



**PERAN PROTEIN PILI 11 kDa BAKTERI *Streptococcus pneumoniae* SEBAGAI PROTEIN ADHESIN**

**SKRIPSI**

Oleh

**Yuna Annisa Salsabila  
NIM 162010101095**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2019**



**PERAN PROTEIN PILI 11 kDa BAKTERI *Streptococcus pneumoniae* SEBAGAI PROTEIN ADHESIN**

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Yuna Annisa Salsabila**  
**NIM 162010101095**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**2019**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, atas perlindungan, berkat, rahmat, dan kasih karunia-Nya yang selalu menyertaiku;
2. Rasulullah SAW dan para sahabat yang telah memperjuangkan islam;
3. Orang tua saya, Ibu Nurul Hidayah dan Bapak Gunawan atas doa-doa, motivasi, dorongan, dan kasih sayang yang tak terhingga;
4. Adik-adik saya yang saya sayangi, Wanda Putri Ihsani dan Diwa Nur Rahmatillah;
5. Keluarga saya mbah Cholilah, mbah Nurwidji, mbah Suci Rahayu, mbah Mudjito, dan mbah Muslimah atas doa dan dukungannya;
6. Sahabat dan teman-teman yang telah memberikan doa dan nasihat;
7. Seluruh guru saya sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang selalu memberikan ilmunya membimbing anak didiknya dengan sabar;
8. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

**MOTTO**

“Dan hanya kepada Allah engkau berharap”  
(terjemahan Surat Al-Insyirah ayat 8)\*)



---

\*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2013. *Al-Qur'an dan Terjemahnya*. Bandung: CV Penerbit J-ART

**PERNYATAAN**

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

nama : Yuna Annisa Salsabila

NIM : 162010101095

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Peran Protein Pili 11 kDa Bakteri *Streptococcus pneumoniae* sebagai Protein Adhesin” 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, 16 Desember 2019

Yang menyatakan,

Yuna Annisa Salsabila

NIM 162010101095

**SKRIPSI**

**PERAN PROTEIN PILI 11 kDa BAKTERI *Streptococcus pneumoniae* SEBAGAI PROTEIN ADHESIN**

Oleh

Yuna Annisa Salsabila  
NIM 162010101095

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama (DPU) : Dr. dr. Enny Suswati, M.Kes.

Dosen Pembimbing Anggota (DPA) : dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed.

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Peran Protein Pili 11 kDa Bakteri *Streptococcus pneumoniae* sebagai Protein Adhesin” karya Yuna Annisa Salsabila telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Senin, 16 Desember 2019

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

Dr. dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes.  
NIP 197203182003122001

dr. Cholis Abrori, M.Kes, M.Pd. Ked.  
NIP 197105211998031003

Anggota II,

Anggota III,

Dr. dr. Enny Suswati, M.Kes.  
NIP 197002141999032001

dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed.  
NIP 198304052008121001

Mengesahkan  
Dekan Fakultas Kedokteran,

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



## RINGKASAN

**Peran Protein Pili 11 kDa Bakteri *Streptococcus pneumoniae* sebagai Protein Adhesin**; Yuna Annisa Salsabila, 162010101095; 2019: 58 halaman; Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) termasuk ke dalam genus *Streptococcus* famili *Streptococceae*. Karakteristik yang dimiliki *S. pneumoniae* antara lain: *diplococcus*, berkapsul, dan fakultatif anaerob. Bakteri *S. pneumoniae* memiliki pili yang berfungsi sebagai promotor adhesi dan kolonisasi sel epitel nasofaring, serta inhibitor fagositosis sel imun. Kapsul polisakarida pada bakteri ini dapat menghindari mukus nasal dan neutrofil. Hal ini menyebabkan bakteri memiliki ikatan spesifik sehingga mudah melekat dan memperkuatnya pada mukosa saluran napas, sehingga mudah inisiasi faktor virulensi.

Tujuan penelitian ini ialah untuk mengetahui peran protein pili 11 kDa bakteri *S. pneumoniae* sebagai protein adhesin dan untuk mengetahui adanya hubungan antara titer protein pili 11 kDa bakteri *S. pneumoniae* dengan indeks adhesi. Metode penelitian ini yaitu penelitian *experimental laboratories* dengan *true experimental*. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Waktu yang dibutuhkan untuk pelaksanaan penelitian sekitar tiga bulan, pada bulan Agustus sampai dengan Oktober 2019. Variabel independen dalam penelitian ini adalah titer protein pili 11 kDa bakteri *S. Pneumoniae*, dengan volume protein pili yaitu 0  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 25  $\mu$ l, 12,5  $\mu$ l, 6,25  $\mu$ l, 3,125  $\mu$ l. Variabel dependen dalam penelitian ini adalah indeks adhesi protein pili bakteri *S. pneumoniae*.

Hasil dari uji adhesi menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara titer protein pili dengan indeks adhesi yakni semakin rendah pengenceran maka semakin tinggi indeks adhesinya. Uji normalitas *Saphiro-Wilk* menunjukkan hasil signifikansi variabel *dependent*  $p=0,370$  ( $p>0,05$ ) yang berarti data terdistribusi normal. Uji korelasi dilakukan dalam penelitian ini ialah uji korelasi *Pearson*. Hasil dari uji korelasi didapatkan P value 0,010 ( $p<0,05$ ) yang berarti terdapat hubungan signifikan antara titer protein pili dengan indeks adhesi. Koefisien korelasi yang didapatkan ialah  $R= -0,919$  ( $p<0,05$ ), memiliki arti bahwa titer protein pili dan indeks adhesi memiliki kekuatan hubungan yang kuat dengan hubungan bersifat berlawanan. Hasil uji regresi *Quadratic* didapatkan nilai koefisien determinasi  $R^2=0,974$ , sebesar 97,4% titer protein pili dapat mempengaruhi indeks adhesi.

Kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan hasil penelitian ialah protein pili 11 kDa *S. pneumoniae* berperan sebagai protein adhesin. Titer maksimal dengan jumlah bakteri paling minimal dari analisis data statistik didapatkan 1/9,4. Saran dari peneliti ialah penelitian ini selanjutnya dapat dimanfaatkan oleh peneliti sebagai dasar penelitian lebih lanjut untuk pengembangan sifat imunogenisitas protein pada infeksi bakteri *S. pneumoniae*.



## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Peran Protein Pili 11 kDa Bakteri *Streptococcus pneumoniae* sebagai Protein Adhesin”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

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

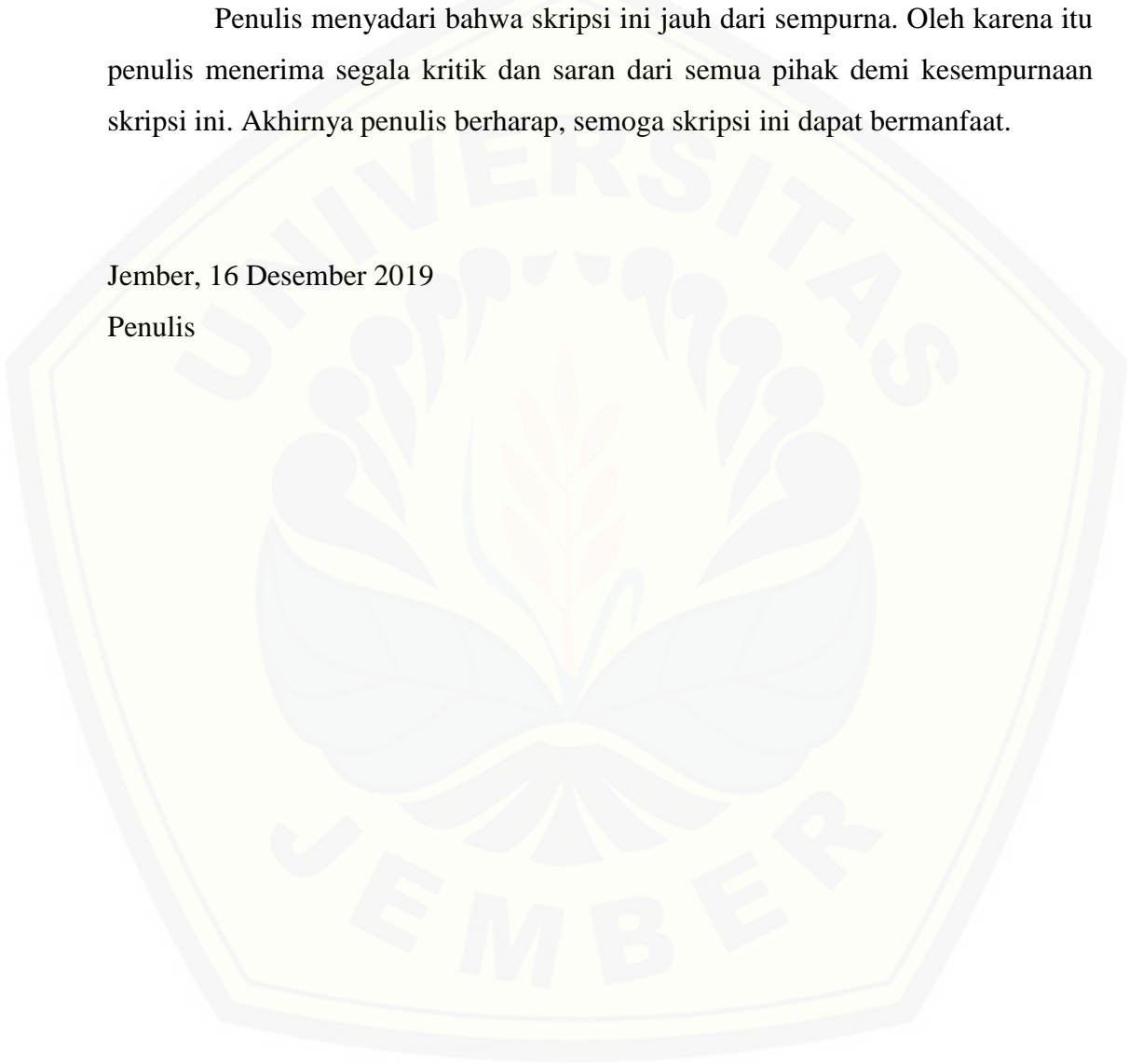
1. dr. Supangat, M.Kes., Ph.D., Sp.BA. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama menempuh Studi Pendidikan Dokter di Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. Dr. dr. Enny Suswati, M.Kes. selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatian dalam membimbing penulisan skripsi ini;
3. Dr. dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes. selaku Dosen Penguji I dan dr. Cholis Abrori, M.Kes, M.Pd. Ked. 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 Nurul Hidayah dan bapak Gunawan yang tidak pernah putus memberikan kasih sayang, doa, perhatian, dukungan, dan seluruh pengorbanannya selama ini;
6. Adik-adik saya yang unik, Wanda Putri Ihsani dan Diwa Nur Rahmatillah yang telah memberikan doa, kasih sayang, pengorbanan, dan kebahagiaan selama ini;
7. Keluarga dunia-akhirat, mbah Cholillah, mbah Nurwidji, mbah Suci Rahayu, mbah Mudjito, mbak Rifa'atul Laila, dan mbak Rahmi yang selalu memberikan doa dan dukungan selama ini;
8. Sahabat-sahabatku, Vira Indah Ayu Belinda, Nita Alfianti, Bella Rizki Dayanti, dan Nidya Husna Kholidah yang telah memberikan doa dan nasihat selama ini;

9. Tim penelitian Keris Mikrobiologi serta Mbak Lilis Lestari selaku analis Laboratorium Mikrobiologi atas kerja sama, bantuan, masukan, dan bimbingannya selama penelitian ini;
10. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih atas segala doa, bantuan, dan kerja samanya 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. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 16 Desember 2019

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>HALAMAN PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	2
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	2
1.3.1 Tujuan Umum .....	2
1.3.2 Tujuan Khusus .....	2
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	3
1.4.1 Manfaat Umum .....	3
1.4.2 Manfaat Khusus .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i></b> .....	4
2.1.1 Morfologi dan Taksonomi .....	4
2.1.2 Epidemiologi dan Transmisi .....	5
2.1.3 Faktor Virulensi .....	7
2.1.4 Manifestasi Klinis .....	13
2.1.5 Imunitas terhadap <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	15
<b>2.2 Protein Adhesin</b> .....	20
<b>2.3 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</b> .....	21
<b>2.4 Kerangka Teori</b> .....	23
<b>2.5 Kerangka Konsep Penelitian</b> .....	25
<b>2.6 Hipotesis</b> .....	26
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	27
<b>3.1 Jenis Penelitian</b> .....	27
<b>3.2 Rancangan Penelitian</b> .....	27
<b>3.3 Populasi dan Sampel Penelitian</b> .....	27
<b>3.4 Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	28
<b>3.5 Variabel Penelitian</b> .....	28
<b>3.6 Definisi Operasional</b> .....	28
<b>3.7 Alat dan Bahan Penelitian</b> .....	28
3.7.1 Alat Penelitian.....	28

3.7.2 Bahan Penelitian.....	29
<b>3.8 Prosedur Penelitian .....</b>	<b>29</b>
3.8.1 Uji Kelayakan Etik.....	29
3.8.2 Pengambilan Sampel.....	29
3.8.3 Identifikasi Bakteri <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	30
3.8.4 Kultur Bakteri <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	31
3.8.5 Isolasi Pili <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	31
3.8.6 Isolasi Protein Pili <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	32
3.8.7 Pemurnian Protein Pili <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	32
3.8.8 Isolasi Sel Pneumosit Mencit.....	33
3.8.9 Uji Adhesi .....	34
<b>3.9 Analisis Data .....</b>	<b>35</b>
<b>3.10 Alur Penelitian.....</b>	<b>36</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>37</b>
4.1 Hasil Uji Adhesi Pili <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	37
4.2 Pembahasan .....	42
<b>BAB 5. SARAN DAN KESIMPULAN .....</b>	<b>46</b>
5.1 Kesimpulan .....	46
5.2 Saran .....	46
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>47</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>55</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
3.1 Definisi Operasional.....	28
4.1 Indeks Adhesi <i>S. Pneumoniae</i> Pada Sel Pneumosit Mencit .....	39
4.2 Estimasi Grafik Analisis Data Regresi .....	40
4.3 Estimasi Parameter Analisis Data dengan Grafik Regresi <i>Quadratic</i> .....	41

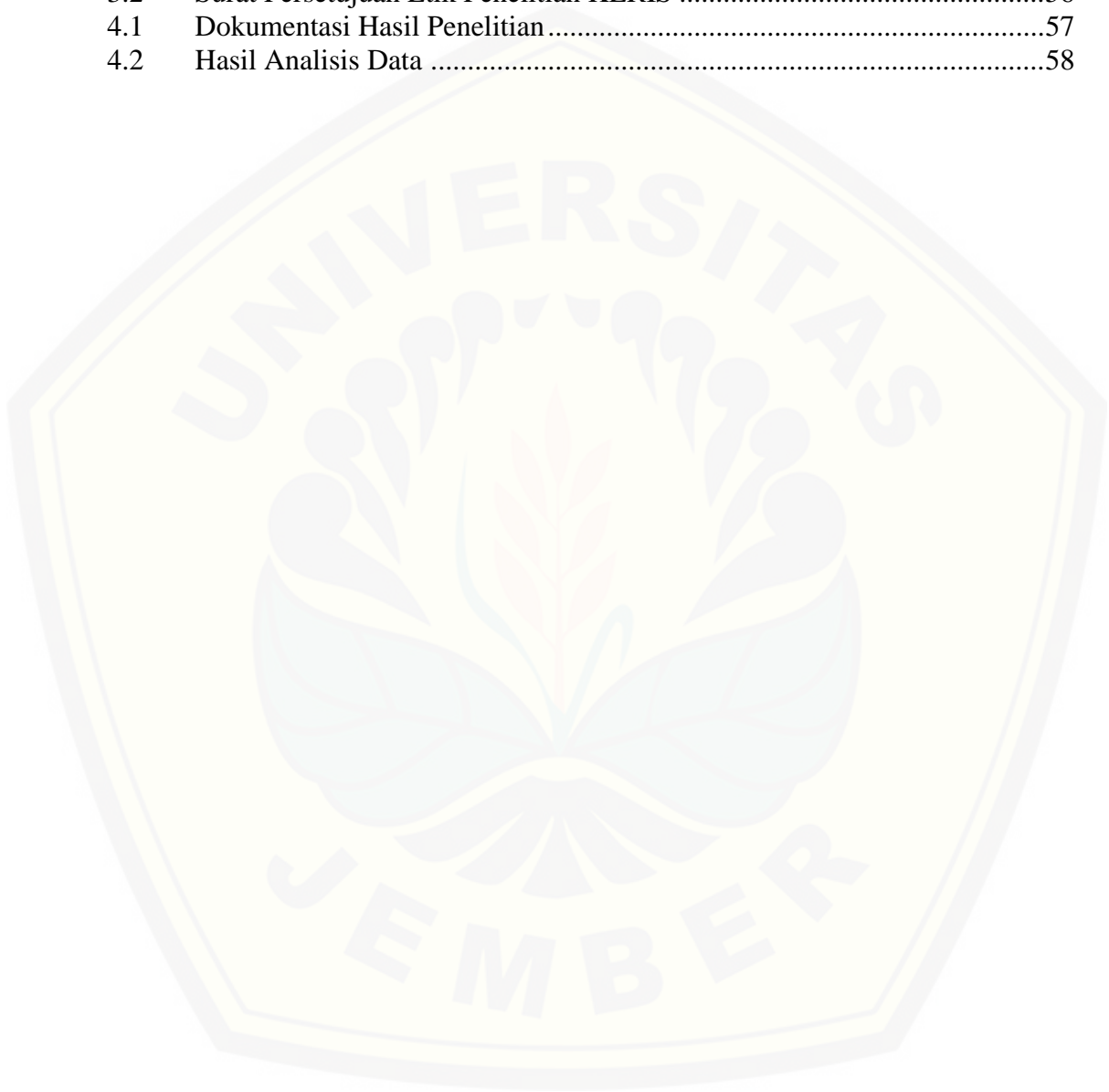


**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Bakteri <i>S. pneumoniae</i> pada Sputum Pasien Pneumonia.....	4
2.2 Morfologi dan Karakteristik <i>S. pneumoniae</i> .....	5
2.3 Faktor Virulensi <i>S. pneumoniae</i> .....	8
2.4 Reseptor Permukaan dan Intraseluler Inang .....	15
2.5 Interaksi <i>S. pneumoniae</i> dengan Sel Epitel Inang.....	16
2.6 Fagositosis dan Respon Imun terhadap Bakteri <i>S. pneumoniae</i> .....	18
2.7 Skema Kerangka Teori.....	23
2.8 Kerangka Konsep Penelitian .....	25
4.1 Bakteri <i>S. pneumoniae</i> pada Pengamatan Mikroskop .....	37
4.2 Sel Pneumosit Mencit pada Pengamatan Mikroskop.....	37
4.3 Hasil uji adhesi protein pili 11 kDa <i>S. pneumoniae</i> dengan berbagai konsentrasi/ dosis protein Pili .....	38
4.4 Grafik Analisis Data Regresi <i>Quadratic</i> .....	41

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
3.1 Surat Tugas Penelitian .....	55
3.2 Surat Persetujuan Etik Penelitian KERIS .....	56
4.1 Dokumentasi Hasil Penelitian .....	57
4.2 Hasil Analisis Data .....	58





## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) termasuk ke dalam genus *Streptococcus* famili *Streptococceae*. Bakteri ini berkoloni utamanya pada traktus respiratorius. Karakteristik yang dimiliki *S. pneumoniae* antara lain: *diplococcus*, berkapsul, dan fakultatif anaerob. *Streptococcus pneumoniae* dapat menyebabkan penyakit seperti pneumonia sinusitis akut, otitis media, konjungtivitis, meningitis, osteomyelitis, arthritis septik, endokarditis, peritonitis, perikarditis, selulitis, dan abses otak. Orang-orang yang memiliki daya tahan tubuh rendah mudah terkena pneumonia, meningitis, dan bakterimia. Bakteri ini menjadi penyebab tertinggi *Community-acquired pneumonia* (CAP) sebagai penyebab utama sepsis di seluruh dunia (Mandell dkk., 2007).

Rata-rata populasi umur  $\geq 65$  rentan terkena pneumonia CAP atau pneumonia yang didapat dari masyarakat. Insidensi pneumonia CAP bakteri *S. pneumoniae* mencapai 11,1 per 10.000 kasus orang dewasa per tahun (Barnett dkk., 2012; Cillóniz dkk., 2013). Di Eropa, insidensi pasien CAP umur  $\geq 65$  tahun sebanyak 76-140 kasus per 10.000 orang dewasa per tahun (Ewig dkk., 2009; Vila-Corcoles dkk., 2009). Di Amerika, insidensi CAP pada orang dewasa umur 65-79 tahun sebesar 63 per 10.000 dan meningkat ke 164,3 kasus per 10.000 pada umur 80 tahun (Jain dkk., 2015).

Bakteri *S. pneumoniae* memiliki pili yang berfungsi sebagai promotor adhesi dan kolonisasi sel epitel nasofaring, serta inhibitor fagositosis sel imun. Kapsul polisakarida pada bakteri ini dapat menghindari mukus nasal dan neutrofil. Hal ini menyebabkan bakteri memiliki ikatan spesifik sehingga mudah melekat dan memperkuatnya pada mukosa saluran napas. Sehingga bakteri mudah melakukan inisiasi faktor-faktor virulensi (Steel dkk., 2013; Xu dkk., 2014).

Penelitian mengenai faktor adhesin yang pernah ditemukan antara lain: (1) protein adhesin hemaglutinin subunit pili 49,6 kDa *Helicobacter pylori* (Suharsono dkk., 2014); (2) peran OMP 55 kDa bakteri *Salmonella typhi* isolat Jember sebagai protein hemaglutinin dan adhesin (Mufida dkk., 2009); (3) subunit protein pili 18

kDa, 23 kDa, 34 kDa, 53 kDa dan OMP 23 kDa dan 27 kDa pada bakteri *Shigella flexneri* penyebab Shigellosis (Ainur dkk., 2017); (4) antibodi terhadap adhesi *Shigella flexneri molecule outer membran/ OMP 28 kDa* (Milliana dkk., 2017); (5) protein haemaglutinin OMP 35 kDa protein adhesin *Proteus mirabilis* (Suswati dan Mufida, 2010). Pada penelitian Mufida dkk. (2018) menyebutkan bahwa SDS-PAGE protein pili *S. pneumoniae* memiliki pita tebal SDS-PAGE pada berat molekul 67 kDa, 54 kDa, 25 kDa, dan 11 kDa.

Berdasarkan latar belakang di atas, peneliti ingin mengetahui apakah protein pili 11 kDa bakteri *S. pneumoniae* berperan sebagai protein adhesin. Sehingga penelitian ini dapat dimanfaatkan untuk pengembangan sifat imunogenisitas protein, serta belum ada penelitian sebelumnya yang membuktikan.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang masalah tersebut, rumusan masalah pada penelitian ini ialah sebagai berikut.

- a. Apakah protein pili 11 kDa bakteri *S. pneumoniae* memiliki peran sebagai protein adhesin?
- b. Adakah hubungan antara titer protein pili 11 kDa bakteri *S. pneumoniae* dengan indeks adhesi?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

- a. Mengetahui peran protein pili 11 kDa bakteri *S. pneumoniae* sebagai protein adhesin.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Mengetahui adanya hubungan antara titer protein pili 11 kDa bakteri *S. pneumoniae* dengan indeks adhesi.
- b. Mengetahui potensi protein pili dalam peranan sebagai protein adhesin.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Umum

- a. Dapat memberikan pengetahuan umum kepada masyarakat mengenai penyakit pneumonia.
- b. Dapat memberikan pemahaman mengenai infeksi pneumonia yang disebabkan oleh bakteri *S. pneumoniae*, khususnya dengan mengetahui peran faktor virulensi pili berat molekul 11 kDa bakteri *S. pneumoniae* sebagai protein adhesin.
- c. Mengetahui potensi protein pili dalam peranan sebagai protein adhesin.

### 1.4.2 Manfaat Khusus

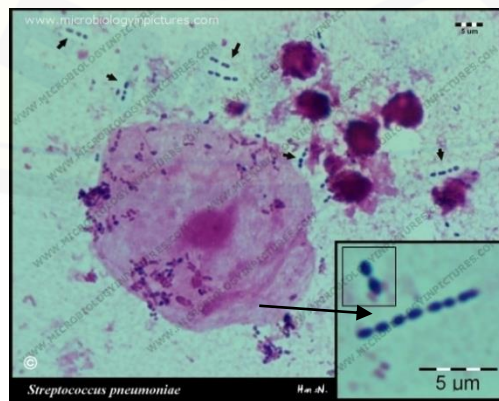
Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar penelitian lebih lanjut untuk pengembangan sifat imunogenisitas protein sebagai pencegahan terhadap infeksi yang disebabkan oleh bakteri *S. pneumoniae*.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Streptococcus pneumoniae*

#### 2.1.1 Morfologi dan Taksonomi

*Streptococcus pneumoniae* merupakan jenis bakteri yang berasal dari famili Streptococceae, memiliki karakter sebagai bakteri Gram positif, berbentuk khas diplokokus lanset, kokoid (rantai), enkapsulasi, anaerob fakultatif, serta dapat bersifat alfa-hemolitik dalam keadaan aerob dan beta hemolitik dalam keadaan anaerob. *Streptococcus pneumoniae* memiliki fenotipe mukoid pada media agar karena adanya kapsul polisakarida yang melekat pada bagian luar membran sebagai faktor virulensi. Bakteri ini biasanya berkoloni di permukaan mukosa manusia pada traktus respiratorius dengan sub-serotipe sebanyak 90 dan 46 telah diidentifikasi berdasarkan kesamaan antigenik. *Streptococcus pneumoniae* dapat diidentifikasi berdasarkan 4 karakteristik fenotip: morfologi koloni pada *blood agar plate* (BAP), solubilitas empedu (lisis oleh empedu melalui uji kelarutan empedu), sensitivitas optochin, dan kapsul polisakarida (Mitchell dan Mitchell, 2010). *Streptococcus pneumoniae* terenkapsulasi pada sputum. Zona bersihan (*clearance*) di sekitar bakteri menunjukkan adanya kapsul polisakarida. Pada kultur BAP bakteri ini dikelilingi oleh zona alfa-hemolisis. *Streptococcus pneumoniae* sensitif terhadap optochin, larut dalam garam empedu, serta terlihat aktivitas autolitik (*Microbiology in Pictures*, 2015).

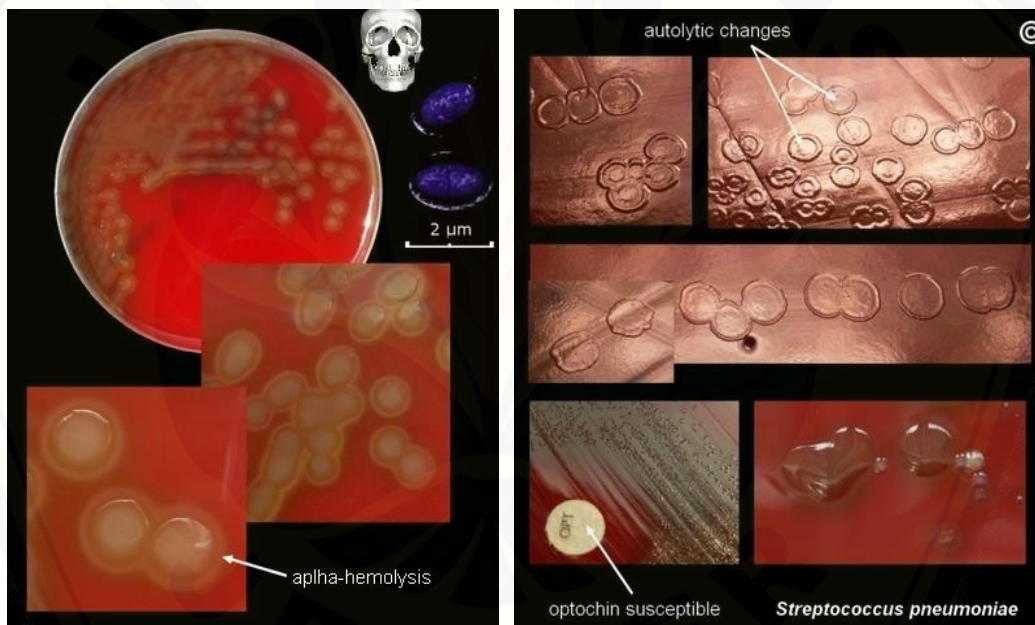


Gambar 2.1 Bakteri *S. pneumoniae* pada Sputum Pasien Pneumonia. Pembesaran Mikroskop 1000x (Sumber: *Microbiology in Pictures*, 2015)



Klasifikasi ilmiah *S. pneumoniae* menurut *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS) adalah sebagai berikut.

*Kingdom* : Bacteria  
*Subkingdom* : Posibacteria  
*Phylum* : Firmicutes  
*Class* : Bacilli  
*Ordo* : Lactobacillales  
*Family* : Streptococceae  
*Genus* : *Streptococcus*  
*Species* : *Streptococcus pneumoniae*



(a) Morfologi *S. pneumoniae*

(b) Karakteristik *S. pneumoniae*

Gambar 2.2 Morfologi dan Karakteristik *S. pneumoniae* (Sumber: *Microbiology in Pictures*, 2015)

### 2.1.2 Epidemiologi dan Transmisi

Pneumonia berdasarkan pajanan lingkungan diklasifikasikan menjadi tiga, yaitu pneumonia komunitas (*Community Acquired Pneumonia* atau CAP), pasien yang menjalani perawatan jangka panjang di rumah sakit atau pneumonia

nosokomial (*Hospital Acquired Pneumonia* atau HAP), dan pasien yang mendapatkan perawatan ventilator (*Ventilator Acquired Pneumonia* atau VAP). Pneumonia nosokomial terjadi >48 jam atau lebih setelah keluar rumah sakit ICU atau dari ruang umum tanpa menggunakan ventilator. Pneumonia dengan perawatan ventilator (VAP) merupakan pneumonia yang terjadi setelah >48 jam atau lebih pemasangan *endotracheal tube* (ETT). Pneumonia nosokomial menjadi penyebab infeksi nosokomial kedua tertinggi di Amerika Serikat dengan morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Pneumonia di ruang ICU lebih tinggi kejadiannya dibanding di ruangan umum dengan presentase 25% infeksi di ICU dan 90% pada ventilasi mekanik. Kasus VAP ditemukan pada 9-27% pasien penerima ETT dengan risiko tertinggi ketika awal memasuki ruang ICU (Abdullahi, 2012; Yahiaoui dkk., 2016).

*Streptococcus pneumoniae* merupakan bakteri Gram positif, patogen oportunistik yang berkoloni pada permukaan mukosa traktus respiratorius bagian atas atau *upper respiratory tract* (URT). Transmisi lokal melalui aspirasi sekret mengandung mikroorganisme patogen, inhalasi aerosol, dan melalui penyebaran hematogen ekstrapulmonal yang berakibat pada inflamasi invasif. Transmisi yang dimulai dari kolonisasi mukosa epitel nasal dapat menginvasi paru menyebabkan pneumonia melalui aspirasi, meningitis melalui bakterimia, CAP, sepsis, serta penyebaran lokal seperti otitis media (Abdullahi, 2012; Yahiaoui dkk., 2016). Sekitar 27-65% anak-anak dan <10% orang dewasa merupakan karier *S. pneumoniae* dan melibatkan hubungan komensal antara bakteri dan inang. Kolonisasi diawali dengan menginfeksi nasofaring. Beberapa faktor dibutuhkan bakteri untuk kolonisasi dan bertahan pada densitas dan durasi yang sufisien untuk transmisi. *Streptococcus pneumoniae* mengekspresikan 2 enzim, yaitu *peptidoglycan-N-acetylglucosamine deacetylase* (PgdA) dan *attenuator of drug resistance* (Adr). Adr memodifikasi peptidoglikan dan mencegah lisis oleh lisozim. Beberapa faktor penting yang memfasilitasi kolonisasi antara lain: adhesi pada sel dan jaringan inang, subversi sistem imun, serta evasi bersihan mukosiliar (Davis dkk., 2008).

*Streptococcus pneumoniae* menjadi patogen penyebab tertinggi CAP atau *community-acquired pneumonia* yang dapat menyebabkan infeksi saluran pernapasan bawah/ ISPB, yaitu pneumonia. Berdasarkan *The Global Burden of Disease*, ISPB merupakan penyebab kematian tertinggi kematian setelah jantung iskemik dan serebrovaskular (Lynch dan Zhanel, 2009). *World Health Organization* 2015 melaporkan sebanyak 3,2 juta dari 56,4 juta kematian di dunia pada tahun 2015 disebabkan oleh ISPB, sebagai penyakit menular paling mematikan. Pada tahun 2016 terdapat 652.572 kematian anak umur <5 tahun dan 1.080.958 kematian dewasa usia >70 tahun dikarenakan ISPB (GBD 2015 LRI Collaborators, 2017). Penyakit ini menjadi penyebab utama kematian balita di dunia dengan presentase 16% per tahunnya, setiap menitnya diperkirakan sebanyak 2 balita meninggal dunia. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia memperkirakan presentase nasional kasus pneumonia 3,55% dengan kasus tertinggi di NTB mencapai 6,38% (Kemenkes RI, 2017).

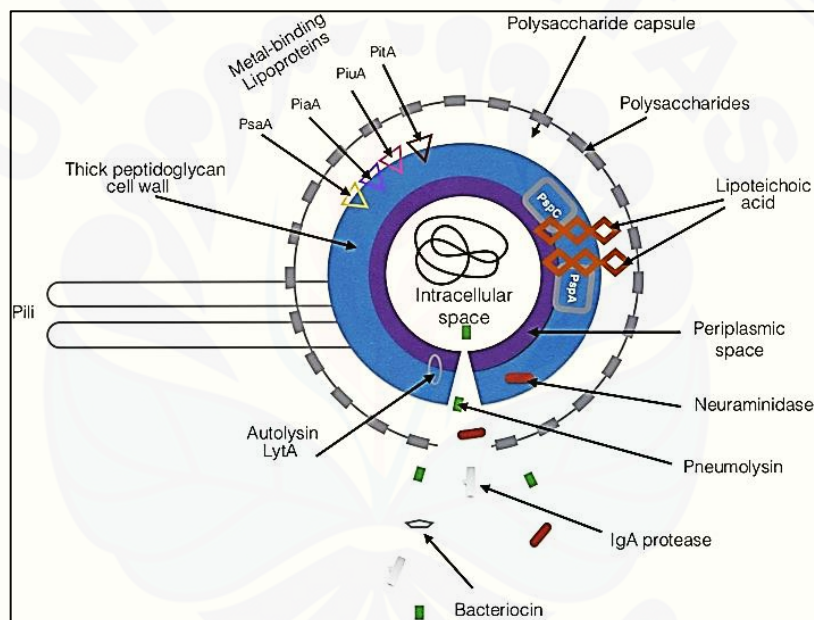
### 2.1.3 Faktor Virulensi

*Streptococcus pneumoniae* yang berkoloni pada permukaan mukosa nasofaring inang dapat bermigrasi ke paru-paru sehingga menyebabkan pneumonia *pneumococcal*. Infeksi ini dapat menyebabkan inflamasi pada kantung udara atau alveolus dengan peningkatan cairan, membuat penderita sulit untuk bernapas. Penderita yang mengalami pneumonia biasanya memiliki gejala peningkatan tekanan darah, napas pendek, batuk terus menerus, dan demam (Kadioglu dkk., 2008). Walaupun kolonisasi *S. pneumoniae* asimtomatis di nasofaring, respon imun dan bersihan yang rendah dapat menyebabkan risiko serius pneumonia *pneumococcal* pasien defisiensi imun atau *immunocompromised* (Wunderink dan Waterer, 2014).

*Streptococcus pneumoniae* seperti bakteri lain, memproduksi toksin yang berbahaya bagi inang, bakteri ini memiliki beberapa protein permukaan dan struktur fisik yang berperan penting dalam patogenesis. Kemampuan pili *S. pneumoniae* berkembang pesat dalam memperoleh genetik baru melalui transformasi dan rekombinasi (Tettelin dkk., 2015). Penelitian variasi genetik pada pneumonia dapat



bermanfaat tidak hanya mengetahui virulensi namun dapat juga untuk pengembangan pengobatan yang efektif dan vaksin. Sekitar 4000 genome *S. pneumoniae* telah diurutkan dengan panjang 2-2,2 juta bp. Gambar 2.3 menunjukkan varietas protein dan toksin diekspresikan serta berperan penting dalam patogenesis. Faktor virulensi *S. pneumoniae* (PsaA, pneumococcal surface adhesin A; PspA, pneumococcal surface protein/ permukaan protein pneumococcal A; PspC, permukaan protein pneumococcal C; PiaA, pneumococcal iron acquisition A; PiuA, pneumococcal iron uptake; dan PitA, pneumococcal iron transporter) ditunjukkan pada Gambar 2.3 (Brooks dan Mias, 2018).



Gambar 2.3 Faktor Virulensi *S. pneumoniae* (Sumber: Brooks dan Mias, 2018)

Virulensi *S. pneumoniae* dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kapsul polisakarida, komponen dinding sel, pneumolysin, autolysin, Psp (*pneumococcal surface protein*), pili, immunoglobulin A1 (IgA1), *hydrogen peroxide*, *pathogenicity islands* (PAIs), dan biofilms.

#### a. Kapsul Polisakarida

Kapsul polisakarida ekstraseluler *S. pneumoniae* merupakan faktor virulensi yang paling penting, berfungsi membantu inisiasi infeksi dengan membiarkan bakteri untuk melakukan adhesi ke sel inang dan menyebabkan inflamasi, sebagai

bentuk proteksi dari sistem imun inang (Hyams dkk., 2010; Mitchell dan Mitchell, 2010). Kapsul polisakarida dapat menghambat fagositosis dari imunitas bawaan (*innate*), mencegah pengenalan bakteri oleh reseptor inang dan faktor komplemen, serta menghindarkan dari neutrofil (Kadioglu dkk., 2008). Beberapa serotipe *S. pneumoniae* dikarakteristikan dengan polisakarida yang terdapat pada *outer coat* kapsul yang memiliki patogenitas berbeda, beberapa ada yang berbahaya (Schuchat dkk., 2001; Rabes dkk., 2016). Sebagai contoh, serotipe 1 ditemukan pada kasus infeksi invasif dengan fatalitas rendah, sedangkan serotipe 3 ditemukan berhubungan dengan kolonisasi nasofaring dan infeksi serius dengan fatalitas tinggi (Hackel dkk., 2013; Wilson dkk., 2015). Kapsul ini memiliki fungsi memanipulasi pengenalan immunoglobulin terhadap bakteri dan menghambat pertahanan inang seperti lapisan mukus dan silia pada pembersihan bakteri (*clearance*), serta berperan vital dalam kolonisasi bakteri. Muatan negatif kapsul berasal dari polisakarida asam dan fosfat, memiliki kemampuan repulsi elektrostatis sehingga dapat menghindari jebakan mukus dan sel fagosit. Mukus dan sel fagosit (makrofag) dapat mengalami reduksi bersihan *S. pneumoniae* dikarenakan adanya interaksi elektrostatis (Li dkk., 2013).

b. Komponen Dinding Sel *S. pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* termasuk bakteri Gram positif dengan dinding sel tebal yang berfungsi sebagai proteksi dan pembentuk sel. Komponen utama dinding sel antara lain: peptidoglikan, dinding *teichoic* (*wall teichoic* atau WTAs), dan asam *lipoteichoic* (*lipoteichoic acids* atau LTAs). WTAs menempel secara kovalen di peptidoglikan sedangkan LTAs terikat pada membran sitoplasma. Kapsul dan protein permukaan sel semua dihubungkan oleh peptidoglikan. Rantai glikan tersusun atas asam N-acetylmuramic (MurNac) dan N-acetylglucosamine (GlcNac) berikatan secara *crosslink* dengan peptida membentuk peptidoglikan. Rantai glikan ini dapat mengalami modifikasi sekunder sehingga membantu virulensi *S. pneumoniae* dengan membuat sel resisten terhadap lisozim. Komponen dinding sel, WTAs, dan LTAs memiliki *phosphorylcholine* (PCho) yang berfungsi sebagai pengait protein pengikat kolin (*choline-binding proteins* atau CBPs). CBPs penting untuk interaksi inang-patogen seperti penghindaran respon imun inang.

PCho pada sel bakteri jarang ditemukan, namun baru-baru ini PCho ditemukan pada bakteri *S. pneumoniae* dan digunakan untuk pertumbuhan. WTAs, LTAs, dan peptidoglikan adalah pola molekuler terkait patogen (*pathogen-associated molecular patterns* atau PAMPs) yang dapat menimbulkan respon inflamasi inang (Bui dkk., 2012).

c. Pneumolysin

Toksin pneumolysin mampu membentuk pori-pori membran sel. Pneumolysin dapat ditemui dalam sitoplasma *S. pneumoniae* dan bakteri Gram positif lainnya. Toksin ini dilepaskan sebagai hasil dari lisis sel dan bersifat toksik bagi inang, kemudian berikatan dengan membran yang mengandung kolesterol dan membentuk pori-pori pada sel inang (Keller dkk., 2016). Selain menyebabkan lisis sel, pneumolysin berperan dalam mempromosikan pembentukan biofilm, mengurangi bersihan mukosa terhadap bakteri, mengganggu sistem kekebalan inang, meregulasi sistem komplemen, dan mereduksi fagositosis oleh imunitas bawaan sel. Toksin ini berperan sebagai agen proinflamasi yang menimbulkan inflamasi, meregulasi produksi sitokin dan kemokin, serta membantu penularan dari inang ke inang (Steel dkk., 2013). Peningkatan inflamasi sel menyebabkan peningkatan penularan bakteri dan penyebaran faktor virulensi (Zafar dkk., 2017).

d. Autolysin

Enzim autolysin terlibat dalam autolisis bakteri yang menghasilkan pelepasan pneumolysin, asam *teichoic*, dan komponen lain dari dalam sel contohnya seperti litik amidase (LytA), amidase terikat *choline* yang mendegradasi peptidoglikan dan menyebabkan sel lisis. Autolysin mempromosikan kolonisasi di sel nasofaring dengan melepaskan toksin seperti pneumolysin selama degradasi dinding sel (van der Poll dan Opal, 2009; Kietzman dkk., 2016).

e. Protein Permukaan *S. pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* memiliki berbagai macam protein permukaan terbuka yang membantu patogenesis dengan bertindak sebagai adhesin sel inang dan menghambat kekebalan inang, khususnya sistem komplemen. Protein permukaan *S. pneumoniae* dikategorikan menjadi 4 kelompok: CBP, lipoprotein,

protein non-klasik, dan protein motif LPXGT, kode X merepresentasikan asam amino (Bergmann dan Hammerschmidt, 2006).

f. Pili

Pili memiliki struktur seperti rambut dan terletak di permukaan sel. Pili berfungsi membantu perlekatan dan kolonisasi di sel epitel nasofaring dan paru-paru. Pili juga membantu bakteri menghindari fagositosis sel inang. Jenis utama pili *S. pneumoniae* ialah pilus-1 dan pilus-2. Pilus-1 ditemukan pada 30% isolat klinis sedangkan pilus-2 hanya sekitar 16%. Penelitian menunjukkan bahwa *S. pneumoniae* yang memiliki pili mampu menginduksi respon TNF yang tinggi daripada yang tidak memiliki pili selama infeksi *pneumococcal*. Hal ini menunjukkan bahwa pili dapat menstimulasi respon inflamasi inang. Ekspresi pilus-1 diregulasi secara in vivo. Ekspresi pilus-1 mengalami penurunan atau *downregulation* selama tahap infeksi yang bertujuan menghindari respon imun inang (Pancotto dkk., 2013). Seperti banyak patogen lain, bakteri ini memiliki pilus tipe 4 yang dibutuhkan untuk transformasi, terbentuk di permukaan sel bakteri dan mengandung pilin ComGC pilin. Operon yang mengkode ComGC juga mengkode ATPase yang dibutuhkan untuk bahan sintesis struktur pilus (Laurenceau dkk., 2013; Muschiol dkk., 2017).

g. Immunoglobulin A1 (IgA1) Protease

Enzim Immunoglobulin A1 (IgA1) protease diproduksi oleh *S. pneumoniae* dan bekerja dengan cara memotong IgA1 inang (manusia) menjadi fragmen. IgA1 merepresentasikan isotipe immunoglobulin A (IgA) yang memiliki 2 isotipe: IgA1 dan IgA2. Kedua isotipe ini memiliki perbedaan pada daerah engsel (Woof dan Russell, 2011). IgA1 memiliki daerah persilangan yang panjang karena terdapat penyisipan asam amino duplikat dalam rangkaian. IgA1 protease dapat menghambat pembunuhan terhadap bakteri melalui pengurangan ikatan regio efektor IgA (Janoff dkk., 2014; Chi dkk., 2017).

h. Hidrogen Peroksida

*Streptococcus pneumoniae* mengeluarkan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang menyebabkan kerusakan DNA inang pada *strain* dengan aktivitas piruvat oksidase (gen SpxB). Produksi  $H_2O_2$  juga memiliki efek bakterisida yang digunakan untuk



mengurangi pertumbuhan bakteri lain yang mungkin bersaing dengan *S. pneumoniae* (Rai dkk., 2015). Selain itu, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang dihasilkan *S. pneumoniae* mampu menginduksi respon imun bawaan sitokin proinflamasi dan menargetkan respon *stress* seluler. Radikal hidroksil melalui reaksi fenton juga terbentuk akibat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang dihasilkan melalui piruvat oksidase. Radikal ini sering berbahaya bagi bakteri lain, namun tidak mempengaruhi *S. pneumoniae*. Hal ini dikarenakan kemampuan *S. pneumoniae* untuk mengurangi OH reaktif sebelum bersentuhan dengan DNA dengan memisahkan Fe<sup>2+</sup> dari DNA. Selain memproduksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gen SpxB juga dapat meningkatkan resistensi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Akan tetapi, mutan SpxB tidak menghasilkan dan kurang tahan terhadap H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yesilkaya dkk., 2013).

i. Pulau Patogenitas (*Pathogenicity Islands* atau PAIs)

Gen-gen pada PAIs berfungsi membantu virulensi patogen serta dapat memberi kode sistem protein yang terlibat dalam perlekatan sel. Contoh, pilus-1 dikode oleh PAI, disebut dengan pulau *rlrA* (*rlrA island*) yang tidak dapat ditemukan pada semua *S. pneumoniae*. Pilus-2 juga dikode PAIs yaitu pilus islet-1. Adhesin penting lainnya, *pneumococcal serine-rich repeat protein* (PsrP) juga dikode oleh PAI. PsrP penting dalam perlekatan *S. pneumoniae* ke sel-sel paru-paru (Shivshankar dkk., 2009; Lizcano dkk., 2017). PAI mempromosikan variasi genetik dalam spesies, hal ini dapat mempengaruhi target pengobatan dan vaksin saat ini.

j. Biofilm

Biofilm merupakan struktur yang terdiri atas sel-sel mikroba agregat dikelilingi oleh matriks ekstraseluler polisakarida dan mampu menempel pada permukaan jaringan. Matriks ekstraseluler memberi proteksi dan meningkatkan virulensi *S. pneumoniae*. Biofilm berfungsi sebagai respon *stress* dan kondisi yang keras untuk meningkatkan kelangsungan hidup bakteri. Untuk mempromosikan formasi dan kompetensi biofilm, *S. pneumoniae* menurunkan regulasi/*downregulation* ekspresi protein kapsul. Penelitian menunjukkan bahwa biofilm *S. pneumoniae* tidak dibersihkan secara efektif selama perawatan mikroba karena terjadi peningkatan resistensi antimikroba. Biofilm bakteri ini juga diketahui mampu menghindarkan diri dari respon imun seperti bersihan mukosa (Fliegauf dkk., 2013; Wu dkk., 2015).

#### 2.1.4 Manifestasi Klinis

*Streptococcus pneumoniae* dapat menyebabkan beberapa penyakit serius antara lain:

##### a. Pneumonia

Pneumonia merupakan infeksi paru-paru yang mengakibatkan peradangan alveolus pada salah satu atau kedua paru-paru. Alveolus dapat berisi pus (dahak purulen) atau cairan. Penyakit ini menjadi penyebab utama kematian balita di dunia dengan jumlah kematian lebih dari 2 juta per tahun. Etiologi pneumonia dapat disebabkan oleh bakteri, virus, jamur, maupun organisme yang menyerupai bakteri seperti *Mycoplasma pneumoniae*. Salah satu bakteri penyebab pneumonia ialah *S. pneumoniae*. Bakteri ini mengawali infeksi dengan kolonisasi orofaring dan nasofaring, berlanjut infeksi saluran napas bawah. Respon imun terhadap infeksi *S. pneumoniae* secara akut diperankan salah satunya oleh makrofag alveolar yang diinduksi oleh kerusakan epitel. Makrofag mengenali *S. pneumoniae* yang teropsonisasi dan *S. pneumoniae* yang tidak teropsonisasi dikenali TLR-2. Selain itu, makrofag juga mempresentasikan antigen ke sel dendritik serta mampu bermigrasi ke arah nodus limfonodi regional. Neutrofil yang telah teraktivasi menuju endotelium (interaksi molekul adhesi integrin) dan epitelium (memicu ekspresi reseptor pada interaksi sel myeloid) di lumen alveolar (Kadioglu dkk., 2008).

Salah satu sitotoksin *S. pneumoniae*, yaitu pneumolysin berperan penting dalam melisiskan sel inang, menghambat kerja mukosiliar, dan memisahkan ikatan antar sel atau *tight junction*. Toksin ini juga berperan pada otitis media *pneumococcal*, menghambat aktivasi seluler dan sekresi sitokin, mempengaruhi penyerapan bakteri ke arah sel dendritik. Pneumolysin juga mengaktifkan jalur komplemen yang dapat dikenali oleh TLR-4 sehingga meningkatkan inflamasi. Proses infeksi tersebut dapat menyebabkan kerusakan pada alveolus dan jaringan sekitarnya, bermanifestasi pada edema dan fibrosis sehingga mengurangi ekspansi paru dan difusi oksigen (Henriques-Normark dan Tuomanen, 2013).

#### b. Bakterimia

Bakterimia adalah keadaan terdapat bakteri dalam darah sehingga menyebabkan sepsis. Elemen paling penting yang mempengaruhi tingginya titer bakterimia ialah kapsul polisakarida *S. pneumoniae*. Kapsul merupakan kunci elemen antifagosit dan antibodi yang bersifat opsonik dan protektif. Masing-masing dari >90 serotipe memiliki polisakarida unik secara struktural dan variasi efisiensi antifagosit. Selain kapsul yang berpengaruh, interaksi komponen permukaan bakteri dengan kaskade komplemen mampu menghambat deposisi komplemen. PspA menghambat deposisi komplemen klasik. Reseptor *scavenger* seperti SR-A, reseptor makrofag dengan struktur kolagen (MARCO), dan LOX-1, menarget asam *teichoic* polianionik dan berperan dalam bersihan bakteri. Interaksi ini memfasilitasi bakteri untuk melengkapi komponen atau sistem fagositik seluler. Dari patofisiologi bakterimia yang telah dijabarkan, bakteri yang menyebar ke darah dari pneumonia dapat menyebabkan sepsis atau peradangan seluruh tubuh karena infeksi bakteri (Henriques-Normark dan Tuomanen, 2013).

#### c. Meningitis

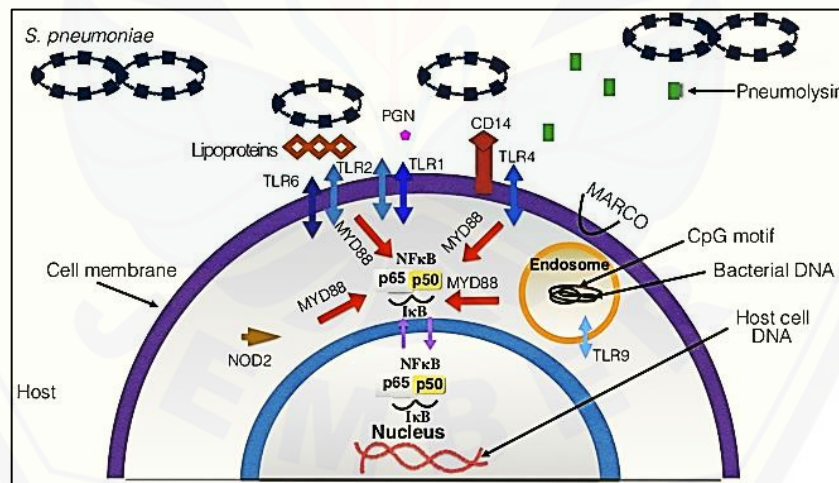
Titer bakteri yang tinggi dalam darah dapat menyebabkan *S. pneumoniae* berkontak dengan *blood brain barrier* (BBB) sel endotel vaskular. Bakteri yang melintasi endotel khusus memungkinkan masuk ke cairan serebrospinal dan parenkim otak. Adhesin bakteri *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, dan *N. meningitidis* dapat berikatan dengan reseptor laminin endotel. Selain itu, NanA dapat mempromosikan adhesi *S. pneumoniae* ke sel endotel otak melalui domain *laminin G-like* lektin. Sekali berikatan dapat menyebabkan efek pada dinding vaskular, bakteri menahan aliran darah dan mengaktifkan sel endotel, khususnya meningkatkan jumlah PAFr pada permukaan endotel. PAFr melibatkan fosforiklorin pada dinding sel dan melakukan translokasi pada bakteri di endotelium secara intraseluler dan memungkinkan perjalanan dari darah ke otak. Kekurangan PAFr atau kekurangan bakteri dalam CbpA tidak akan mengalami meningitis walaupun titer bakteri dalam darah tinggi. Antibodi CbpA bersifat protektif terhadap meningitis pada beberapa spesies bakteri. CbpA merupakan adhesin yang mempresentasikan protein spesifik untuk mengikat reseptor



imunoglobulin pada mukosa nasofaring dan reseptor laminin di BBB/ *blood brain barrier* (Uchiyama dkk., 2009)

### 2.1.5 Imunitas terhadap *S. pneumoniae*

Pertahanan inang dalam mengenali *S. pneumoniae* mampu bekerja cepat dan melakukan pembersihan patogen. Proteksi terhadap *S. pneumoniae* tergantung dari sistem imun inang. Usia berperan penting dalam sistem imun, anak-anak usia <5 tahun dan orang tua memiliki risiko tinggi terpapar *S. pneumoniae*. Respon imun terhadap *S. pneumoniae* dibagi menjadi respon imun bawaan (*first line of defense*) dan respon imun adaptif. Gambar 2.4 menunjukkan reseptor mayor pengenalan patogen penting dalam pengikatan ligan *S. pneumoniae* dan peningkatan respon imun. Selama pengikatan ke ligan, reseptor dan sinyal imun yang teraktivasi dapat memicu produksi sitokin inflamasi dan merekrut sel imun. *Toll-like receptors* (TLRs) ada 10 macam dan berfungsi dalam infeksi *S. pneumoniae* (Brooks dan Mias, 2018).

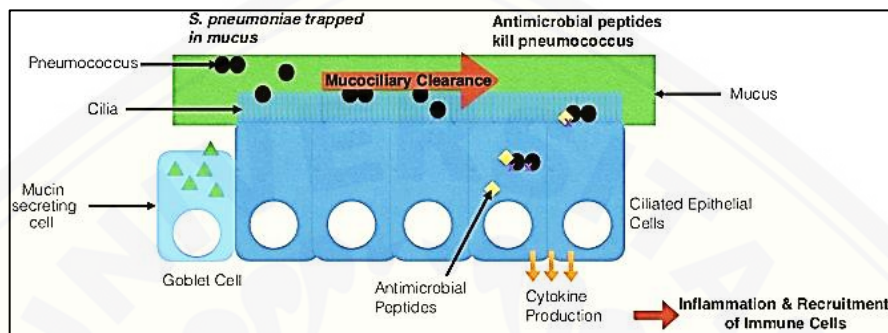


Gambar 2.4 Reseptor Permukaan dan Intraseluler Inang (Sumber: (Brooks dan Mias, 2018))

#### a. Imunitas *Innate* atau Bawaan

Imunitas bawaan melibatkan respon imun non spesifik, sel dan reseptor mengenali patogen serta mengeliminasi patogen yang berbahaya bagi inang. Terdapat 2 tipe sel epitel yang terdapat dalam Gambar 2.5 yaitu sel goblet dan sel

epitel bersilia. Silia bersama dengan mukus diproduksi oleh sel goblet, berfungsi membersihkan patogen melalui bersihan mukosiliar. Sel epitel juga menyekresi peptida antimikroba yang secara langsung membunuh *S. pneumoniae* atau memproduksi sitokin, sehingga memicu inflamasi dan merekrut sel-sel imun (Brooks dan Mias, 2018).



Gambar 2.5 Interaksi *S. pneumoniae* dengan sel epitel inang (Sumber: (Brooks dan Mias, 2018))

Respon imun *innate* meliputi:

#### 1) Mukosa dan Sel Epitel Respiratorius

Sel epitel mukosa memberikan proteksi barrier bagi jaringan dan organ, melindungi dari *S. pneumoniae*. Salah satu jenis sel epitel ialah sel goblet yang menyekresikan mukus. Mukus memiliki muatan negatif yang berfungsi untuk menjaga kelembaban dan menjebak partikel asing serta patogen. Selain itu, sel epitel silia berfungsi secara simultan dengan mukus dalam pembersihan patogen, proses ini disebut bersihan mukosiliar. Setelah patogen terperangkap, silia (*hair-like structure*) bergerak bersama untuk mengarahkan patogen yang terperangkap dan lendir ke mulut untuk dikeluarkan melalui batuk atau menelan. Sel epitel respiratorius dapat merekrut sel-sel lain melalui produksi serta pelepasan sitokin dan kemokin. Selain itu, epitel respiratorius dapat secara langsung membunuh *S. pneumoniae* melalui sekresi peptida antimikroba seperti defensin, apolaktoferin, dan lisozim. Apolaktoferin dapat menyerap besi dan melisiskan sel. Lisozim juga melisiskan sel dan berperan sebagai bakterisidal. D-alanin pada asam *teichoic* dinding *S. pneumoniae* membantu menghindari pembasmian patogen oleh protein

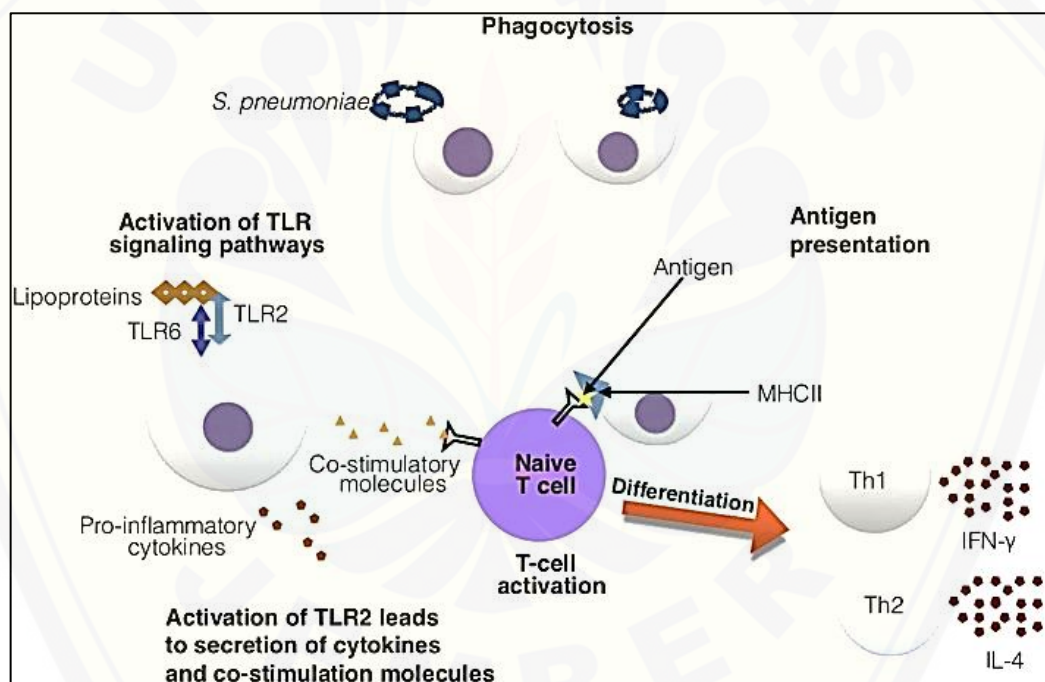
antimikroba (memiliki muatan positif) sehingga dapat mengurangi muatan negatif dari epitel. Muatan negatif yang terdapat pada kapsul juga dapat membantu *S. pneumoniae* untuk menghindari lendir melalui repulsi/ tolakan elektrostatik. Eksperimen model tikus menunjukkan bahwa *S. pneumoniae* yang tidak berkapsul mudah terperangkap mukus dan bermigrasi ke sel epitel dibanding *S. pneumoniae* yang berkapsul. Neuroaminidase pada bakteri ini dapat menurunkan degradasi musin dan mengurangi muatan negatif dengan menghilangkan asam sialik. Selain itu, struktur modifikasi peptidoglikan dapat mempromosikan resistensi terhadap lisis lisozim. Metode unik penghindaran *S. pneumoniae* lain yaitu mampu mengekspresikan kapsul tebal dan tipis. Kapsul tebal diperlukan untuk menghindari jebakan dalam lendir, sedangkan kapsul tipis mengikat langsung ke sel epitel. Setelah kapsul tipis diekspresikan, adhesin terpapar untuk mengikat glikokonjugat pada sel epitel (Brooks dan Mias, 2018).

## 2) Fagosit

Fagosit yang berperan dominan disini ialah neutrofil dan makrofag. Neutrofil memiliki konsentrasi lebih besar dibandingkan dengan sel darah putih lainnya. Umumnya, neutrofil ialah sel darah putih yang pertama menuju ke arah infeksi. Neutrofil termasuk dalam salah satu sel fagosit yang memproduksi granula, berfungsi merusak dinding sel patogen dan membunuhnya (Kolaczowska dan Kubes, 2013). Terdapat 2 jenis granula yang diproduksi neutrofil berdasarkan umur atau kematangan neutrofil: primer (defensin) dan sekunder (lisozim). Neutrofil mampu menangkap *S. pneumoniae* di ekstraseluler menggunakan fiber DNA (Gardiner dan Andrews, 2012).

Makrofag berasal dari monosit dan berfungsi sebagai fagosit yang menelan dan membunuh *S. pneumoniae* secara langsung. Sel-sel ini dapat merekrut sel imun lain, seperti neutrofil melalui sinyal sitokin, memakan neutrofil mati dan sel lain melalui fagositosis dan apoptosis. Makrofag menyerang sel teropsonisasi oleh sistem komplemen dan reseptor Fc $\gamma$  (Arango dan Descoteaux, 2014). Reseptor makrofag dengan struktur kolagen ditemukan di permukaan makrofag, membantu fagositosis pada antigen non-opsonisasi. Aktivasi makrofag dikarenakan adanya *S. pneumoniae* dipengaruhi oleh pola reseptor pengenalan (*Pattern Recognition*

*Receptors* atau PRRs). Sebagai contoh, *Toll-Like Receptors* (TLRs) 2 dan 4 bekerjasama untuk mengaktifkan makrofag ketika ada *S. pneumoniae*. Gambar 2.5 menunjukkan *Toll-like receptors* (TLRs) membantu dalam aktivasi imunitas adaptif sel. TLR2 mengenali lipoprotein *S. pneumoniae*. Selama aktivasi, TLR2 menyekresi sitokin dan molekul *co*-stimulasi. Molekul *co*-stimulasi ini berperan esensial untuk *co*-stimulasi dan aktivasi sel T. Sel T membaca antigen dengan *histocompatibility complex* (MHC) II dan *antigen presenting cell* (APC). Pengenalan antigen-kompleks MHC II dan molekul *co*-stimulasi mengaktifasi sel T dan berdiferensiasi menjadi Th1 dan Th2 yang dapat melepaskan berbagai sitokin seperti interferon-gamma (IFN)- $\gamma$  dan interleukin (IL)-4 (Brooks dan Mias, 2018).



Gambar 2.6 Fagositosis dan Respon Imun terhadap Bakteri *Streptococcus pneumoniae* (Sumber: (Brooks dan Mias, 2018))

### 3) PRRs atau *Pattern Recognition Receptors*

Reseptor ini dapat ditemukan pada permukaan sel inang yang mengenali PAMPs, PRRs dapat terletak di intraseluler atau disekresikan. PAMPs merupakan struktur yang ditemukan pada bakteri dan virus. Reseptor ini berperan penting dalam virulensi patogen. Terdapat 2 tipe reseptor utama yang berpartisipasi di



respon imun terhadap *S. pneumoniae*, yaitu: TLRs dan *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs)* (Murphy dan Weaver, 2017).

#### b. Imunitas Adaptif

Respon imun adaptif terjadi beberapa hari setelah infeksi. Sel-sel yang terlibat dalam respon imun adaptif merespon antigen spesifik patogen. Imunitas adaptif dibagi menjadi 2 jenis respon: humoral dan termediasi sel. Imunitas humoral melibatkan sel B yang diaktivasi antigen, sel B memproduksi antibodi spesifik antigen. Imunitas termediasi sel melibatkan sel T, termasuk aktivasi sel T dan rekrutmen yang dimediasi sel T, melibatkan aktivasi sel imun lain secara langsung dapat membunuh patogen (Murphy dan Weaver, 2016).

Sel-sel kekebalan ini terbentuk di sumsum tulang, sel-sel B matang di sumsum tulang menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi antigen spesifik. Infeksi mukosa dikontrol oleh antibodi IgA spesifik *S. pneumoniae*. IgA dapat ditemukan di daerah mukosa hidung dan saliva setelah kolonisasi *S. pneumoniae*. Sekresi IgA penting dalam opsonisasi *S. pneumoniae* dan mempromosikan fagositosis (Zhang dkk., 2015). *Streptococcus pneumoniae* memiliki protease IgA1 yang membelah IgA inang sehingga dapat memblokir opsonisasi. Setelah dibelah, fragmen Fab yang tersisa berikatan dengan dinding sel, mengekspos CBPs, mengurangi muatan negatif kapsul dan meningkatkan adhesi sel. Fab dapat menetralkan muatan negatif dari kapsul dan mempromosikan adhesi sel. Selanjutnya, komplemen C3 mengaktifkan sel B. Setelah stimulasi antigen, sel B naif berdiferensiasi menjadi sel IgM+ memori B. Diferensiasi ini menghasilkan imunoglobulin yang diperlukan untuk membersihkan infeksi.

Sel T bermigrasi ke timus untuk berdiferensiasi menjadi CD4+ dan CD8+. APCs bersama dengan MHC mempresentasikan antigen (spesifik, peptida) ke sel T untuk menstimulasi respon imun. Pada infeksi *S. pneumoniae*, sel T CD4+ terstimulasi oleh molekul co-stimulator dan APC. Selama aktivasi, sel T helper berdiferensiasi menjadi Th1 dan Th2. Sel helper Th1 menstimulasi respon imun termediasi seluler dengan memproduksi sitokin seperti interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) yang mengaktifasi dan merekrut sel imun lain seperti makrofag. Sel helper Th2

melepaskan sitokin IL-4, diarahkan untuk memfasilitasi respon humoral dengan berinteraksi dengan sel B dan membantu produksi antibodi. Sel T sitotoksik secara langsung membunuh sel terinfeksi. Setelah aktivasi sel T dan sel B, sel-sel imun ini dapat berdiferensiasi menjadi sel T dan sel B memori yang dapat menyediakan respon lebih cepat ketika ada patogen masuk. Sel T-NK juga berperan penting dalam pertahanan infeksi *S. pneumoniae* (Murphy dan Weaver, 2016). Th17 dan sel T regulator juga berperan dalam infeksi ini. Th17 melepaskan sitokin IL-17 sebagai proinflamasi, merekrut dan mengaktivasi makrofag, monosit, dan neutrofil untuk menuju ke tempat infeksi yang diserang oleh bakteri *S. pneumoniae*. Penelitian yang dilakukan Hoe dkk. (2017) mengemukakan bahwa peningkatan produksi IL-17 terbukti mengurangi densitas pneumonia nasofaring di tikus dan anak-anak. Sel T regulator penting dalam meregulasi produksi IL-17 oleh Th17. Ketidakseimbangan sel T regulator dan sel Th17 dapat mengakibatkan penyakit autoimun (Hoe dkk., 2017).

## 2.2 Protein Adhesin

Adhesi bakteri ke mukosa terdiri atas beberapa tahap esensial selama proses kolonisasi. Beberapa protein permukaan *S. pneumoniae* berperan dalam adhesi ke sel epitel antara lain PspC, PsaA, PsrP, PfbB, NanA, PavA, dan pili. Pili bakteri berkaitan dengan adhesi bakteri, pembentukan biofilm, dan translokasi barrier epitel. Struktur-struktur ini terdiri atas subunit yang secara kovalen dihubungkan dengan ikatan isopeptida intermolekuler. Ikatan isopeptida intramolekuler menjaga integritas pilus dari tekanan mekanik dan kimiawi sehingga tetap stabil selama patogenesis (Izoré dkk., 2010).

Pada *S. pneumoniae*, pili (pilus 1 dan 2) dikode oleh 2 genom islet (pilus islet 1 [PI-1] dan [PI-2]). Pilus 1 terdiri atas 3 subunit (RrgA, RrgB, dan RrgC). RrgB merupakan molekul *backbone* atau penyokong, RrgA merupakan protein tambahan utama, terlokalisasi di ujung pilus dan bertanggung jawab untuk sifat adhesi pilus, RrgC ialah protein tambahan kecil dan terletak di pangkal pilus. Pilus tipe I dikode oleh *rlrA* dengan adhesinnya yaitu protein RrgA berikatan dengan *toll-like receptor* (TLR) 2 (Anderton dkk., 2007).

Setelah perlekatan awal pada epitel mukosa, bakteri menempelkan kapsul polisakarida di tempat adhesi untuk memberikan akses ke mukosa pernapasan dan memfasilitasi molekul adhesi yang tertanam dalam dinding sel bakteri atau membran sitoplasma. Lipoprotein PsaA yang berikatan dengan reseptor *E-cadherin*, protein PavA yang berikatan dengan matriks ekstraseluler protein fibronektin, dan adhesi sel molekul integrin merupakan protein adhesin yang dipresentasikan membran dan dinding sel *S. pneumoniae* (Anderton dkk., 2007).

*Streptococcus pneumoniae* menempel pada sel epitel faring melalui interaksi spesifik adhesin permukaan bakteri dengan reseptor glikokonjugat. Adhesin memiliki beberapa sifat, antara lain: penempelan seluruh bakteri dipengaruhi oleh tripsin, periodate, dan suhu tinggi; panas yang diterima bakteri menyebabkan pelepasan material sehingga merekonstruksi adhesi, molekul yang dilepaskan akan berikatan dengan sel epitel; komponen bakteri mampu mengikat adhesin di *protoplast* dan fraksi dinding sel melalui induksi mekanik atau deoksilat dari lisis *S. pneumoniae* (Anderton dkk., 2007).

### **2.3 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)**

Elektroforesis merupakan teknik pemisahan molekul bermuatan berdasarkan perbedaan migrasi dalam medan listrik. Prinsip kerja elektroforesis menggunakan sifat partikel bermuatan: bergerak ke arah kutub yang berlawanan dengan muatannya (ion negatif ke anoda dan sebaliknya) dan terjadinya pemisahan ketika laju gerak berbeda karena adanya perbedaan ukuran dan muatan partikel. Gel elektroforesis dapat digunakan untuk pemisahan campuran protein, glikoprotein, lemak, asam nukleat (DNA dan RNA), dan campuran enzim. Aplikasi elektroforesis salah satunya ialah SDS-PAGE yang merupakan analisis protein berdasarkan ukurannya serta dapat digunakan secara luas. SDS-PAGE memiliki pemisahan yang lebih baik dan lebih menguntungkan dibanding selulosa asetat dan kertas. Hasil polimerisasi bis-akrilamida dan akrilamida dengan katalis TEMED/tetrametilendiamin dan amonium persulfat (APS) merupakan medium penyangga yang digunakan dalam analisis protein ini. Sampel protein ditambahkan SDS dan merkaptoetanol untuk mengubah struktur 3 dimensi protein. Pemisahan molekul



didasarkan pada perbedaan berat molekul. Konsentrasi akrilamid menentukan ukuran pori yang terbentuk, semakin rendah konsentrasi akrilamid yang digunakan, semakin besar ukuran pori gel, gel akan semakin lunak dan mudah rapuh (Steinberg, 2009).

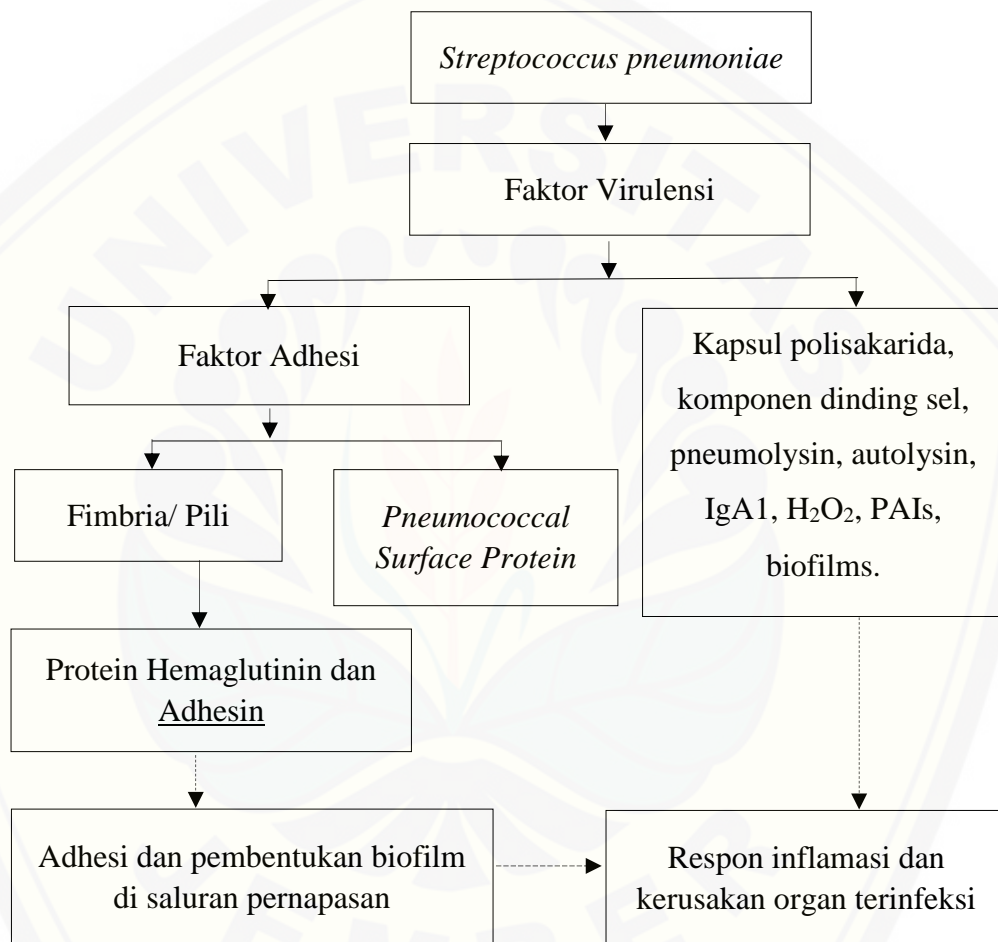
SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) memberikan muatan negatif sehingga menghilangkan perbedaan konformasi dan muatan protein-protein sampel. Kompleks SDS-polipeptida berbentuk batang dan bermuatan negatif, tidak dipengaruhi pH. Sehingga, migrasi polipeptida hanya berdasar berat molekul. Semakin besar berat molekul, semakin lambat migrasi dalam gel elektroforesis.

Gel elektroforesis terdiri atas gel penumpuk (*stacking gel*) yang memiliki pori besar dan gel pemisah (*separating/ resolving gel*) yang memiliki pori lebih kecil. Gel penumpuk yang dilewati molekul sampel terjadi penempatan sampel diatas gel. Sampel yang tertumpuk (*stacked*) pada *stacking gel* bergerak melewati pori-pori *separating gel* dan terpisahkan berdasarkan berat molekul setelah dialirkan arus listrik.

SDS-PAGE dapat menentukan protein termasuk oligomerik atau monomerik terhadap protein tidak larut dan kekuatan ion rendah, menetapkan jumlah rantai polipeptida (subunit/ monomer) dan berat molekul protein. Menurut Saputra (2004), prinsip dan langkah dasar analisis protein SDS-PAGE dimulai dari SDS dicampurkan dengan larutan protein yang akan dianalisis, SDS memiliki muatan negatif *range* pH luas apabila dilarutkan dan merupakan detergent anionik. Muatan negatif ini akan mendetunisasi struktur protein. Kemudian, protein akan tertarik kuat ke anoda ketika ditempatkan di medan listrik. Selanjutnya, molekul-molekul protein bermigrasi melalui gel poliakrilamid saat diberikan arus listrik, menuju anoda/ kutub positif, molekul kecil bermigrasi lebih cepat sehingga terjadi pemisahan. Pergerakan molekul protein melalui pori dipengaruhi oleh diameter molekul protein. Molekul besar pergerakannya lebih lambat dan tertahan. Berat molekul mempengaruhi diameter sehingga dapat mengalami denaturasi. Oleh karena itu, SDS-PAGE memisahkan molekul-molekul protein berdasarkan berat molekulnya. Pewarna khusus dibutuhkan untuk mewarnai gel sehingga dapat melihat pita komponen yang terbentuk. Pewarna khusus yang digunakan dalam

SDS-PAGE yaitu: *Coomassie Brilliant Blue* (berfungsi mengikat ikatan kovalen dengan protein secara spesifik) dan *Silver Salt Staining* (memiliki sifat lebih akurat dan sensitif namun proses yang dibutuhkan lebih lama).

## 2.4 Kerangka Teori



Keterangan:

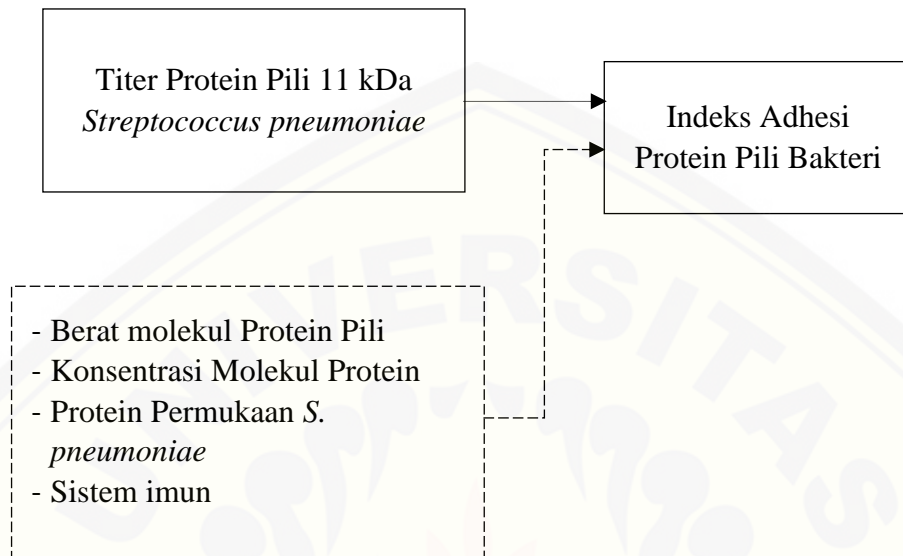
-----> = menyebabkan

-----> = menyusun

Gambar 2.7 Skema Kerangka Teori (Sumber: Pancotto dkk., 2013)

Salah satu penyebab terjadinya infeksi pneumonia, meningitis, otitis media adalah bakteri *S. pneumoniae*. *Streptococcus pneumoniae* memiliki beberapa faktor virulensi yang berperan dalam terjadinya infeksi yaitu kapsul polisakarida, komponen dinding sel, pneumolysin, autolysin, Psp/ *pneumococcal surface protein*, pili, immunoglobulin A1 (IgA1), *hydrogen peroxide*, *pathogenicity islands* (PAIs), biofilms. Faktor adhesi memiliki peranan penting dalam menginfeksi inang. Faktor adhesi melibatkan pili yang dapat membantu perlekatan dan kolonisasi di sel epitel nasofaring dan paru-paru. Pili memiliki struktur seperti rambut, terletak di permukaan sel serta menstimulasi respon inflamasi dan menghindari respon imun inang. Setelah terjadi adhesi pili ke permukaan sel inang, faktor virulensi lain dapat dengan mudah dikeluarkan dan disebarkan. Biofilm merupakan struktur yang terdiri atas sel-sel mikroba agregat yang dikelilingi oleh matriks ekstraseluler polisakarida yang menempel pada permukaan jaringan. Matriks ekstraseluler memberi proteksi dan meningkatkan virulensi *S. pneumoniae*. Biofilm berfungsi sebagai respon terhadap stress dan kondisi yang keras untuk meningkatkan kelangsungan hidup bakteri. Biofilm *S. pneumoniae* juga diketahui mampu menghindarkan diri dari respon imun seperti bersihan mukosa. Semakin banyak biofilm yang terbentuk maka semakin memicu respon inflamasi dan menyebabkan kerusakan organ (Pancotto dkk., 2013).

## 2.5 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan:

—————→ = mempengaruhi  
-----→

————— = yang diteliti

----- = yang tidak diteliti

Gambar 2.8 Skema Kerangka Konsep Penelitian

*Streptococcus pneumoniae* memiliki beberapa faktor virulensi yang berperan dalam terjadinya infeksi yaitu pili, kapsul polisakarida, komponen dinding sel, pneumolysin, autolysin, Psp atau *pneumococcal surface protein*, pili, immunoglobulin A1 (IgA1), *hydrogen peroxide*, *pathogenicity islands* (PAIs), biofilms. Pili bakteri berkaitan dengan adhesi bakteri, pembentukan biofilm, dan translokasi barrier epitel. Setelah perlekatan pili pada epitel mukosa, bakteri menempelkan kapsul polisakarida di tempat adhesi untuk memberikan akses ke mukosa pernapasan dan memfasilitasi molekul adhesi yang tertanam dalam dinding sel bakteri atau membran sitoplasma.

Faktor adhesi dipengaruhi oleh kemampuannya melakukan adhesi ke pneumosit. Indeks adhesi bertujuan untuk mengukur kemampuan adhesi protein pili 11 kDa bakteri *S. pneumoniae* terhadap pneumosit berdasarkan perbandingan titer atau pengenceran. Faktor lain yang berpengaruh dan tidak diteliti yaitu berat molekul protein pili, konsentrasi molekul protein, protein permukaan *S. pneumoniae*, dan sistem imun.

Pili *S. pneumoniae* dengan berat molekul 11 kDa, 25 kDa, dan 67 kDa pita tebal ditemukan dengan menggunakan analisis protein SDS-PAGE berdasarkan studi pendahuluan yang telah dilakukan (Mufida dkk., 2018). Konsentrasi molekul protein dan berat molekul berpengaruh pada ketebalan pita hasil elektroforesis, sehingga penulis menggunakan berat molekul 11 kDa untuk diuji adhesi serta belum ada yang membuktikan bahwa berat molekul pili 11 kDa berperan sebagai protein adhesin. Penulis berharap protein pili berat molekul 11 kDa mampu berperan sebagai protein adhesin untuk patogenesis virulensi bakteri dan terdapat hubungan antara titer protein pili 11 kDa bakteri *S. pneumoniae* dengan indeks adhesi. Sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan rujukan pengembangan sifat imunogenisitas protein kedepannya.

## 2.6 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini ialah peningkatan titer protein pili 11 kDa bakteri *S. pneumoniae* dapat menurunkan indeks adhesi.



### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

Metode penelitian ini yaitu penelitian *experimental laboratories* dengan *true experimental*. Penelitian *true experimental* adalah jenis penelitian yang memiliki ciri peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang memengaruhi jalannya eksperimen. Penelitian ini termasuk penelitian *experimental laboratories* karena dapat manipulasi variabel dan dilakukan di laboratorium. Penelitian *true experimental* memiliki ciri lain yaitu terdapat randomisasi pada sampel, tempat dan waktu yang ditentukan jelas, dan penelitian dapat diulangi (Sugiyono, 2016).

#### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah rancangan penelitian *experimental posttest-only control design* yaitu dengan melakukan pengukuran setelah perlakuan diberikan (post-test) (Sugiyono, 2016).

Dalam penelitian ini terdapat satu kelompok perlakuan,



Keterangan:

P : *Post test*

I : Intervensi (perlakuan)

Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian

#### 3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dan sampel dalam penelitian ini adalah protein pili bakteri *S. pneumoniae* dengan berat molekul 11 kDa yang telah diidentifikasi penelitian sebelumnya menggunakan SDS-PAGE.

### 3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Waktu yang dibutuhkan untuk pelaksanaan penelitian sekitar tiga bulan, pada bulan Agustus sampai dengan Oktober 2019.

### 3.5 Variabel Penelitian

Variabel independen (bebas) dalam penelitian ini adalah titer protein pili 11 kDa bakteri *S. pneumoniae*. Variabel dependen (terikat) dalam penelitian ini adalah indeks adhesi protein pili bakteri *S. pneumoniae*.

### 3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel berikut;

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Jenis Data
Titer Protein Pili	Perbandingan pengenceran protein pili dengan cairan PBS	Nanodrop	Perbandingan kadar protein pili bakteri dengan cairan PBS	Kuantitatif (Volume protein pili 0 µl, 50 µl, 25 µl, 12,5 µl, 6,25 µl, 3,125 µl)	Rasio
Indeks adhesi	Jumlah bakteri yang menempel di tiap 100 sel pneumosit mencit	Manual Hand Tally Counter	Menghitung jumlah bakteri yang menempel pada sel pneumosit mencit dengan perbesaran mikroskop 1000x	Kuantitatif (jumlah bakteri yang menempel pada 100 pneumosit)	Rasio

### 3.7 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.7.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah vortex, *rotator plate*, inkubator, *pilli cutter*, sterilisator, *centrifuge*, elektroforesis SDS-PAGE, *object glass*, *microplate V*, tabung erlenmeyer, *cover glass*, *beaker glass*, *refrigerator*,



mikroskop, spektrofometer, *auto clave*, *magnetic stirer*, *shaking waterbath*, tabung *falcon*, *plate*, *dialysis tube*, gunting, gelas ukur, pipet tetes, mikropipet, tabung eppendorf, spuit 3 cc, spuit 5 cc, spuit 10 cc, pot sputum, tabung reaksi, dan media transpor, *gel documentation*, *scalpel*, gunting bedah, dan *electroelusion chamber*.

### 3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain: koloni bakteri *S. pneumoniae*, *crystal violet*, iodine, alkohol, etanol dingin, aquades steril, safranin, cairan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, swab kapas, *blood plate*, 200µL 80% gliserol, *blood agar*, *chocolate agar*, media bifasik BHI atau *brain heart infusion*, 5% darah domba, TCG atau *thiaproline carbonate glutamate*, media mengandung 0,02% thioproline, 0,3% NaHCO<sub>3</sub>, 0,1% monosodium 1-glutamate, 1% bacto tryptone, 0,2% ekstrak ragi, 0,5% NaCl, 2% bacto gar, dan 1 mM EGTA, TCA, PBS, larutan buffer yang mengandung 5 mM Ph 6,8 Tris HCl, 5% 2-mercaptoethanol, 2,5% *sodium dodecyl sulfat*, 10% gliserol, warna pelacak biru *bromophenol gel*, *Coomassie Brilliant Blue*, EDTA, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, dithiothreitol, KCL, KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl, pneumosit mencit, gram staining, dan TSB.

## 3.8 Prosedur Penelitian

### 3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Penelitian ini memanfaatkan 1 ekor hewan coba yaitu mencit selama proses penelitian, sehingga membutuhkan perizinan etik dan akan diusulkan ke Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

### 3.8.2 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa spesimen protein pili berat molekul 11 kDa bakteri *S. pneumoniae*. Sampel telah dilakukan identifikasi bakteri dan berat molekul pili pada penelitian sebelumnya (Mufida dkk., 2018). Sehingga, pada penelitian ini peneliti melakukan identifikasi protein pili bakteri sebagai protein adhesin dna mengukur indeks adhesi bakteri *S. pneumoniae* di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

### 3.8.3 Identifikasi Bakteri *S. pneumoniae*

Identifikasi bakteri telah dilakukan pada penelitian sebelumnya (Mufida dkk., 2018). Tata cara yang dilakukan mengacu pada penelitian Joel dkk. (2016). Pewarnaan Gram pada bakteri isolat RS Paru Jember dilakukan dengan cara mengambil satu koloni di kaca preparat kemudian difiksasi dengan menggunakan bunsen, fiksasi dapat membunuh beberapa bakteri namun tahap ini sebenarnya bertujuan agar bakteri tidak ikut terbilas selama prosedur pewarnaan. Setelah itu ditetesi dengan pewarnaan primer atau *crystal violet* pada *heat-fixed smear* selama 1 menit, kemudian bilas *slide* dengan kecepatan air sedang selama maksimum 5 detik untuk membilas *crystal violet* yang tidak menempel pada bakteri. Tambahkan *iodine* selama 1 menit yang bertujuan memfiksasi *crystal violet* pada dinding sel. Bilas *slide* dengan menggunakan aseton atau alkohol selama 3 detik lalu bilas lagi dengan menggunakan air mengalir. Alkohol akan menghilangkan warna (*decolorize*) sampel apabila bakteri tersebut Gram negatif sehingga mampu menghilangkan warna dari *crystal violet*. Namun, apabila alkohol terlalu lama dibiarkan maka dapat menyebabkan warna *crystal violet* pada bakteri Gram positif hilang (*decolorize*). Pewarnaan sekunder menggunakan safranin, dilakukan selama 1 menit. Bilas dengan air mengalir kecepatan sedang selama maksimal 5 detik. Apabila bakteri sampel adalah Gram positif warna yang akan dipertahankan ialah warna *crystal violet* dan warna sekunder/ safranin tidak akan menempel pada dinding sel, sehingga tampak warna ungu pada bakteri Gram positif. Langkah kedua dilakukan uji biokimia pada *Streptococcus* melalui uji katalase. Uji katalase digunakan untuk membedakan antara *Staphylococcus sp.* dan *Streptococcus sp.* dengan cara meneteskan cairan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada koloni yang telah dipersiapkan di kaca objek. Apabila terdapat gelembung udara maka menunjukkan bahwa koloni tersebut ialah *Staphylococcus sp.*, apabila gelembung negatif maka koloni *Streptococcus sp.* Katalase merupakan enzim yang memecah H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menjadi H<sub>2</sub>O dan O<sub>2</sub>. Oksigen ditandai dengan adanya gelembung udara pada cairan. Selanjutnya, uji motilitas dilakukan pada bakteri untuk membuktikan bakteri tersebut motil atau non motil. Uji ini dilakukan dengan cara memasukkan ose tegak lurus pada tabung yang berisi bakteri. Jika bakteri pada garis lurus maka hasil non

motil, apabila bakteri menyebar maka hasil bakteri tersebut ialah motil. Setelah dilakukan uji pewarnaan, uji biokimia, dan uji motilitas, pengamatan dilakukan untuk membuktikan bahwa bakteri tersebut ialah *Streptococcus pneumoniae*.

#### 3.8.4 Kultur Bakteri *S. pneumoniae*

Kultur bakteri *S. pneumoniae* telah dilakukan pada penelitian sebelumnya (Mufida dkk., 2018). *Streptococcus pneumoniae* merupakan bakteri anaerob, Gram positif yang dikultur pada suhu 35-37 °C dengan 5% CO<sub>2</sub>. *Streptococcus pneumoniae* memproduksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> melalui sistem flavoenzim dan tumbuh dengan baik karena terdapat sumber katalase (sel darah merah). Bakteri ini memiliki sifat alfa-hemolitik dan ketika tumbuh pada agar darah koloni tampak kecil, abu-abu, dan memproduksi zona hijau yang menandakan hemolisis. Namun, apabila dikultur lebih dari 24 jam, bagian tengah koloni akan terdepresi.

Kultur bakteri yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya mengacu pada Loukov, (2014). Tahapan kultur bakteri *S. Pneumoniae* dimulai dengan isolasi *S. pneumoniae* menggunakan swab kapas steril dilekatkan pada pelat darah atau *blood plate* dan diinkubasi suhu 37 °C dengan 5% CO<sub>2</sub> selama semalam. Kedua, gores ulang satu koloni pada 2 *plate*: di seluruh piring dan metode tiga pola goresan untuk mengecek pola koloni bakteri. Inkubasi plate pada suhu 37 °C dengan 5% CO<sub>2</sub> dalam semalam. Ketiga, swab kapas steril dan inokulasi bakteri dari plate ke 5 mL *Tryptic Soy Broth* (TSB. apabila motif koloni tampak sama pada metode tiga goresan. Ketika kultur mencapai OD<sub>600</sub>=0,5, kultur 800 µL dapat dibekukan dengan 200 µL 80% gliserol dan disimpan pada -80 °C. Terakhir, apabila bakteri ingin dikembangbiakkan lagi, bakteri diletakkan pada media yang mengandung darah (*blood agar, chocolate agar*).

#### 3.8.5 Isolasi Pili *S. pneumoniae*

Isolasi pili yang dilakukan pada penelitian sebelumnya mengacu pada metode Mufida dkk. (2018). Tahapan isolasi pili *S. Pneumoniae* dimulai dari inokulasi bakteri yang masih terdapat pada *blood agar plates* (BAP) ke media bifasik *brain heart infusion* (BHI) yang disuplementasi dengan 5% darah domba

dan *thioprolin carbonate glutamate* (TCG). Hal ini bertujuan untuk meningkatkan pertumbuhan pili *S. pneumoniae*. Media mengandung 0,02% thioprolin, 0,3% NaHCO<sub>3</sub>, 0,1% *monosodium l-glutamate*, 1% *bactotryptone*, 0,2% ekstrak ragi, 0,5% NaCl, 2% *bacto agar*, dan 1 mM EGTA. Kedua, *Trichloroacetic acid* (TCA) ditambahkan pada tabung yang mengandung bakteri yang telah dipanen dari media hingga konsentrasi mencapai 3%. Tabung disentrifugasi, supernatan dibuang dan pelet diresuspensi di PBS pH 7,4. Ketiga, pili dipotong menggunakan pemotong pili bakteri atau *pilli cutter* selama 30 detik dengan kecepatan 5000 rpm, diulangi sampai 4 kali. Fraksi pili kemudian diisolasi dengan sentrifugasi produk yang telah terpotong sebesar 12.000 rpm pada 4 °C. Terakhir, analisis lebih lanjut dilakukan setelah supernatan pili bakteri disimpan pada suhu 4 °C.

#### 3.8.6 Isolasi Protein Pili *S. pneumoniae* (SDS-PAGE)

Identifikasi protein pili yang dilakukan pada penelitian sebelumnya mengacu pada metode Sarkono dkk. (2016) dengan menggunakan SDS-PAGE. Tahapan isolasi protein pili menggunakan SDS-PAGE dimulai dari pemanasan protein suhu 95-100 °C selama 5 menit pada larutan *buffer* yang mengandung 5 mM pH 6,8 Tris HCl, 5% 2-mercaptoethanol, 2,5% *sodium dodecyl sulfat*, 10% gliserol dengan warna pelacak biru *bromophenol*. Kedua, sebagian (12,5%) gel Mini-Slab dengan 4% *gel tracking* dipilih dan gel dilakukan *running* SDS-PAGE pada 120 mV. Ketiga, gel diwarnai dengan *Coomassie Brilliant Blue* untuk visualisasi, marker protein berat molekul dimuat disamping sampel. Terakhir, kalkulasi berat molekul protein pili menggunakan *gel documentation/ gel doc*.

#### 3.8.7 Pemurnian Protein Pili *S. pneumoniae* (Elektroelusi dan Dialisis)

Pemurnian protein pili *S. pneumoniae* pada penelitian sebelumnya telah dilakukan (Mufida dkk., 2018). Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain: larutan *buffer* pH 6,8 Tris HCl 0,5 M, etanol dingin, PBS steril, aquades steril, dan larutan *buffer* atau penyangga. Alat-alat yang dibutuhkan untuk pemurnian *S. pneumoniae* antara lain: *ependorf*, *beaker glass*, *refrigerator*, *dialise tube*, *magnetic stirrer*, *electroelusion chamber*, dan sentrifus. Tahap pemurnian



protein pili *S. pneumoniae* mengacu pada Seelert dan Krause (2008). Pertama, masing-masing protein gel yang telah diketahui berat molekulnya dipotong melintang, kemudian dilakukan penampungan dalam dialisis *tube* yang berisi larutan *buffer*. Kedua, gel tegangan 20 V dan arus 0,3 A dilakukan elektroelusi dalam *electrochamber* selama 2 jam yang berisi larutan *buffer*. Ketiga, hasil elektroelusi diberikan perlakuan dialisis dengan cara dimasukkan ke *beaker glass* pada *magnetic stirrer*, *beaker glass* berisi aquades steril. Dimasukkan ke dalam *refrigerator* selama 24 jam, kemudian dialisis diulangi dengan penggantian isi *beaker glass* berisi larutan PBS steril. Keempat, protein dari *ependorf* ditampung kemudian ditambahkan dengan etanol. Protein didiamkan dalam *refrigerator* selama semalam. Kelima, protein yang didapatkan disentrifus kecepatan 6000 rpm selama 10 menit suhu 4 °C kemudian diendapkan. Keenam, supernatan yang berisi etanol diambil dan dibuang dengan cara tabung dibalik posisi tutup terbuka dalam *refrigerator*, dilakukan sampai etanol menguap dan habis. Terakhir, *crude protein* dari tabung larutan *buffer* Tris HCl 0,5 M dan pH 6,8 disimpan dalam *deep freeze*.

#### 3.8.8 Isolasi Sel Pneumosit Mencit

Metode Weisser diterapkan dalam isolasi sel pneumosit mencit dalam metode ini mengacu pada Milliana dkk. (2017). Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam isolasi pneumosit ini antara lain: cairan yang berisi 1,55 mM KCl; 8 mM KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 9,6 mM NaCl, 27 mM Na Citrate, PBS steril, PBS pH 7,4 berisi 1 mM dithiothreitol, mencit berat badan 25 gram, 5,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dengan pH 7,4, cairan yang berisi 0,5 mM *dithiothreitol* dan 1,5 mM EDTA. Alat-alat yang digunakan antara lain: *shaking incubator*, pisau bedah, dan spektrofometer. Berikut tahapan yang dilakukan dalam uji isolasi sel pneumosit mencit. Pertama, mencit diberikan anestesi kloroform, kemudian dibedah dan diambil paru-paru. Kedua, usus halus mencit dicuci sampai bersih dengan PBS pH 7,4 yang mengandung 1 mM *dithiothreitol* suhu 4 °C. Ketiga, sel pneumosit yang telah dicuci bersih dimasukkan ke cairan 9,6 mM NaCl, 1,5 KCl, 27 mM Na citrat, 5,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,4, serta 8 mM KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Setelah itu dimasukkan ke dalam *shaking incubator* untuk diinkubasi selama 15 menit dengan suhu 37 °C. Keempat, supernatan yang



diperoleh dibuang, jaringan dimasukkan ke cairan berisi 0,5 mM *dithiothreitol* dan 1,5 mM EDTA, kemudian dikocok kuat selama 15 menit dengan suhu 37 °C, supernatan dibuang. Kelima, Jaringan dicuci dengan cairan PBS, kemudian dilakukan sentrifus kecepatan 1000 rpm selama 5 menit, diulang sebanyak 3 kali. Selanjutnya, sel pneumosit mencit diisolasi dengan suspensi jaringan PBS steril sebelum dianalisis spektrofometer, panjang gelombang diberikan 560 nm sampai dengan konsentrasi 10<sup>6</sup>/ml. Terakhir dapat dilakukan uji adhesi pada sel pneumosit mencit.

### 3.8.9 Uji Adhesi

Uji adhesi yang dilakukan dalam metode ini mengacu pada Nagayama dkk. (1995). Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam adhesi antara lain: bakteri *S. pneumoniae*, media *Blood Agar Plates* (BAP), pneumosit mencit, PBS, dan *Gram staining*. Alat-alat yang digunakan antara lain: *shaking waterbath*, spektrofometer, *shaking incubator*, dan *centrifuge*. Berikut ini tahapan yang dilakukan dalam uji adhesi. Pertama, bakteri *S. pneumoniae* dibiakkan dalam *Blood Agar Plates* (BAP) pada suhu 37 °C kemudian dipanen dengan sentrifus suhu 4 °C selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Suspensi endapan didapat melalui PBS. Kandungan bakteri 10<sup>8</sup>/ml dibuat dengan panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrofometer. Selanjutnya, suspensi 400 µm diambil untuk dibagikan pada masing-masing dosis pili. Pengenceran protein pili 11 kDa dilakukan dengan perbandingan jumlah pili dan cairan PBS 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128. Kontrol negatif yang tidak terdapat protein pili juga diberikan perlakuan (pemberian bakteri). Suspensi pneumosit ditambahkan pada masing-masing dosis sebanyak 400 µm. Kemudian spesimen homogen digoyangkan perlahan menggunakan *shaking waterbath* pada suhu 37 °C selama 30 menit. Setelah itu dilakukan sentrifugasi selama 5 menit sebanyak 2 kali, kecepatan 1000 rpm. Suspensi diambil sebanyak 10 µm dengan 2 kali pengulangan, setelah itu persiapan untuk *gram staining*. Terakhir, pengamatan penghitungan indeks adhesi dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x dan dihitung menggunakan *Manual Hand Tally Counter*.

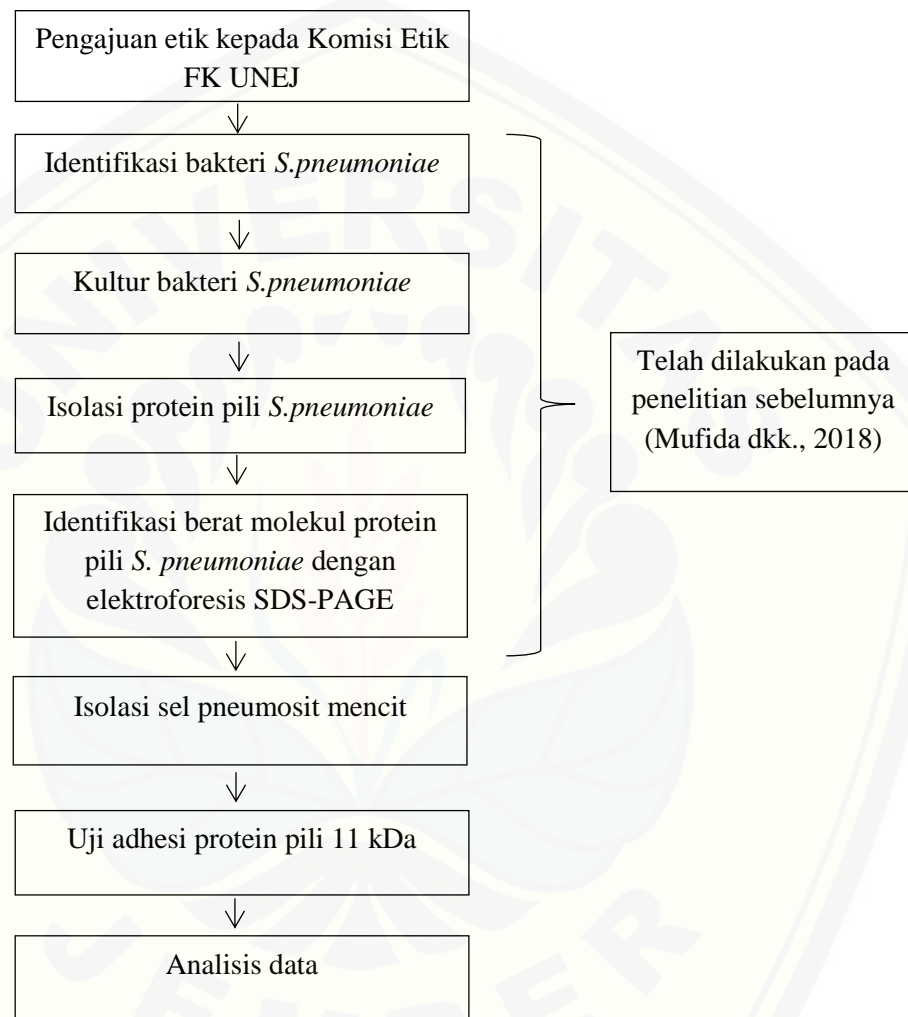
### 3.9 Analisis Data

Penelitian ini dilakukan dengan analisis deskriptif untuk membuktikan adanya protein adhesin pada pili 11 kDa bakteri *S. pneumoniae*. Sedangkan pada perhitungan hubungan antara titer protein pili 11 kDa bakteri *S. pneumoniae* dengan indeks adhesi dilakukan analisis data menggunakan uji statistik korelasi *Pearson*. Sehingga, hasil akhir akan didapatkan berupa pengenceran minimal untuk jumlah bakteri yang paling kecil melalui penghitungan persamaan diagram di SPSS.



### 3.10 Alur Penelitian

Tahap identifikasi protein pili 11 kDa bakteri *S. pneumoniae* sebagai protein adhesin



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan hasil penelitian ialah:

- a. Protein pili 11 kDa *S. pneumoniae* berperan sebagai protein adhesin,
- b. Terdapat hubungan yang kuat antara titer protein pili 11 kDa *S. pneumoniae* dengan indeks adhesi.
- c. Potensi protein pili sebagai adhesin ialah pada titer maksimal 1/9,4.

### 5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan oleh peneliti ialah penelitian ini selanjutnya dapat dimanfaatkan oleh peneliti sebagai dasar penelitian lebih lanjut untuk pengembangan sifat imunogenisitas protein pada infeksi bakteri *S. pneumoniae*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullahi, O. 2012. The prevalence and risk factors for pneumococcal colonization of the nasopharynx among children in Kilifi district. Kenya
- Ainur F., A., L. N Rachma, A. Milliana, T. E Hernowati, A. Aulani, S. Santoso, dan S. Reto Prawiro. 2017. Cross reaction among antibody pili subunit hemagglutinin proteins and outer membrane subunit hemagglutinin proteins of *Shigella flexneri*. *Journal of Tropical Life Science*. 7:1–7.
- Anderton, J. M., G. Rajam, S. Romero-Steiner, S. Summer, A. P. Kowalczyk, G. M. Carlone, J. S. Sampson, dan E. W. Ades. 2007. E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface adhesin A (PsaA) of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*. 42(5–6):225–236.
- Arango D., G. dan A. Descoteaux. 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology*. 5:491.
- Barnett, K., S. W. Mercer, M. Norbury, G. Watt, S. Wyke, dan B. Guthrie. 2012. Epidemiology of multimorbidity and implications for health care, research, and medical education: a cross-sectional study. *Lancet (London, England)*. 380(9836):37–43.
- Bergmann, S. dan S. Hammerschmidt. 2006. Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology (Reading, England)*. 152(Pt 2):295–303.
- Bhalla, M., J. H. Yeoh, C. Lamneck, S. E. Herring, E. Y. I. Tchalla, J. M. Leong, dan E. N. B. Ghanem. 2019. *AI Adenosine Receptor Signaling Reduces Streptococcus pneumoniae Adherence to Pulmonary Epithelial Cells by Targeting Expression of Platelet-Activating Factor Receptor*. *Microbiology*
- Brooks, L. R. K. dan G. I. Mias. 2018. *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: aging, diagnostics, and prevention. *Frontiers in Immunology*. 9:1366.
- Bui, N. K., A. Eberhardt, D. Vollmer, T. Kern, C. Bougault, A. Tomasz, J.-P. Simorre, dan W. Vollmer. 2012. Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*. *Analytical Biochemistry*. 421(2):657–666.
- Chi, Y.-C., J. T. Rahkola, A. A. Kendrick, M. J. Holliday, N. Paukovich, T. S. Roberts, E. N. Janoff, dan E. Z. Eisenmesser. 2017. *Streptococcus pneumoniae* Iga1 protease: a metalloprotease that can catalyze in a split manner in vitro. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. 26(3):600–610.



- Cillóniz, C., E. Polverino, S. Ewig, S. Aliberti, A. Gabarrús, R. Menéndez, J. Mensa, F. Blasi, dan A. Torres. 2013. Impact of age and comorbidity on cause and outcome in community-acquired pneumonia. *Chest*. 144(3):999–1007.
- Connolly, E., E. Millhouse, R. Doyle, S. Culshaw, G. Ramage, dan G. P. Moran. 2017. The porphyromonas gingivalis hemagglutinins hagg and haggc are major mediators of adhesion and biofilm formation. *Molecular Oral Microbiology*. 32(1):35–47.
- Cundell, D. R. dan E. I. Tuomanen. 1994. Receptor specificity of adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human type-ii pneumocytes and vascular endothelial cells in vitro. *Microbial Pathogenesis*. 17(6):361–374.
- Davis, K. M., H. T. Akinbi, A. J. Standish, dan J. N. Weiser. 2008. Resistance to mucosal lysozyme compensates for the fitness deficit of peptidoglycan modifications by *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathogens*. 4(12)
- Day CJ, Paton AW, Harvey RM. 2017. Lectin activity of the pneumococcal pilin proteins. *Sci Rep*. 7(1):17784.
- Ewig, S., N. Birkner, R. Strauss, E. Schaefer, J. Pauletzki, H. Bischoff, P. Schraeder, T. Welte, dan G. Hoeffken. 2009. New perspectives on community-acquired pneumonia in 388 406 patients. results from a nationwide mandatory performance measurement programme in healthcare quality. *Thorax*. 64(12):1062–1069.
- Fliegau, M., A. F.-P. Sonnen, B. Kremer, dan P. Henneke. 2013. Mucociliary clearance defects in a murine in vitro model of pneumococcal airway infection. *PloS One*. 8(3):e59925.
- Gardiner, E. E. dan R. K. Andrews. 2012. Neutrophil extracellular traps (nets) and infection-related vascular dysfunction. *Blood Reviews*. 26(6):255–259.
- GBD 2015 LRI Collaborators. 2017. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *The Lancet. Infectious Diseases*. 17(11):1133–1161.
- Hackel, M., C. Lascols, S. Bouchillon, B. Hilton, D. Morgenstern, dan J. Purdy. 2013. Serotype prevalence and antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates among global populations. *Vaccine*. 31(42):4881–4887.
- Henriques-Normark, B. dan E. I. Tuomanen. 2013. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 3(7)

- Hoe, E., J. Anderson, J. Nathanielsz, Z. Q. Toh, R. Marimla, A. Balloch, dan P. V. Licciardi. 2017. The contrasting roles of th17 immunity in human health and disease. *Microbiology and Immunology*. 61(2):49–56.
- Hyams, C., E. Camberlein, J. M. Cohen, K. Bax, dan J. S. Brown. 2010. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infection and Immunity*. 78(2):704–715.
- Ishizuka, S., M. Yamaya, T. Suzuki, K. Nakayama, M. Kamanaka, S. Ida, K. Sekizawa, dan H. Sasaki. 2001. Acid exposure stimulates the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 24(4):459–468.
- Jain, S., W. H. Self, R. G. Wunderink, S. Fakhran, R. Balk, A. M. Bramley, C. Reed, C. G. Grijalva, E. J. Anderson, D. M. Courtney, J. D. Chappell, C. Qi, E. M. Hart, F. Carroll, C. Trabue, H. K. Donnelly, D. J. Williams, Y. Zhu, S. R. Arnold, K. Ampofo, G. W. Waterer, M. Levine, S. Lindstrom, J. M. Winchell, J. M. Katz, D. Erdman, E. Schneider, L. A. Hicks, J. A. McCullers, A. T. Pavia, K. M. Edwards, L. Finelli, dan CDC EPIC Study Team. 2015. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among u.s. adults. *The New England Journal of Medicine*. 373(5):415–427.
- Janoff, E. N., J. B. Rubins, C. Fasching, D. Charboneau, J. T. Rahkola, A. G. Plaut, dan J. N. Weiser. 2014. Pneumococcal iga1 protease subverts specific protection by human iga1. *Mucosal Immunology*. 7(2):249–256.
- Joel, K. R. 2016. Identifikasi dan uji sensitifitas bakteri yang diisolasi dari sputum penderita pneumonia di rsup prof. dr. r. d. kandou manado terhadap antibiotik eritromisin, seftriakson dan sefadroksil. *PHARMACON*. 5(4)
- Kadioglu, A., J. N. Weiser, J. C. Paton, dan P. W. Andrew. 2008. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews. Microbiology*. 6(4):288–301.
- Keller, L. E., J. L. Bradshaw, H. Pipkins, dan L. S. McDaniel. 2016. Surface proteins and pneumolysin of encapsulated and nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* mediate virulence in a chinchilla model of otitis media. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 6:55.
- Kemenkes RI. 2017. *Imunisasi PCV Dicanangkan Di Lombok*. 2017
- Kietzman, C. C., G. Gao, B. Mann, L. Myers, dan E. I. Tuomanen. 2016. Dynamic capsule restructuring by the main pneumococcal autolysin lytA in response to the epithelium. *Nature Communications*. 7:10859.

- Kolaczowska, E. dan P. Kubes. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews. Immunology*. 13(3):159–175.
- Laurenceau, R., G. Péhau-Arnaudet, S. Baconnais, J. Gault, C. Malosse, A. Dujeancourt, N. Campo, J. Chamot-Rooke, E. Le Cam, J.-P. Claverys, dan R. Fronzes. 2013. A type iv pilus mediates dna binding during natural transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathogens*. 9(6):e1003473.
- Li, Y., D. M. Weinberger, C. M. Thompson, K. Trzciński, dan M. Lipsitch. 2013. Surface charge of *Streptococcus pneumoniae* predicts serotype distribution. *Infection and Immunity*. 81(12):4519–4524.
- Lizcano, A., R. Akula Suresh Babu, A. T. Shenoy, A. M. Saville, N. Kumar, A. D’Mello, C. A. Hinojosa, R. P. Gilley, J. Segovia, T. J. Mitchell, H. Tettelin, dan C. J. Orihuela. 2017. Transcriptional organization of pneumococcal psrp-secy2a2 and impact of gtfA and gtfB deletion on psrp-associated virulence properties. *Microbes and Infection*. 19(6):323–333.
- Loukov, D. 2014. Culture of *Streptococcus pneumoniae*. *Bowdish Lab, Macrophage Biology*. 2.
- Lynch, J. P. dan G. G. Zhanel. 2009. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology, risk factors, and strategies for prevention. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 30(2):189–209.
- Mandell, L. A., R. G. Wunderink, A. Anzueto, J. G. Bartlett, G. D. Campbell, N. C. Dean, S. F. Dowell, T. M. File, D. M. Musher, M. S. Niederman, A. Torres, C. G. Whitney, Infectious Diseases Society of America, dan American Thoracic Society. 2007. Infectious diseases society of america/american thoracic society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 44 Suppl 2:S27-72.
- Microbiology in Pictures. 2015. *Streptococcus Pneumoniae in Sputum*
- Milliana, A., A. S. Noorhamdani, S. Poeranto, K. Handono, S. R. Prawiro, A. A. Fitriyaningsih, dan L. N. Rachma. 2017. Antibodies against shigella flexneri adhesion molecule outer membrane protein (omp) can cross-react with omps of some shigella species. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 16:255–261.
- Mitchell, A. M. dan T. J. Mitchell. 2010. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 16(5):411–418.

- Mufida, D. C., C. Bumi, dan H. D. Fatmawati. 2009. Peran Protein Membran Luar 55 KDa *Salmonella Typhi* Isolat Jember Sebagai Protein Hemagglutinin Dan Adhesin. 2009
- Mufida, D. C., H. Kalim, S. Reto Prawiro, dan S. Santoso. 2018. Identification of hemagglutinin protein from *Streptococcus pneumoniae* pili as a vaccine candidate by proteomic analysis. *Turkish Journal of Immunology*. 6
- Murphy K dan Weaver C. 2016. *Janeway's Immunobiology*. Edisi 9. New York: Garland Science.
- Murphy K dan Weaver C. 2017. *Janeway's Immunobiology*. New York: Garland Science.
- Muschiol, S., S. Erlendsson, M.-S. Aschtgen, V. Oliveira, P. Schmieder, C. de Lichtenberg, K. Teilum, T. Boesen, U. Akbey, dan B. Henriques-Normark. 2017. Structure of the competence pilus major pilin comgc in *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 292(34):14134–14146.
- Nagayama, Oguchi, T., Arita, M., dan Honda, T. 1995. Purification and characterization of a cell-associated hemagglutinin of vibrio parahaemolyticus. *Infection and Immunity*. 63(5):1987–1992.
- Nelson, A. L., A. M. Roche, J. M. Gould, K. Chim, A. J. Ratner, dan J. N. Weiser. 2007. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infection and Immunity*. 75(1):83–90.
- Ochoa-Gondar, O., A. Vila-Córcoles, C. de Diego, V. Arija, M. Maxenchs, M. Grive, E. Martin, J. L. Pinyol, dan EVAN-65 Study Group. 2008. The burden of community-acquired pneumonia in the elderly: the spanish evan-65 study. *BMC Public Health*. 8:222.
- Oztuna, F., T. Ozlü, Y. Bülbül, K. Buruk, dan M. Topbaş. 2006. Does cold environment affect *Streptococcus pneumoniae* adherence to rat buccal epithelium? *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*. 73(4):546–551.
- Pancotto, L., G. De Angelis, E. Bizzarri, M. A. Barocchi, G. Del Giudice, M. Moschioni, dan P. Ruggiero. 2013. Expression of the *Streptococcus pneumoniae* pilus-1 undergoes on and off switching during colonization in mice. *Scientific Reports*. 3:2040.
- Rabes, A., N. Suttorp, dan B. Opitz. 2016. Inflammasomes in pneumococcal infection: innate immune sensing and bacterial evasion strategies. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 397:215–227.
- Rai, P., M. Parrish, I. J. J. Tay, N. Li, S. Ackerman, F. He, J. Kwang, V. T. Chow, dan B. P. Engelward. 2015. *Streptococcus pneumoniae* secretes hydrogen



- peroxide leading to dna damage and apoptosis in lung cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112(26):E3421-3430.
- Robson, R. L., N. A. Reed, dan R. T. Horvat. 2006. Differential activation of inflammatory pathways in a549 type ii pneumocytes by *Streptococcus pneumoniae* strains with different adherence properties. *BMC Infectious Diseases*. 6(1):71.
- Sarkono, S., S. Moeljopawiro, B. Setiaji, dan L. Sembiring. 2016. Analysis of whole cell protein profiles by sds-page to identify indigenous cellulose-producer acetic acid bacteria. *Indonesian Journal of Biotechnology*. 21(2):86–92.
- Schuchat, A., T. Hilger, E. Zell, M. M. Farley, A. Reingold, L. Harrison, L. Lefkowitz, R. Danila, K. Stefonek, N. Barrett, D. Morse, R. Pinner, dan Active Bacterial Core Surveillance Team of the Emerging Infections Program Network. 2001. Active bacterial core surveillance of the emerging infections program network. *Emerging Infectious Diseases*. 7(1):92–99.
- Seelert, H. dan F. Krause. 2008. Preparative isolation of protein complexes and other bioparticles by elution from polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 29(12):2617–2636.
- Shivshankar, P., C. Sanchez, L. F. Rose, dan C. J. Orihuela. 2009. The streptococcus pneumoniae adhesin psrp binds to keratin 10 on lung cells. *Molecular Microbiology*. 73(4):663–679.
- Steel, H. C., R. Cockeran, R. Anderson, dan C. Feldman. 2013. Overview of community-acquired pneumonia and the role of inflammatory mechanisms in the immunopathogenesis of severe pneumococcal disease. *Mediators of Inflammation*. 2013:490346.
- Steinberg, T. H. 2009. Protein gel staining methods: an introduction and overview. *Methods in Enzymology*. 463:541–563.
- Sugiyono. 2016. *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif Dan R&D*. Bandung: Alfabeta.
- Suharsono, H., M. Agus Hendrayana, I. Nyoman Mantik, dan S. Reto Prawiro. 2014. Confirmation of adherence protein hemagglutinin sub-unit pili with mw 49.6 kda *Helicobacter pylori* on mice gastric epithelial cell. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 9:59–66.
- Sumarno, Uun Yanuhar, Sri Winarsih, Samsul Islam, dan Sanarto Santoso. 2012. Detection of molecule adhesion sub-unit pili 48 kda salmonella typhi by




- immunochemistry method using sera patients suffering from typhoid fever. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*. 2(2):8527–8532.
- Suswati, E. dan D. C. Mufida. 2010. Protein haemagglutinin outer membran protein (omp) 35 kda sebagai protein adhesin proteus mirabilis pada vesika urinaria kelinci. 12(2):136–142.
- Tettelin, H., S. Chancey, T. Mitchell, D. Denapaite, Y. Schähle, M. Rieger, dan R. Hakenbeck. 2015. *Chapter 5 - Genomics, Genetic Variation, and Regions of Differences*. Dalam *Streptococcus Pneumoniae*. Editor J. Brown, S. Hammerschmidt, dan C. Orihuela. Amsterdam: Academic Press.
- Uchiyama, S., A. F. Carlin, A. Khosravi, S. Weiman, A. Banerjee, D. Quach, G. Hightower, T. J. Mitchell, K. S. Doran, dan V. Nizet. 2009. The surface-anchored nana protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion. *The Journal of Experimental Medicine*. 206(9):1845–1852.
- van der Poll, T. dan S. M. Opal. 2009. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet (London, England)*. 374(9700):1543–1556.
- Vila-Corcoles, A., O. Ochoa-Gondar, T. Rodriguez-Blanco, X. Raga-Luria, F. Gomez-Bertomeu, dan EPIVAC Study Group. 2009. Epidemiology of community-acquired pneumonia in older adults: a population-based study. *Respiratory Medicine*. 103(2):309–316.
- Weiser, J., D. Ferreira, dan J. Paton. 2018. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nature Reviews Microbiology*. 16:1.
- Wilson, R., J. M. Cohen, R. J. Jose, C. de Vogel, H. Baxendale, dan J. S. Brown. 2015. Protection against *Streptococcus pneumoniae* lung infection after nasopharyngeal colonization requires both humoral and cellular immune responses. *Mucosal Immunology*. 8(3):627–639.
- Woof, J. M. dan M. W. Russell. 2011. Structure and function relationships in iga. *Mucosal Immunology*. 4(6):590–597.
- Wu, H., C. Moser, H.-Z. Wang, N. Høiby, dan Z.-J. Song. 2015. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science*. 7(1):1–7.
- Wunderink, R. G. dan G. W. Waterer. 2014. Community-acquired pneumonia. *New England Journal of Medicine*. 370(6):543–551.
- Xu, Y., P.-W. Yuen, dan J. K.-W. Lam. 2014. Intranasal dna vaccine for protection against respiratory infectious diseases: the delivery perspectives. *Pharmaceutics*. 6(3):378–415.

- Yahiaoui, R. Y., C. D. den Heijer, E. M. van Bijnen, W. J. Paget, M. Pringle, H. Goossens, C. A. Bruggeman, F. G. Schellevis, E. E. Stobberingh, dan APRES Study Team. 2016. Prevalence and antibiotic resistance of commensal *Streptococcus pneumoniae* in nine european countries. *Future Microbiology*. 11:737–744.
- Yesilkaya, H., V. F. Andisi, P. W. Andrew, dan J. J. E. Bijlsma. 2013. *Streptococcus pneumoniae* and reactive oxygen species: an unusual approach to living with radicals. *Trends in Microbiology*. 21(4):187–195.
- Zafar, M. A., Y. Wang, S. Hamaguchi, dan J. N. Weiser. 2017. Host-to-host transmission of *Streptococcus pneumoniae* is driven by its inflammatory toxin, pneumolysin. *Cell Host & Microbe*. 21(1):73–83.
- Zhang, L., Z. Li, Z. Wan, A. Kilby, J. M. Kilby, dan W. Jiang. 2015. Humoral immune responses to streptococcus pneumoniae in the setting of hiv-1 infection. *Vaccine*. 33(36):4430–4436.

## LAMPIRAN

## Lampiran 3.1 Surat Tugas Penelitian



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
Jl Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121  
Email : fk@unej.ac.id Website : http://www.fk.unej.ac.id

---

**SURAT TUGAS**


Nomor : 1236 / UN25.1.11/PT/2018

Dalam rangka pelaksanaan penelitian Kelompok Riset Mikrobiologi yang dilaksanakan oleh Dosen dan mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember, sebagaimana tersebut di bawah ini:

No.	N a m a	NIP / NIM
1.	dr. Dini Agustina, M.Biomed	19830801 200812 2 003
2.	Danang Tejamukti W.	162010101030
3.	Niken Larasati	162010101037
4.	Nurul Indah Saffanah	162010101046
5.	Adellia Fira Fa'idha	162010101048
6.	Siti Marissa Aisyah	162010101052
7.	Rahma Perwitasari	162010101071
8.	Prisma Diandari	162010101093
9.	Yuna Annisa Salsabila	162010101095

Judul Penelitian : **Karakterisasi Protein Pili *Streptococcus pneumoniae* 67 kDa dan Potensinya sebagai Kandidat Vaksin**

Dengan ini menugaskan kepada dosen dan mahasiswa yang tercantum diatas untuk melaksanakan tugas penelitian tersebut secara penuh tanggung jawab.

Jember, 10 MAY 2019  
Dekan  
  
dr. Supangat, M.Kes., Ph.D., Sp.BA  
NIP. 19730424 199903 1 002

## Lampiran 3.2 Surat Persetujuan Etik Penelitian KERIS



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
 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 : 1.293 /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 :*

**KARAKTERISASI PROTEIN PILI *Streptococcus pneumoniae* 67 kDa DAN POTENSINYA SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN**

Nama Peneliti Utama : Dr. dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes.  
*Name of the principal investigator*

NIDN : 0018037204

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember  
*Name of institution*

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

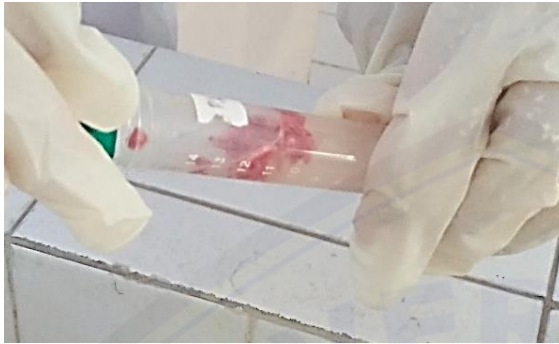
Jember, 20 Mei 2019

Ketua Komisi Etik Penelitian

  
 dr. Rini Riyanti, Sp.PK  




**Lampiran 4.1 Dokumentasi Hasil Penelitian**



**Pencucian Pneumosit  
Mencit dengan Cairan PBS**



**Sentrifuge pada Proses  
Pencucian Pneumosit**



**Proses Adhesi Bakteri**



**Titer Protein Pili  
Bakteri yang Berbeda**



**Waterbath pada Proses Adhesi Pili**



**Pewarnaan Preparat**



## Lampiran 4.2 Hasil Analisis Data

### 1. Hasil Uji Normalitas

#### *Tests of Normality*

	<i>Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup></i>			<i>Shapiro-Wilk</i>		
	<i>Statistic</i>	<i>df</i>	<i>Sig.</i>	<i>Statistic</i>	<i>df</i>	<i>Sig.</i>
Titer	.244	6	.200*	.854	6	.170
Indeks	.185	6	.200*	.899	6	.370

\*. *This is a lower bound of the true significance.*

a. *Lilliefors Significance Correction*

### 2. Hasil Uji Korelasi Pearson

#### *Correlations*

		Titer	Indeks
Titer	<i>Pearson Correlation</i>		-.919*
	<i>Sig. (2-tailed)</i>		.010
	N	6	6
Indeks	<i>Pearson Correlation</i>	-.919*	
	<i>Sig. (2-tailed)</i>	.010	
	N	6	6

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