



JURNAL

BIOTEKNOLOGI & BIOSAINS INDONESIA

Homepage Jurnal: <http://ejurnal.bppt.go.id/index.php/JBBI>



PERAN PROTEIN PILI 11 kDa *Streptococcus pneumoniae* SEBAGAI PROTEIN HEMAGLUTININ DAN ADHESIN

Role of Pili Protein 11 kDa of *Streptococcus pneumoniae* as Hemagglutinin and Adhesin Protein

PERAN PROTEIN PILI 11 kDa *Streptococcus pneumoniae* SEBAGAI PROTEIN HEMAGLUTININ DAN ADHESIN
 Diana Chusna MRE¹, Yuma Chutrisa Sabana², Binny Suswati¹, Bagus Hermansyah³, Dini Agustina¹

¹Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

²Program Studi Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

³Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

Jl. Kalimantan No.37, Kampus Tegal Boto, Kabupaten Jember, Jawa Timur, 68121, Indonesia

*Email: chusna.fk@unej.ac.id

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae has pili which play roles in adhesion, colonization of nasopharyngeal epithelial cells, and phagocytic inhibition of immune cells. This study aimed to determine the characteristics of the 11 kDa pili protein as hemagglutinin and adhesin, as well as their immune responses. The 11 kDa pili protein from *S. pneumoniae* was isolated by SDS-PAGE, purified by electroelution and dialysis. Hemagglutination and adhesion tests were carried out on the protein, and western blotting of the polyclonal antibody immune responses were evaluated. Hemagglutination test showed that the 11 kDa pili protein played a role in the hemagglutination process up to 2-time dilution. Adhesion test showed there was a correlation between the dose of the protein and the bacteria attached to the epithelial cells. The Pearson correlation test showed a *P* value of 0.010 and a correlation coefficient of $R = -0.919$. Quadratic regression test produced $R^2 = 0.974$. Western blotting test showed that 11 kDa pili protein polyclonal antibodies recognized 67 kDa and 11 kDa pili proteins. The study concluded that the 11 kDa *S. pneumoniae* pili protein acted as hemagglutinin and adhesin, and the polyclonal antibody protein responded to 67 pDa and 11 kDa BM pili proteins.

Keywords: adhesin, hemagglutinin, pili, protein 11 kDa, *Streptococcus pneumoniae*

ABSTRAK

Streptococcus pneumoniae memiliki pili yang berperan dalam adhesi, kolonisasi sel epitel nasofaring, serta sebagai inhibitor fagositosis sel imun. Penelitian ini bertujuan mengetahui karakteristik protein pili 11 kDa sebagai hemagglutinin dan adhesin serta respons imunnya. Protein pili 11 kDa dari bakteri *S. pneumoniae* diisolasi secara SDS-PAGE, dipurifikasi dengan elektroelusi dan dialisis. Uji hemaglutinasi dan adhesi dilakukan pada protein tersebut, serta dievaluasi respon imun poliklonal antibodinya secara *western blotting*. Uji hemaglutinasi menunjukkan protein pili 11 kDa berperan dalam proses hemaglutinasi hingga pengenceran 2 kali. Uji adhesi menunjukkan korelasi antara dosis protein dan bakteri yang menempel pada sel epitel. Uji korelasi *Pearson* menunjukkan *P* value 0,010 dan koefisien korelasi $R = -0,919$. Uji regresi *Quadratic* menghasilkan $R^2 = 0,974$. Uji *Western blotting* menunjukkan antibodi poliklonal protein pili 11 kDa mengenali protein pili 67 kDa dan 11 kDa. Penelitian ini berkesimpulan protein pili 11 kDa *S. pneumoniae* berperan sebagai hemagglutinin dan adhesin, serta antibodi poliklonal protein tersebut memberi respons terhadap protein pili BM 67 kDa dan 11 kDa.

Kata Kunci: adhesin, hemagglutinin, pili, protein 11 kDa, *Streptococcus pneumoniae*

PENDAHULUAN

Streptococcus pneumoniae termasuk 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 bakteremia. Bakteri ini menjadi penyebab tertinggi *Community-acquired pneumonia* (CAP) sebagai penyebab utama sepsis di seluruh dunia (Feldman dan Anderson 2016).

Streptococcus pneumoniae yang berkoloni pada permukaan mukosa nasofaring inang dapat bermigrasi ke paru-paru sehingga menyebabkan pneumonia *pneumococcal*. Infeksi ini mengakibatkan 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 (Henriques-Normark dan Tuomanen 2013). Walaupun kolonisasi *S. pneumoniae* asimtomatis di nasofaring, respons imun dan *clearance* yang rendah dapat menyebabkan risiko serius pneumonia *pneumococcal* pasien defisiensi imun atau *immunocompromised* (Wunderink dan Waterer 2014).

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 dengan kuat pada mukosa saluran napas, dan melakukan inisiasi faktor-faktor virulensi (Steel et al. 2013; Xu et al. 2014).

Penelitian faktor adhesin yang pernah dilakukan antara lain oleh Suharsono et al. (2014) bahwa protein pili 49,6 kDa *Helicobacter pylori* berperan sebagai hemagglutinin dan adhesin. Penelitian Mufida

et al. (2009) menyatakan bahwa protein OMP (*outer membrane protein*) 55 kDa bakteri *Salmonella typhi* isolat Jember sebagai protein hemagglutinin dan adhesin. Subunit protein pili 18 kDa, 23 kDa, 34 kDa, 53 kDa dan OMP 23 kDa dan 27 kDa pada bakteri *Shigella flexneri* penyebab shigellosis juga dilaporkan pada penelitian Fitrianiingsih et al. (2017). Penelitian Milliana et al. (2017) menemukan antibodi terhadap adhesi *S. flexneri* OMP 28 kDa. Protein haemagglutinin OMP 35 kDa juga berperan sebagai protein adhesin pada *Proteus mirabilis* (Suswati dan Mufida 2010). Pada penelitian Mufida et al. (2018) menyebutkan bahwa pili *S. pneumoniae* mempunyai protein dengan berat molekul 67 kDa, 54 kDa, 25 kDa, dan 11 kDa. Protein 54 kDa terbukti sebagai protein hemagglutinin dan bersifat imunogenik. Protein 11 kDa merupakan salah satu protein penyusun pili, tetapi belum diketahui fungsinya, sehingga perlu diteliti perannya dalam proses patogenesis infeksi *S. pneumoniae*.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hubungan antara titer protein pili 11 kDa bakteri *S. pneumoniae* dengan indeks adhesi dan potensi protein pili dalam peranannya sebagai protein adhesin dan hemagglutinin. Jika dari hasil penelitian dapat dibuktikan bahwa protein tersebut merupakan protein hemagglutinin yang juga berperan dalam proses adhesi, maka protein tersebut berpotensi menjadi kandidat vaksin.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Waktu penelitian selama 4 bulan, dari bulan Agustus sampai dengan bulan November 2019.

Bahan

Pada penelitian ini digunakan sampel kultur *S. pneumoniae* yang didapatkan dari Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Surabaya. Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap, tahap pertama yaitu identifikasi untuk konfirmasi spesies bakteri dan kultur untuk perbanyakan bakteri. Pada tahap ini dibutuhkan *Gram staining kit*, dan beberapa media seperti BAP, TCG dan BHI. Tahap kedua isolasi dan profiling protein pili dengan

elektroforesis (SDS PAGE) dengan bahan gel elektroforesis, *buffer running* dan marka protein. Tahap ketiga adalah uji hemaglutinasi, uji adhesi dan *Western blotting*. Pada tahap ketiga menggunakan mencit jantan strain BALB/C dengan umur 6-8 minggu. Mencit tersebut didapatkan dari Malang dan sebelum digunakan dilakukan aklimatisasi selama 7 hari. Penggunaan hewan coba pada penelitian ini mendapat persetujuan etik dari komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember dengan nomor 1.353/H25.1.11/KE/2019.

Kultur dan isolasi pili

Bakteri *S. pneumoniae* dikultur pada media bifasik BHI-TCG yang diperkaya dengan 5% darah domba. Setelah diinkubasi selama 2 x 24 bakteri dipanen dan ditampung pada tabung 100 mL, ditambah TCA sampai konsentrasi 3%, kemudian dikocok selama 30 menit, dibiarkan pada suhu kamar selama 1 jam, dan terakhir disentrifus pada suhu 4°C, 6.000 rpm selama 30 menit. Endapan bakteri sebanyak 3 g disuspensi dengan 6 mL PBS pH 7,4 kemudian diletakkan pada tabung pemotong pili. Pili dipotong dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C selama 30 detik. Sampel kemudian disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dan endapan diresuspensi dengan PBS pH 7,4 secukupnya, kemudian dilakukan kembali pemotongan pili. Proses ini diulang sebanyak 4 kali dan diperoleh supernatan yang mengandung protein pili serta endapan yang merupakan bagian sel bakteri (Sumarno et al. 2011; Sarkono et al. 2016).

Pemisahan protein pili secara SDS-PAGE

Berat molekul protein pili ditentukan melalui *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) menggunakan *separating gel* 12% dan *stacking gel* 4%. Sampel supernatan protein pili, sebelum dimasukkan ke dalam sumuran gel, ditambah dengan buffer yang mengandung 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% glycerol, dan 0,001% bromophenol blue dengan 5% (v/v) mercaptoethanol, kemudian dipanaskan selama 5 menit. Sebanyak 20 µL sampel protein pili dimasukkan ke dalam sumuran gel. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit, 125 Volt, pada suhu ruang dalam *buffer* elektroda pH 8,3. Selanjutnya

dilakukan pewarnaan gel menggunakan *coomassie brilliant blue* selama 30 menit, dan dilanjutkan *destaining* dengan larutan yang mengandung 20% metanol dan 10% asam asetat glasial (Sumarno et al. 2011; Jariyapan et al. 2012).

Purifikasi secara elektroelusi dan dialisis

Gel yang mengandung pita 11 kDa dipotong, dimasukkan ke dalam membran selulose dan ditambahkan *buffer* elektroda, selanjutnya dilakukan elektroforesis *apparatus horizontal* 125 Mv selama 120 menit. Hasil elektroelusi berupa larutan protein 11 kDa dalam *buffer* elektroda dilakukan didialisis dalam 2 L PBS pH 7,4 selama 2 x 24 jam pada suhu 4°C (Seelert dan Krause 2008).

Uji hemaglutinasi

Protein pili yang telah dipurifikasi berdasarkan berat molekul direaksikan dengan eritrosit mencit dan dilihat titer hemaglutinasinya. Eritrosit mencit sebelum digunakan dicuci 3 kali dengan PBS pH 7,4 kemudian dibuat suspensi 0,5% dengan larutan PBS. Setiap sumur mikrotiter dimasukkan 50 µL PBS. Sumur pertama ditambahkan 50 µL protein pili kemudian dibuat pengenceran serial ke dalam sumur berikutnya dengan memipet 50 µL suspensi protein pili dari sumur sebelumnya, sumur ke-9 sebagai kontrol hanya diisi larutan PBS tanpa protein pili. Masing-masing ditambahkan 50 µL suspensi eritrosit, kemudian digoyangkan 15 menit. Hasil hemaglutinin dibaca jika terlihat dot (Li et al. 1999).

Uji adhesi

Bakteri *S. pneumoniae* dibiakkan dalam *blood agar plates* (BAP) pada suhu 37°C kemudian dipanen dengan mengerok bakteri dan dibuat menjadi larutan bakteri dengan menambah larutan PBS, kemudian dilakukan penentuan konsentrasi bakteri 10⁸ mL⁻¹ menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Suspensi bakteri sebanyak 400 µL ditambahkan pada masing-masing dosis pili. Sebelumnya protein pili 11 kDa diencerkan dengan larutan PBS sehingga dosis protein pili menjadi 50 µg, 25 µg, 12,5 µg, 6,25 µg dan 3,125 µg. Kontrol negatif yang tidak terdapat protein pili juga diberikan perlakuan bakteri. Selanjutnya

suspensi pneumosit sebanyak 400 μL ditambahkan pada masing-masing dosis protein pili yang telah ditambahkan suspensi bakteri, termasuk kontrol negatif yang tidak terdapat protein pili, dan dihomogenkan. Kemudian homogenat digoyangkan perlahan menggunakan *shaking waterbath* pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah itu dilakukan sentrifugasi selama 5 menit, dengan kecepatan 1.000 rpm. Selanjutnya supernatan dibuang dan endapan diresuspensi dengan PBS 100 μL , dilakukan sentrifugasi selama 5 menit, dengan kecepatan 1.000 rpm. Setelah dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali, endapan diresuspensi dengan 50 μL , masing-masing suspensi diambil sebanyak 10 μL untuk dibuat preparat, selanjutnya dilakukan pewarnaan Gram (Nagayama et al. 1995; Milliana et al. 2017).

Produksi poliklonal antibodi

Produksi poliklonal antibodi dilakukan dengan menggunakan hewan coba mencit BALB/C. Protein hemagglutinin pili 11 kDa *S. pneumoniae* sebagai antigen diinjeksikan pada mencit secara intraperitoneal dengan dosis 50 μg ditambahkan *freund adjuvant complete* dengan volume yang sama dengan antigen. Satu minggu kemudian dilakukan imunisasi booster (imunisasi kedua dan ketiga) menggunakan *freund adjuvant incomplete* dengan dosis yang sama dengan antigen. Satu minggu setelah imunisasi terakhir mencit diterminasi dan diisolasi antibodinya dari serum (Eivazi et al. 2015).

Western Blotting

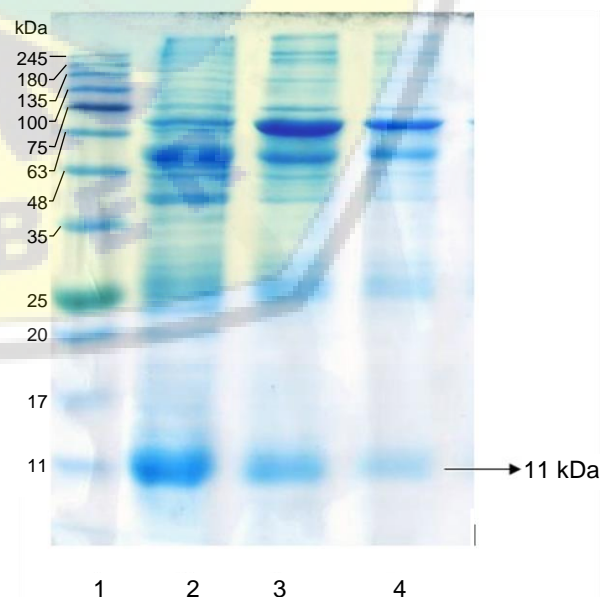
Protein pada gel hasil elektroforesis SDS-PAGE ditransfer ke dalam membran *Polyvinylidene difluoride* (PVDF) dengan menggunakan alat *semi dry blotter* (Biorad). Pita protein dipindahkan pada PVDF dengan cara mengalirkan aliran listrik sebesar 100 mA pada kurun waktu 120 menit. Setelah pemindahan selesai, dilakukan pengecatan menggunakan pewarna ponco 2% yang mengandung TCA konsentrasi 30% untuk mengetahui protein sampel telah pindah pada PVDF. Setelah itu PVDF dicuci dengan TBS 3 kali, kemudian diblok dengan skim milk 5% dalam TBS-T dan diinkubasi 2 jam pada suhu ruang di atas shaker. Selanjutnya PVDF dicuci dengan TBST 3 kali selama 5 menit dan ditambahkan antibodi primer dalam

blocking buffer perbandingan 1:20. PVDF diinkubasi semalam pada suhu 4°C, selanjutnya membran dicuci dengan TBST 3 kali dan diinkubasi dengan antibodi sekunder 1:2.000, selama 2 jam pada suhu ruang. Membran dicuci dengan TBST 3 kali dan ditetesi dengan NBT-BCIP, kemudian diinkubasi 40 menit dalam wadah gelap. Reaksi dihentikan dengan akuades dan membran dikeringkan (Mahmood dan Yang 2012).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa pili tersusun oleh protein dengan berat molekul 67 kDa, 54 kDa, 25 kDa, dan 11 kDa (Gambar 1). Protein pili hasil purifikasi secara elektroelusi dan dialisis dilakukan uji hemagglutinasi menggunakan erosit mencit. Hasil uji hemagglutinasi menunjukkan protein pili menghambat aglutinasi eritrosit sampai pengenceran 2 kali (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa protein pili 11 kDa bakteri *S. pneumoniae* dapat berperan sebagai protein hemagglutinin.

Uji adhesi dilakukan setelah uji hemagglutinasi untuk melihat potensi protein pili dalam mempengaruhi proses adhesi bakteri *S. pneumoniae* ke sel pneumosit. Konsentrasi protein pili yang digunakan dalam uji adhesi yaitu 0 (kelompok kontrol), 3,125 μg , 6,25 μg , 12,5 μg , 25 μg , dan 50 μg .

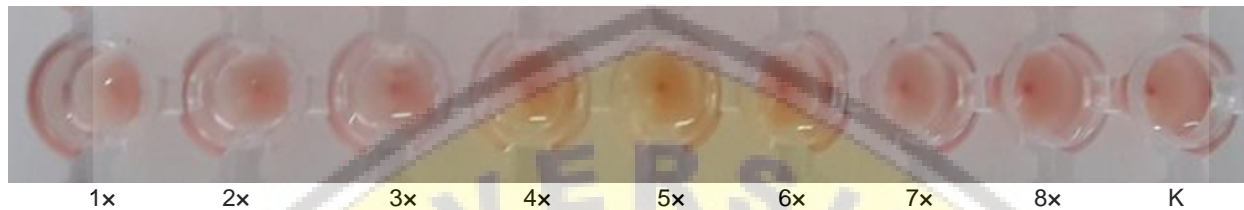


Gambar 1. Hasil elektroforesis pili *S. pneumoniae*: (1) marker, (2) whole cell, (3) pili-1, dan (4) pili-2

Tabel 1. Indeks adhesi *S. pneumoniae* pada sel pneumosit mencit

Sampel	Dosis Protein Pili					
	50 μ L	25 μ L	12,5 μ L	6,25 μ L	3,125 μ L	0 μ L
I	335	304	419	470	620	549
II	235	285	408	446	534	521
III	271	341	471	450	565	577
Rata-rata	280	310	433	455	540	549

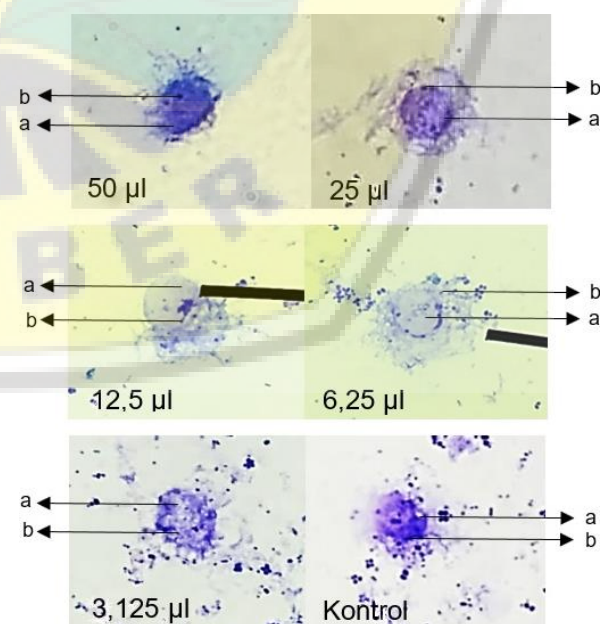
Keterangan: Pengujian dilakukan dengan 3 ulangan yaitu I, II dan III

**Gambar 2.** Hasil uji hemaglutinin protein pili bakteri *S. pneumoniae*

Hasil uji adhesi menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol terlihat lebih banyak bakteri yang menempel pada sel pneumosit. Konsentrasi protein pili *S. pneumoniae* yang semakin tinggi menyebabkan semakin sedikit bakteri *S. pneumoniae* yang menempel pada pneumosit. Hal ini karena reseptor pneumosit telah dijenuhi oleh protein pili sehingga bakteri tidak bisa menempel (Gambar 3 dan Tabel 1). Hasil uji korelasi *Pearson* menunjukkan adanya hubungan signifikan antara titer protein pili dan indeks adhesi dengan koefisien korelasi $R = -0,919$ ($p < 0,05$), membuktikan bahwa protein pili dan indeks adhesi memiliki hubungan yang kuat dengan arah yang berlawanan. Uji regresi didapatkan $R^2 = 0,974$ (Gambar 4), sehingga dapat disimpulkan terdapat 2,6% faktor lain yang mempengaruhi indeks adhesi. Contoh faktor lain yang berpengaruh dalam adhesi *S. pneumoniae* ialah suhu dan pH. Suhu optimal adhesi *S. pneumoniae* ialah 34°C pada kolonisasi pernapasan bagian atas, namun pada suhu rendah menyebabkan adhesi bakteri mengalami penurunan yang signifikan (Chao et al. 2015). Kemasaman terendah yang berpengaruh terhadap jumlah adhesi *S. pneumoniae* ke sel epitel ialah pH 2,5 dengan rentang waktu selama 5 menit.

Hasil uji hemaglutinasi dan adhesi menunjukkan bahwa protein pili 11 kDa merupakan protein hemagglutinin dan adhesin. Protein pili yang mempunyai sifat hemagglutinin berperan dalam proses adhesi ke sel *hospes*. Hasil penelitian ini didukung

oleh beberapa penelitian lain, diantaranya penelitian pada bakteri *Shigella* menunjukkan bahwa kemampuan kolonisasi bakteri berhubungan dengan kemampuan hemaglutinasi. Semakin tinggi kemampuan hemaglutinasi semakin tinggi pula kemampuan melakukan kolonisasi (Mitra et al. 2012). Kolonisasi didahului oleh adanya adhesi, sehingga dapat disimpulkan bahwa protein hemagglutinin berperan dalam proses adhesi. Penelitian Connolly et al. (2017) menunjukkan bahwa bakteri *Porphyromonas*

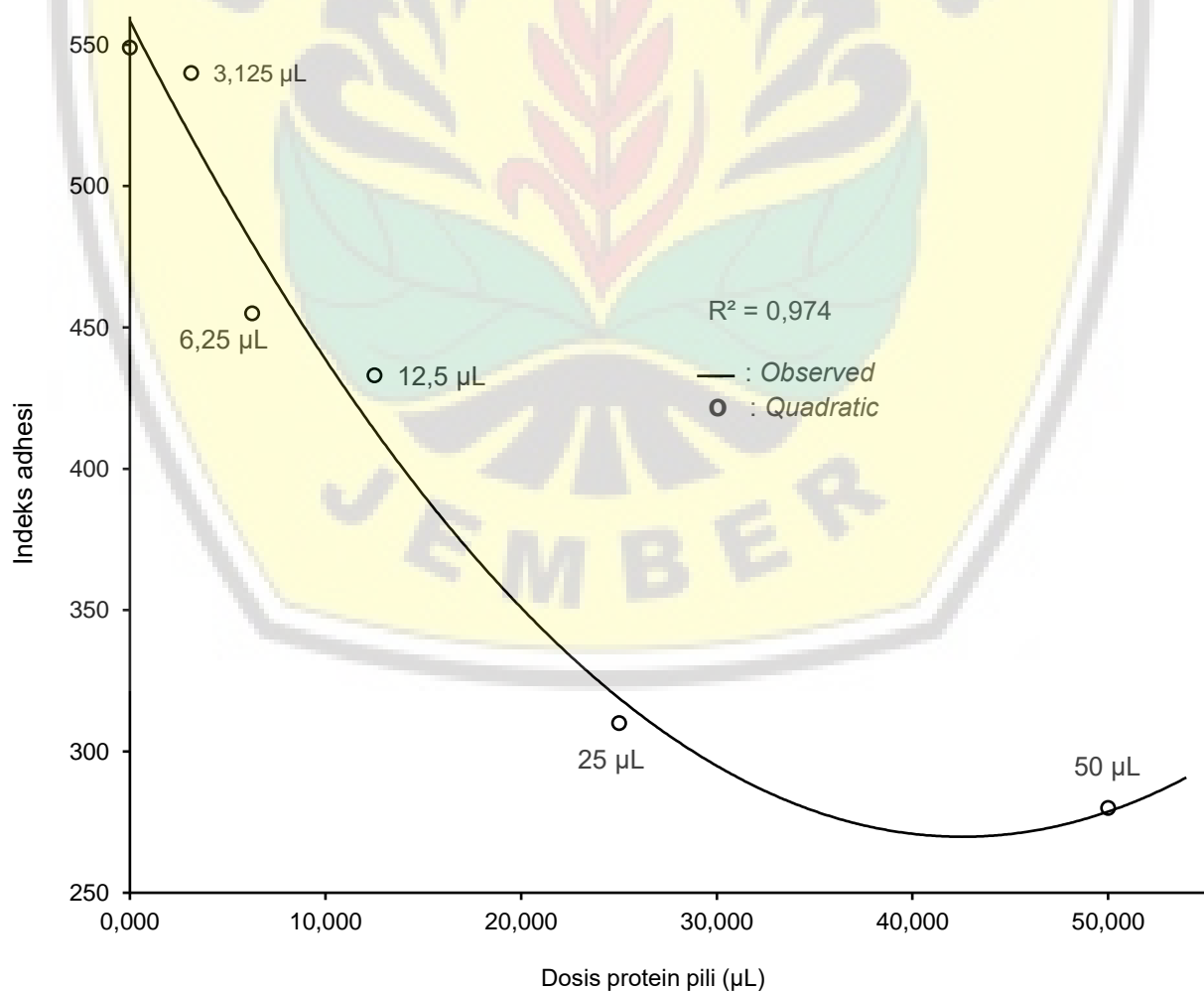
**Gambar 3.** Hasil uji adhesi protein pili 11 kDa *S. pneumoniae* dengan berbagai konsentrasi atau dosis protein pili: (a) pneumosit, (b) bakteri *S. pneumoniae*

gingivalis mempunyai protein hemagglutinin pili yang berperan pada adhesi ke sel epitel mulut, kolonisasi dan pembentukan biofilm. Pada bakteri gram positif, yaitu *Staphylococcus saprophyticus* memiliki protein hemagglutinin yang berperan dalam proses adhesi dengan cara mengikat fibronektin ureter manusia telah dibuktikan secara *in vitro*, serta mempunyai peran pada kolonisasi di ginjal tikus secara *in vivo*, sehingga protein tersebut disebut sebagai protein adhesin (Kline dan Lewis 2016). Penelitian Suharsono et al. (2014) menyimpulkan bahwa subunit pili 49,6 kDa *H. pylori* berperan sebagai protein adhesin dan hemagglutinin. Bakteri *S. typhi* pada penelitian Sumarno et al. (2012) dengan protein pili berat molekul 48 kDa juga berperan sebagai protein adhesin pada sel enterosit.

Protein adhesin merupakan salah satu komponen bakteri yang berfungsi melekatkan sel patogen dengan sel inang. Protein adhesin terdiri atas OMP dan pili atau fimbria.

Bakteri gram positif seperti *S. pneumoniae* memiliki pili atau fimbria dan protein permukaan sebagai protein adhesin. Setelah bakteri melakukan penempelan, sebagian kapsul polisakarida dilepaskan di tempat adhesi untuk akses bakteri ke mukosa. Hal ini memfasilitasi paparan molekul *adhesive* pada dinding sel atau membran sitoplasma. Reseptor pneumosit yang menjadi target adhesi bakteri *S. pneumoniae* ialah struktur glikoprotein (Binsker et al. 2015). Pneumosit tipe 2 dapat mensintesis dan mensekresi komplemen C3, menyediakan target adhesi *S. pneumoniae* ke sel inang melalui *choline binding protein A* (CbpA).

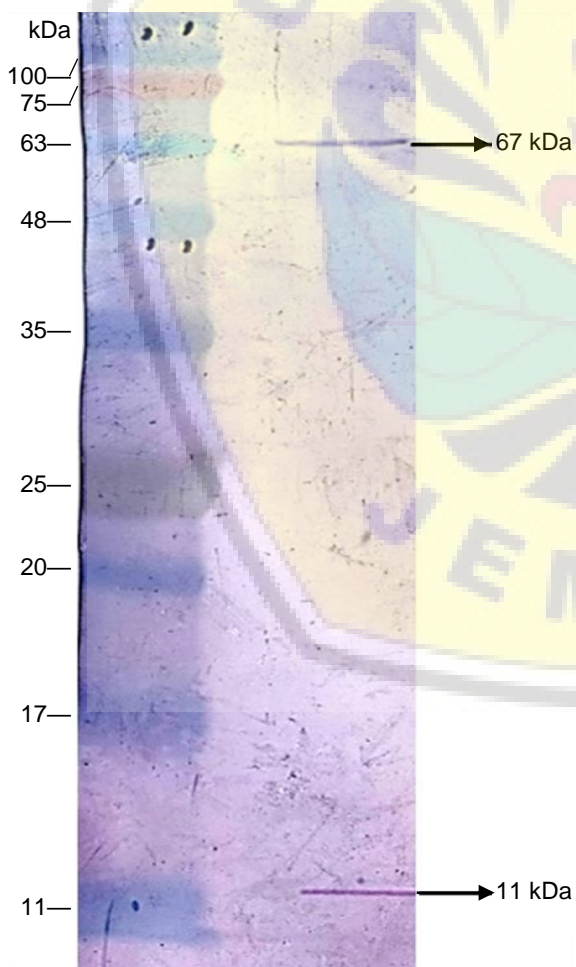
Uji *Western blotting* menggunakan antibodi poliklonal protein pili 11 kDa menunjukkan bahwa antibodi tersebut memberi respons terhadap protein pili berat molekul 67 dan 11 kDa (Gambar 5). Hasil *Western blotting* yang mereaksikan antibodi IgG anti-protein pili *S. pneumoniae* 11 kDa dari serum mencit yang diimunisasi protein pili 11



Gambar 4. Grafik analisis data regresi *quadratic*

kDa, sebagai antigen. Antibodi IgG yang diproduksi dari mencit yang diimunisasi tersebut dapat mengenali antigen protein pili 11 kDa. Protein hemagglutinin bakteri lain yang menunjukkan sifat imunogenik yaitu protein hemagglutinin fimbrial *B. pertussis*. Sifat ini ditunjukkan pada individu yang diimunisasi dengan vaksin DPT yang mengandung protein hemagglutinin fimbrial *B. pertussis* menghasilkan antibodi yang tinggi terhadap protein hemagglutinin tersebut (Hara et al. 2013).

Penelitian Fitrianiingsih et al. (2017) menyatakan bahwa subunit protein pili *S. flexneri* berat molekul 18, 23, 34, 49, dan 53 kDa berespon terhadap antibodi subunit protein pili 18 kDa *S. flexneri*, serta bersifat sebagai protein hemagglutinin dan adhesin. OMP 28 kDa bakteri *S. flexneri* sebagai protein adhesin dan hemagglutinin, antibodi OMP 28 kDa *S. flexneri* yang diencerkan 1/400 bereaksi dengan OMP *Shigella* pada *Western blotting* (Milliana et al. 2017). Bakteri



Gambar 5. Hasil *Western blotting* pili bakteri *S. pneumoniae* terhadap antibodi poliklonal protein 11 kDa

K. pneumoniae memiliki pili sebagai protein hemagglutinin dengan berat molekul 12,8 kDa, juga berespon terhadap antibodi *Western* (Agustina 2017).

Beberapa karakteristik penentu yang dapat mempengaruhi dan meningkatkan suatu zat dapat bersifat imunogenik antara lain: *foreignness* (benda asing), ukuran molekul, struktur kimia, dan kompleksitas kimia. Benda asing dapat berupa produk mikroba dan molekul eksogen. Pada umumnya benda asing bersifat imunogenik kuat. Pada ukuran molekul, protein makromolekul merupakan imunogen yang potensial, sedangkan molekul yang lebih kecil dari 10 kDa memiliki sifat imunogenik lemah kecuali apabila digabungkan menjadi protein karier imunogenik. Struktur kimia dari protein dan polisakarida memiliki sifat imunogenik yang kuat, walaupun rantai polipeptida kecil, asam nukleat, dan lemak dapat berpotensi imunogenik. Kompleksitas kimia dan antigenitas memiliki hubungan langsung, protein polimer atau agregasi memiliki sifat imunogenik yang lebih kuat daripada protein monomer terlarut (Andre Greiciely et al. 2017).

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan hasil penelitian ialah protein pili 11 kDa *S. pneumoniae* berperan sebagai protein hemagglutinin dan adhesin. Antibodi poliklonal protein pili 11 kDa memberi respons terhadap protein pili berat molekul 67 kDa dan 11 kDa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Universitas Jember melalui Hibah Keris dengan SPK No. 1334/UN25.3.1/LT 20/9 tanggal 3 Mei 2019 serta dr Cholis Abrori, M.Kes, M.Ped atas saran pengolahan data statistik dan mb Lilis Lestari selaku teknisi Laboratorium Mikrobiologi FK Unej.

DAFTAR PUSTAKA

Agustina D (2017) Deteksi imunoglobulin G dengan *immunoblotting* pasca imunisasi subkutan protein hemagglutinin pili *Klebsiella pneumoniae* 12,8 kDa pada mencit BALB/C. *J Agromed Med Sci* 3:40–46. doi:

- 10.19184/ams.v3i2.5069
 Andre GO, Converso TR, Politano WR, Ferraz LC, Ribeiro ML, Leite LC, Darrieux M (2017) Role of *Streptococcus pneumoniae* proteins in evasion of complement-mediated immunity. *Front Microbiol* 8:224. doi: 10.3389/fmicb.2017.00224
- Binsker U, Kohler TP, Krauel K, Kohler S, Schwertz H, Hammerschmidt S (2015) *Pneumococcal adhesins* PavB and PspC are important for the interplay with human thrombospondin-1. *J Biol Chem* 290:14542–14555. doi: 10.1074/jbc.M114.623876
- Chao Y, Marks LR, Pettigrew MM, Hakansson AP (2015) *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol* 4:194. doi: 10.3389/fcimb.2014.00194
- Connolly E, Millhouse E, Doyle R, Culshaw S, Ramage G, Moran GP (2017) The *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinins HagB and HagC are major mediators of adhesion and biofilm formation. *Mol Oral Microbiol* 32:35–47. doi: 10.1111/omi.12151
- Eivazi S, Majidi J, Maleki LA, Abdolalizadeh J, Yousefi M, Ahmadi M, Dadashi S, Moradi Z, Zolali E (2015) Production and purification of a polyclonal antibody against purified mouse IgG2b in rabbits towards designing mouse monoclonal isotyping kits. *Adv Pharm Bull* 5:109–113. doi: 10.5681/apb.2015.015
- Feldman C, Anderson R (2016) The role of *Streptococcus pneumoniae* in community-acquired pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med* 37:806–818. doi: 10.1055/s-0036-1592074
- Fitrianingsih AA, Rachma LN, Milliana A, Hernowati TE, Aulanni'am A, Santoso S, Prawiro SR (2017) Cross reaction among antibody pili subunit hemagglutinin proteins and outer membrane sub unit hemagglutinin proteins of *Shigella flexneri*. *J Trop Life Sci* 7:1–7. doi: 10.11594/jtls.07.01.01
- Hara M, Okada K, Yamaguchi Y, Uno S, Otsuka Y, Shimanoe C, Nanri H, Horita M, Ozaki I, Nishida Y, Tanaka K (2013) Immunogenicity and safety after booster vaccination of diphtheria, tetanus, and acellular pertussis in young adults: An open randomized controlled trial in Japan. *Clin Vaccine Immunol* 20:1799–1804. doi: 10.1128/CVI.00490-13
- Henriques-Normark B, Tuomanen EI (2013) The pneumococcus: Epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a010215. doi: 10.1101/cshperspect.a010215
- Jariyapan N, Roytrakul S, Paemane A, Junkum A, Saeung A, Thongsahuan S, Sor-Suwan S, Pattanawiboon B, Poovorawan Y, Choochote W (2012) Proteomic analysis of salivary glands of female *Anopheles barbirostris* species A2 (diptera: Culicidae) by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Parasitol Res* 111:1239–1249. doi: 10.1007/s00436-012-2958-y
- Kline KA, Lewis AL (2016) Gram-positive uropathogens, polymicrobial urinary tract infection, and the emerging microbiota of the urinary tract. *Microbiol Spectr* 4:UTI-0012-2012. doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0012-2012
- Li X, Johnson DE, Mobley HLT (1999) Requirement of MrpH for mannose-resistant *Proteus*-like fimbriae-mediated hemagglutination by *Proteus mirabilis*. *Infect Immun* 67:2822–2833
- Mahmood T, Yang PC (2012) Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 4:429–434. doi: 10.4103/1947-2714.100998
- Milliana A, Noorhamdani AS, Poeranto S, Handono K, Prawiro SR, Fitrianingsih AA, Rachma LN (2017) Antibodies against *Shigella flexneri* adhesion molecule outer membrane protein (OMP) can cross-react with OMPs of some *Shigella* species. *Trop J Pharm Res* 16:255–261. doi: 10.4314/tjpr.v16i2.2
- Mitra S, Saha DR, Pal A, Niyogi SK, Mitra U, Koley H (2012) Hemagglutinating activity is directly correlated with colonization ability of *Shigellae* in suckling mouse model. *Can J Microbiol* 58:1159–1166. doi: 10.1139/w2012-095
- Mufida DC, Bumi C., Fatmawati H (2009) Peran protein membran luar 55 KDa *Salmonella typhi* isolat Jember sebagai protein hemagglutinin dan adhesin. *Berk Penel Hayati* 15:11–16. doi: 10.23869/bphjbr.15.1.20093

- Mufida DC, Handono K, Prawiro SR, Santoso S (2018) Identification of hemagglutinin protein from *Streptococcus pneumoniae* pili as a vaccine candidate by proteomic analysis. *Turk J Immunol* 6:8–15. doi: 10.25002/tji.2018.698
- Nagayama K, Oguchi T, Arita M, Honda T (1995) Purification and characterization of a cell-associated hemagglutinin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 63:1987–1992.
- Sarkono S, Moeljopawiro S, Setiaji B, Sembiring L (2016) Analysis of whole cell protein profiles by SDS-PAGE to identify indigenous cellulose-producer acetic acid bacteria. *Indones J Biotechnol* 21:86–92. doi: 10.22146/ijbiotech.27166
- Seelert H, Krause F (2008) Preparative isolation of protein complexes and other bioparticles by elution from polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 29:2617–2636. doi: 10.1002/elps.200800061
- Steel HC, Cockeran R, Anderson R, Feldman C (2013) Overview of community-acquired pneumonia and the role of inflammatory mechanisms in the immunopathogenesis of severe pneumococcal disease. *Mediators Inflamm* 2013:490346. doi: 10.1155/2013/490346
- Suharsono H, Hendrayana MA, Mantik IN, Prawiro SR (2014) Confirmation of adherence protein hemagglutinin sub-unit pili with MW 49.6 kDa *Helicobacter pylori* on mice gastric epithelial cell. *IOSR J Pharm Biol Sci* 9:59–66. doi: 10.9790/3008-09275966
- Sumarno RP, Susanto A, Ismanoe G, Wienarsih S (2011) Combinations of protein sub-unit pili 37.8 kDa *V. cholerae* with cholera toxin sub-unit B, *V. cholerae* can protect some out of the solution in the intestinal mice. *J Pharm Biomed Sci* 1:154–160
- Sumarno RP, Yanuhar U, Winarsih S, Islam S, Santoso S (2012) Detection of molecule adhesion sub-unit pili 48 kDa *Salmonella typhi* by immunochemistry method using sera patients suffering from typhoid fever. *J Basic Appl Sci Res* 2:8527–8532
- Suswati E, Mufida DC (2010) Protein haemagglutinin outer membran protein (OMP) 35 kDa sebagai protein adhesin *Proteus mirabilis* pada vesika urinaria kelinci. *J Natur Indones* 12:136–142. doi: 10.31258/jnat.12.2.136-142
- Wunderink RG, Waterer GW (2014) Clinical Practice. Community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 370:543–551. doi: 10.1056/NEJMcp1214869
- Xu Y, Yuen PW, Lam JK (2014) Intranasal DNA vaccine for protection against respiratory infectious diseases: The delivery perspectives. *Pharmaceutics* 6: 378–415. doi: 10.3390/pharmaceutics6030378