarta: Medicine Faculty of Indonesia University.
- Podmirseg SR, Jäkel H, Ranches GD, Kullmann MK, Sohm B, Villunger A, Lindner H, Hengst L. 2016. Caspases uncouple p27kip1 from cell cycle regulated degradation and abolish its ability to stimulate cell migration and invasion. *Oncogene*. 35(35):4580–4590.
- Savage GP. 2003. *Hemagglutinins (haemagglutinins)*. Academic Press
- Soemarno, Yanuhar U, Widodo M, Sumitra B. 2002. Molecular Weight of Reseptor Salmonella Thyphosa at Culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). Malang: Maj. Kedok. Unibraw. April 2002. Halaman 9–13.
- Sumarno RP, Avanita AS, Winarsih S, Hidayat S, dan Nurhidayati DY. 2015. Haemagglutination of shigella dysenteriae subunit pili protein with anti-haemagglutination of s. dysenteriae subunit pili protein as a molecule adhesion in mouse enterocyte. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(5):1275–1276.
- Sutandhio S, Alimsardjono L, Lusida MI. 2015. *Distribusi dan Pola Kepekaan Enterobacteriaceae dari Spesimen Urin di RSUD DR. Soetomo Surabaya Periode Januari – Juni 2015*
- Syahputra RRI. 2018. Pola Kepekaan Bakteri Terhadap Antibiotik Pada Pasien Infeksi Saluran Kemih Di RSD DR. Soebandi Jember. Jember University.
- Thomas DH, Rob A, Rice DW. 1989. A novel dialysis procedure for the crystallization of proteins. *Protein Engineering*. 2(6):489–491.
- Zhang H, Yang Q, Liao K, Ni Y, Yu Y, Hu B, Sun Z, Huang W, Wang Y, Wu A, Feng X, Luo Y, Chu Y, Chen S, Cao B, Su J, Duan Q, Zhang S, Shao H, Kong H, Gui B, Hu Z, Badal R, Xu Y. 2017. Update of incidence and antimicrobial susceptibility trends of escherichia coli and klebsiella pneumoniae isolates from chinese intra-abdominal infection patients. *BMC Infectious Diseases*. 17(1):1–9.