



PERAN PROTEIN HEMAGLUTININ PILI
Streptococcus pneumoniae 54 kDa
SEBAGAI ADHESIN

SKRIPSI

Oleh

Adellia Fira Fa'idha
NIM 162010101048

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019



PERAN PROTEIN HEMAGLUTININ PILI
Streptococcus pneumoniae 54 kDa
SEBAGAI 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

Adellia Fira Fa'idha
NIM 162010101048

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, Tuhan satu-satunya yang saya miliki. Dzat yang maha mulia yang tidak pernah dzalim terhadap hambaNya dan Dzat yang Maha benar. Tuhan yang menjamin rezeki setiap hambaNya yang selalu ada, menyayangi dan menjaga saya. Dzat yang sangat saya cintai satu-satunya tempat saya berharap dan bersimpuh;
2. Nabi Muhammad SAW, seorang rasul yang sangat saya kagumi baik sifat dan perangnya. Seseorang yang selalu menjadi panutan saya untuk bertindak dan berperilaku;
3. Ibunda Siti Rofi'atun dan ayahanda Sugeng Wahono yang tulus menyayangi dan mencintai saya serta adik saya Viestani dan Carissa Azzahrine Maheswari yang saya sayangi, semoga selalu dalam lindungan Allah SWT;
4. Seluruh guru dan dosen yang telah sabar mendidik saya sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTO

Wahai orang-orang yang beriman! Mohonlah pertolongan (kepada Allah) dengan sabar dan shalat. Sungguh, Allah beserta orang-orang yang sabar.

(terjemahan Surat *Al-Baqarah* ayat 153)*



*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2010. *Mushaf al-Azhar: Al-Qur'an dan Terjemah*. Bandung: Jabal.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Adellia Fira Fa'idha

NIM : 162010101048

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Peran Protein Hemaglutin Pili *S. pneumoniae* 54 kDa sebagai 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 mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 7 Januari 2020

Yang menyatakan,

Adellia Fira Fa'idha

NIM 162010101048

SKRIPSI

**PERAN PROTEIN HEMAGLUTININ PILI
Streptococcus pneumoniae 54 kDa
SEBAGAI ADHESIN**

Oleh

Adellia Fira Fa'idha
NIM 162010101048

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Zahrah Febianti, M.Biomed

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Peran Protein Hemaglutin Pili *S. pneumoniae* 54 kDa sebagai Adhesin” karya Adellia Fira Fa’idha telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I

dr. Hairrudin, M. Kes
NIP 197510112003121008

dr.Heni Fatmawati, M. Kes, Sp. Rad
NIP 197602122005012001

Anggota II

Anggota III

Dr. dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes
NIP 197203182003121001

dr. Zahrah Febianti, M.Biomed
NIP 198802022014042001

Mengesahkan

Dekan,

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

RINGKASAN

Peran Protein Hemagglutinin Pili 54 kDa *Streptococcus pneumoniae* sebagai Adhesin; Adellia Fira Fa'idha, 162010101048; 2019; 58 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Streptococcus pneumoniae merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat berpasangan (diplococcus). Keberadaan *S. pneumoniae* selain berpotensi menyebabkan patogen, juga sebagai flora normal yang menghuni saluran pernapasan manusia khususnya nasofaring yang terdapat pada anak-anak dan orang dewasa sehat. Keberadaannya dapat dianggap sebagai faktor risiko untuk berkembangnya penyakit saluran pernapasan dan sebagai sumber penularan ke orang lain. Faktor yang menyebabkan *S. pneumoniae* dapat menginfeksi tubuh perlu diketahui untuk dijadikan dasar menentukan diagnosis dan pencegahan infeksi. Pili menjadi faktor yang sangat berpengaruh terhadap kemampuan *S. pneumoniae* untuk masuk ke dalam tubuh manusia. Hal ini disebabkan oleh adanya protein adhesin pada pili yang akan berikatan dengan reseptor permukaan. Hasil elektroforesis (SDS-PAGE) penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa protein dengan berat molekul 54 kDa merupakan protein hemagglutinin. Penelitian yang membuktikan bahwa protein dengan berat molekul 54 kDa sebagai protein adhesin belum ada yang melaporkan. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui peran protein hemagglutinin pili *S. pneumoniae* 54 kDa sebagai protein adhesin.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada bulan Oktober-November 2019. Sampel penelitian berupa bakteri *S. pneumoniae* dan sel paru mencit. Bakteri *S. pneumoniae* yang telah dikultur kemudian dilakukan pemotongan pili. Hasil potongan pili kemudian dielektroforesis (SDS-PAGE) dan diidentifikasi berat molekul proteinnya. Protein yang diperoleh kemudian diuji adhesi untuk mengetahui perannya sebagai protein adhesin. Data konsentrasi bertingkat protein pili 54 kDa *S. pneumoniae* dengan indeks adhesi dianalisis secara korelasi regresi untuk mengetahui hubungan diantara kedua variabel tersebut. Hasil uji korelasi Pearson antara konsentrasi protein pili 54 kDa *S. pneumoniae* dengan indeks adhesi diperoleh nilai *p-value* 0,036 ($p < 0,05$) yang bermakna bahwa kedua variabel memiliki hubungan yang signifikan, dengan koefisien korelasi $R = -0,840$ yang berarti kekuatan hubungan kedua variabel sangat kuat dengan arah hubungan negatif. Hal ini menunjukkan bahwa semakin rendah konsentrasi protein pili 54 kDa *S. pneumoniae* yang diberikan maka jumlah bakteri yang melakukan adhesi pada sel paru akan semakin banyak. Analisis data diatas dapat disimpulkan bahwa protein hemagglutinin pili 54 kDa *S. pneumoniae* merupakan protein adhesin.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah Subhanahu wa Ta'ala, karena atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Peran Pili 54 kDa bakteri *S.pneumoniae* sebagai Protein Hemaglutinin dan Adhesin”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat 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 menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Supangat, M.Kes, Ph.D, Sp.BA selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah memberikan doa' dan dukungan dalam penulisan skripsi ini;
2. dr. Cicih Komariah Sp.M selaku dosen pembimbing akademik yang senantiasa memberikan motivasi dan bimbingan selama saya menjadi mahasiswa;
3. Dr. dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes selaku dosen pembimbing utama dan dr. Zahra, M.Biomed selaku dosen pembimbing anggota yang telah memberikan bimbingan dan saran, serta telah meluangkan waktu untuk membimbing saya selama penulisan skripsi ini;
4. dr. Hairrudin, M.Kes selaku dosen penguji I dan dr. Heni Fatmawati, M. Kes, Sp. Rad selaku dosen penguji II yang telah memberikan saran dan masukan sehingga naskah skripsi ini dapat terselesaikan;
5. dr. Dini Agustina, M.Biomed selaku koordinator Kelompok Riset yang telah membimbing dan mengajak saya untuk bergabung dalam pelaksanaan Keris ini, serta telah memberikan bimbingan dalam pengerjaan skripsi ini;
6. Kedua orang tua saya Sugeng Wahono dan Siti Rofi'atun yang sangat saya cintai beserta adik-adik saya Viestania dan Carissa Azzahrine Maheswari yang telah memberikan do'a dan dukungan terbaik sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik;
7. dr. Suryo yang telah memberikan semangat dalam penulisan skripsi ini;

8. Pak Agus yang selalu mendoakan dan memberikan semangat dalam penulisan skripsi ini;
9. Analis Laboratorium Mikrobiologi Mbak Lilis Lestari, A.Md yang telah mendampingi saya dan teman-teman selama pengerjaan skripsi ini;
10. Mas Anton yang telah meluangkan waktu untuk membantu administrasi seminar proposal sampai sidang;
11. Guru-guru saya di jenjang TK, SD, SMP, dan SMA, serta dosen-dosen saya di Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah memberikan pendidikan ilmu terbaiknya selama ini;
12. Rekan-rekan sejawat Ligamen, mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember angkatan 2016;
13. Teman baik saya, Vito, Tang, Dan, Led, Wig, Oby, Kikik, dan Mpis yang selalu memberikan dukungan dan motivasi selama menempuh pendidikan;
14. Teman-teman KKN 111 desa Patemon Kecamatan Tlogosari, Hakim, Nuri, Feby, Arnas, Mas Dendik, Ismi, Fanny, Dinda, dan Nidya yang telah mendukung dan menyemangati saya untuk mengerjakan skripsi dan lulus tepat waktu;
15. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terimakasih atas segala bantuan dan kerjasamanya.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 7 Januari 2020

Penulis

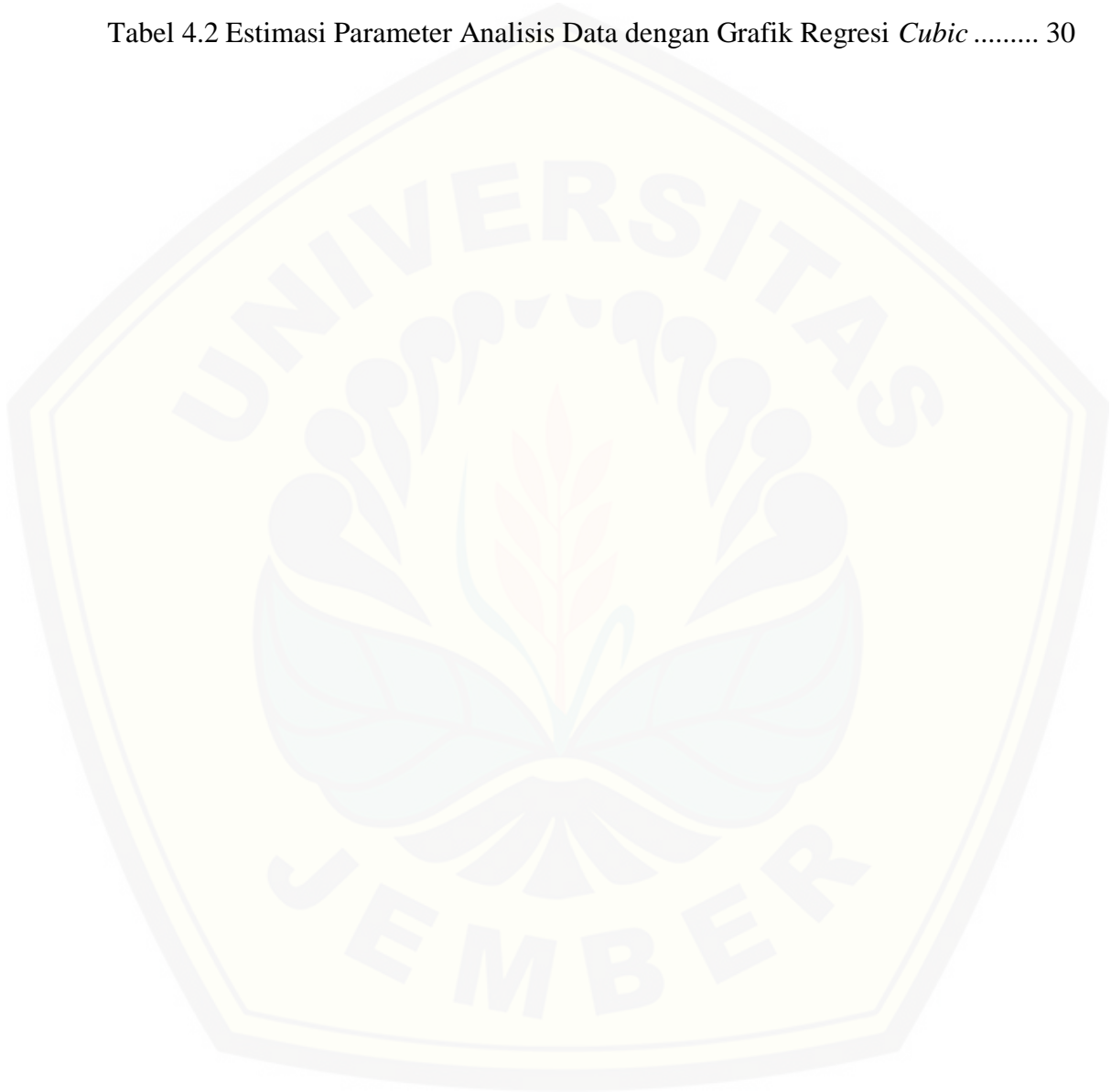
DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 <i>Streptococcus Pneumoniae</i>	4
2.1.1 Morfologi dan taksonomi.....	4
2.1.2 Epidemiologi dan Transmisi	5
2.2 Faktor Virulensi.....	6
2.2.1 Pili.....	7
2.2.2 Polisakarida kapsul	10
2.2.3 Protein permukaan	11
2.2.4 Toksin pneumolysin (PLY)	12
2.3 Protein Adhesin.....	12
2.3.1 Fimbrial Adhesi	13
2.3.2 Afimbrial Adhesi	13
2.4 Mekanisme Molekuler Adhesi Pili <i>S. pneumoniae</i> pada Sel Inang	14
.....	14
2.5 Patogenesis infeksi <i>Streptococcus pneumoniae</i>	15
2.6 Kerangka Konsep Penelitian	17
2.7 Hipotesis.....	18
BAB 3. METODE PENELITIAN	19
3.1 Jenis Penelitian.....	19
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	19
3.3 Variabel Penelitian	19
3.4 Definisi Operasional	20
3.5 Instrumen Penelitian	20
3.5.1 Alat penelitian	20

3.5.2Bahan penelitian	20
3.6 Prosedur Penelitian.....	21
3.6.1 Uji Kelayakan Etik.....	21
3.6.2 Kultur bakteri <i>S. Pneumoniae</i>	21
3.6.3 Isolasi pili bakteri <i>S. Pneumoniae</i>	22
3.6.4 Identifikasi Berat Molekul pili bakteri dengan Elektroforesis (SDS-PAGE).....	22
3.6.5 Pemurnian protein pili <i>S. pneumoniae</i> 54 kDa	23
3.6.6 Isolasi Sel Paru Mencit	23
3.6.7 Uji Adhesi	24
3.7 Analisis Data.....	25
3.8 Alur Penelitian	26
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
4.1 Hasil Penelitian	27
4.2 Pembahasan.....	31
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	34
5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran.....	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN.....	41

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Definisi Operasional	20
Tabel 4.1 Hasil perhitungan indeks adhesi <i>S. pneumoniae</i> pada sel paru mencit. 29	
Tabel 4.2 Estimasi Parameter Analisis Data dengan Grafik Regresi <i>Cubic</i>	30



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Koloni bakteri <i>S. pneumoniae</i> pada media agar darah	5
Gambar 2.2 Sifat α -hemolitik ditunjukkan oleh perubahan media warna hijau atau coklat.....	5
Gambar 2.3 Faktor Virulensi Bakteri <i>S. pneumoniae</i>	6
Gambar 2.4 Pili <i>Streptococcus pneumonia</i>	7
Gambar 2.5 Gambar tiga dimensi RrgA.....	10
Gambar 2.6 Mekanisme adhesi <i>S. pneumoniae</i>	14
Gambar 2.7 Kerangka konsep penelitian	17
Gambar 3.1 Skema Alur Penelitian.....	26
Gambar 4.1 Profil protein pili <i>S. pneumoniae</i> hasil elektroforesis SDS-PAGE..	27
Gambar 4.2 Hasil uji adhesi protein pili 54 kDa <i>S. pneumoniae</i> yang diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x	28
Gambar 4.3 Grafik Analisis Data Regresi <i>Cubic</i>	31

DAFTAR SINGKATAN

BAP	= <i>Blood Agar Plate</i>
BHI	= <i>Brain Heart Infusion</i>
CbpA	= <i>Choline Binding Protein A</i>
EDTA	= <i>Ethylene diamine tetraacetic Acid</i>
GAPDH	= <i>Gliseraldehyde-3-fosfat dehydrogenase</i>
NanA	= <i>Neuraminidase A</i>
PavA	= <i>Pneumococcal Adherence and Virulence Factor A</i>
PBS	= <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PsaA	= <i>Pneumococcal Surface Adhesion A</i>
PspA	= <i>Pneumococcal surface protein A</i>
PspC	= <i>Pneumococcal Surface Protein C</i>
PsrP	= <i>Pneumococcal Serine Repeat Protein</i>
RrgA	= <i>Rlr-regulated gene A</i>
RrgB	= <i>Rlr-regulated gene B</i>
RrgC	= <i>Rlr-regulated gene C</i>
SDS-PAGE	= <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis</i>
SpsA	= <i>Secretory Pneumococcal Surface Protein A</i>
TCA	= <i>Tri Chloroacetic Acid</i>
TCG	= <i>Tryptone Casitone Glucose</i>
TNF	= <i>Tumor Necrosis Factor</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Streptococcus pneumoniae merupakan bakteri patogen komensal yang dapat menyebabkan berbagai macam penyakit seperti pneumonia, meningitis, sinusitis dan otitis media. Keberadaan pneumokokus selain berpotensi menyebabkan patogen, juga sebagai flora normal yang menghuni saluran pernapasan manusia khususnya nasofaring yang terdapat pada anak-anak dan orang dewasa sehat. Keberadaannya dapat dianggap sebagai faktor risiko untuk berkembangnya penyakit saluran pernapasan dan sebagai sumber penularan pneumokokus ke orang lain (Angelis dkk., 2011). Selain sebagai patogen, *S. pneumoniae* juga dapat secara asimtomatik berada di saluran pernapasan bagian atas sebagai karier (Brooks dan Mias, 2018).

Data *World Health Organization* (WHO) tahun 2017 menunjukkan sekitar 808.694 kasus pneumonia menyebabkan kematian setiap 20 detik pada anak balita. Menurut data *United Nations Children's Fund (UNICEF)* (2018), pneumonia membunuh lebih banyak anak daripada penyakit menular lainnya, merenggut nyawa lebih dari 800.000 anak balita setiap tahun, atau sekitar 2.200 setiap hari. Ini termasuk lebih dari 153.000 bayi baru lahir. Secara global, ada lebih dari 1.400 kasus pneumonia per 100.000 anak, atau 1 kasus per 71 anak setiap tahun, dengan insiden terbesar terjadi di Asia Selatan (2.500 kasus per 100.000 anak) dan Afrika Barat dan Tengah (1.620 kasus per 100.000 anak). Pada tahun 2010, pneumonia adalah penyebab utama kematian bayi di dunia dan 30-50% disebabkan oleh *S. pneumoniae* (Liu dkk., 2012). Infeksi pneumonia di Amerika Serikat yang terjadi setiap tahun sebanyak 900.000 kasus disebabkan oleh *S. pneumoniae* (Brooks dan Mias, 2018). Sebanyak 300.000 –600.000 pasien usia lanjut mengalami rawat inap setiap tahun di Amerika Serikat (Simonetti dkk, 2014). Pneumonia merupakan masalah kesehatan utama yang menjadi penyebab kejadian morbiditas dan mortalitas paling banyak pada anak usia di bawah 5 tahun

(balita) dan lanjut usia di negara berkembang seperti Indonesia (Mufida dkk, 2018).

Manifestasi infeksi *S.pneumonia* diawali dengan adhesi bakteri ke sel inang untuk memulai infeksi. Adhesi merupakan kemampuan bakteri untuk dapat melekat pada sel inang. Kemampuan bakteri dalam melakukan adhesi dimediasi oleh berbagai macam protein yang terdapat pada permukaannya (Thanassi dkk., 2012). Variasi protein tersebut dinamakan adhesin (Parija, 2012). Setelah bakteri menempel, kemudian terjadi kolonisasi dan replikasi yang mengawali respons sel inang dalam proses penghancuran sel yang terinfeksi. Kemampuan *S. pneumoniae* untuk melekat didukung oleh beberapa protein permukaan, seperti pili, PspC, PsaA, PsrP, NanA, dan PavA. Namun, adhesi pada sel inang, melalui adhesin yang terlokalisasi pada pili, merupakan peristiwa pertama dan diikuti oleh perlekatan protein permukaan lainnya (Mufida dkk., 2018). Penelitian sebelumnya oleh Danne dan Dramsi (2012) juga menyebutkan bahwa pili adalah organel yang berkontribusi pada langkah-langkah awal infeksi yaitu adhesi dan kolonisasi terhadap sel inang.

Pili merupakan salah satu faktor virulensi yang dimiliki oleh *S. pneumoniae* (Poll dan Opal, 2009; Brooks dan Mias, 2018). Terdapat dua jenis pili yaitu pili tipe 1 dan pili tipe 2 (Nelson dkk., 2007; Bagnoli dkk., 2008; Basset dkk., 2011). Pili merupakan filamen panjang yang terbukti memiliki hubungan virulensi dan kemampuan untuk melakukan adhesi serta kolonisasi (Angelis dkk, 2011). Pili sebagai salah satu faktor adhesi mampu menghindari pembersihan mukus dan cairan lain pada permukaan sel inang (Parija, 2012).

Faktor adhesi pada bakteri dipengaruhi oleh kemampuan hemaglutinasinya (Mufida dkk., 2018). Kemampuan hemaglutinasi yang tinggi sangat terkait dengan kemampuan kolonisasi yang tinggi. Penelitian pada *Shigella spp.* menunjukkan bahwa terdapat korelasi antara hemaglutinasi dan kolonisasi (Mitra dkk, 2012). Korelasi ini juga terbukti pada protein hemaglutinin fimbrial dari *Bordetella pertussis* yang memediasi perlekatan bakteri ke saluran pernapasan tikus (Melvin dkk, 2015). Pada penelitian sebelumnya telah diidentifikasi bahwa pili *S. pneumoniae* memiliki 4 berat molekul yang dominan yaitu 67 kDa, 54 kDa,

25 kDa, dan 11 kDa. Uji hemaglutinasi menunjukkan bahwa protein dengan berat molekul 54 kDa terbukti sebagai protein hemaglutinin (Mufida dkk, 2018). Penelitian yang dilakukan oleh Mufida dan Suswati (2007) membuktikan bahwa semakin tinggi konsentrasi protein pili yang diberikan maka indeks adhesi bakteri semakin rendah. Hal ini menunjukkan bahwa protein tersebut bersifat adhesi karena memiliki protein adhesin. Namun penelitian tentang protein hemaglutinin pili *S. pneumoniae* 54 kDa sebagai adhesin yang mampu menempel pada sel inang belum ada, sehingga perlu diteliti untuk membuktikan bahwa protein hemaglutinin pili *S. pneumoniae* 54 kDa merupakan protein adhesin.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat diambil suatu rumusan masalah, yaitu:

- a. apakah protein pili *S. pneumoniae* 54 kDa berperan sebagai adhesin?
- b. apakah penurunan konsentrasi protein pili *S. pneumoniae* 54 kDa berpengaruh terhadap indeks adhesi?

1.3 Tujuan Penelitian

penelitian ini memiliki tujuan sebagai berikut:

- a. membuktikan bahwa protein pili *S. pneumoniae* 54 kDa berperan sebagai adhesin
- b. mengetahui penurunan konsentrasi protein pili *S. pneumoniae* 54 kDa berpengaruh terhadap indeks adhesi

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang didapatkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. dapat mengetahui peran protein hemaglutinin pili *S. pneumoniae* 54 kDa dalam proses patogenesis bakteri *S. pneumoniae*
- b. dapat dijadikan acuan untuk penelitian selanjutnya, misalnya pembuatan vaksin untuk pencegahan penyakit infeksi akibat bakteri *S. pneumoniae*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

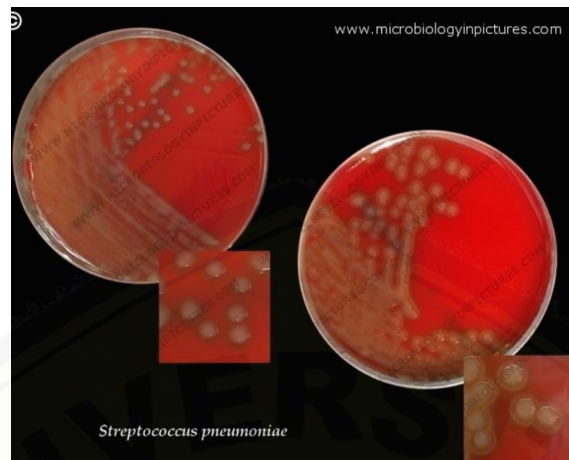
2.1 *Streptococcus pneumoniae*

2.1.1 Morfologi dan taksonomi

Streptococcus pneumoniae adalah bakteri Gram positif yang berbentuk bulat berpasangan (diplococcus). Bakteri ini juga dikenal sebagai pneumokokus yang dapat bertahan hidup dalam kondisi aerob maupun anaerob (Brooks dan Mias, 2018). Saat ini terdapat 97 serotipe *S. pneumoniae* yang telah diidentifikasi (Geno dkk., 2015; Keller dkk., 2016). Semua serotipe ini telah dikenali oleh sel inang (Hackel dkk., 2013). Pada Gambar 2.1, tampak bahwa bakteri ini dapat membentuk koloni bulat dengan ukuran kecil yang bersifat α -hemolitik jika ditanam pada media agar darah. Sifat α -hemolitik ditunjukkan oleh perubahan media warna hijau atau coklat yang disebabkan oleh lisis parsial sel darah merah (Gambar 2.2) (Bridy-Pappas dkk, 2005).

Taksonomi bakteri *S. pneumoniae* berdasarkan *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Subkingdom	: Posibacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Coccus
Ordo	: Lactobacillales
Family	: Streptococcaceae
Genus	: Streptococcus
Species	: <i>Streptococcus pneumoniae</i>



Gambar 2.1 Koloni bakteri *S. pneumoniae* pada media agar darah (Sumber: Microbiology In Pictures, 2019)



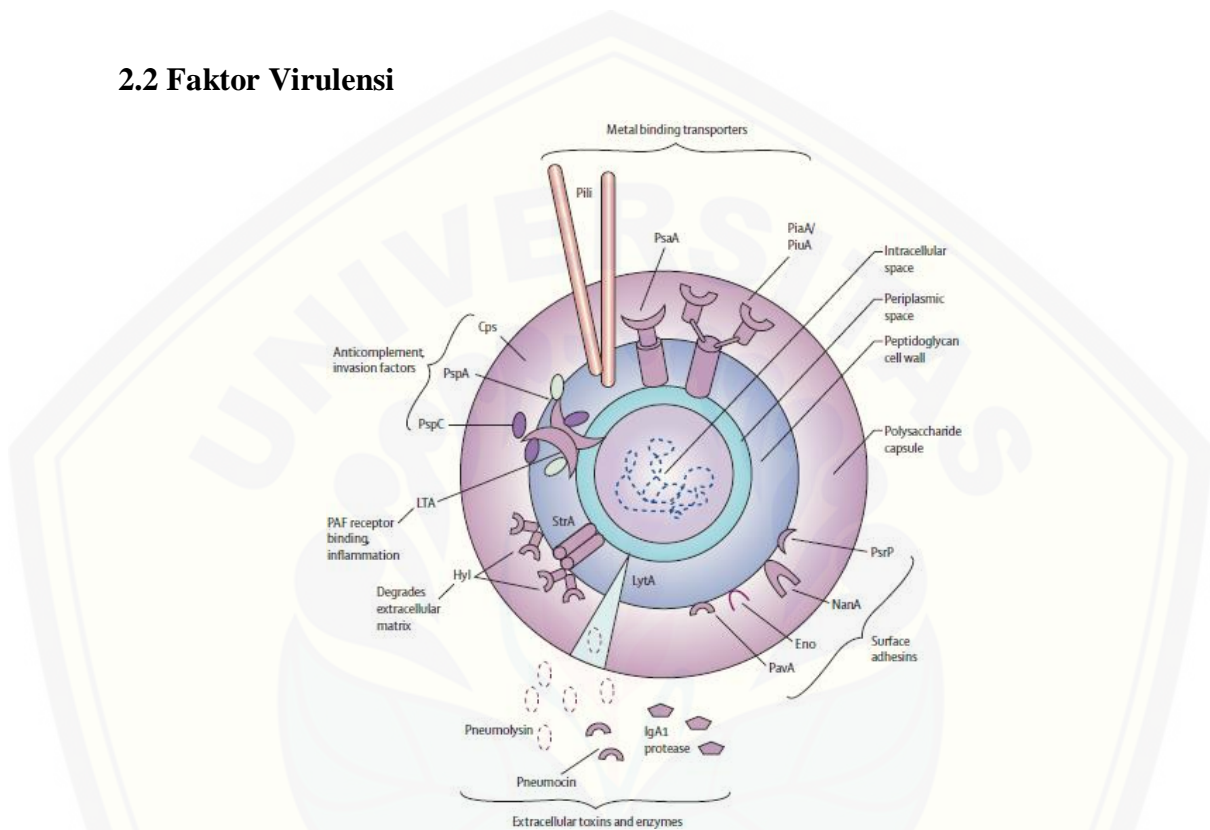
Gambar 2.2 Sifat α -hemolitik ditunjukkan oleh perubahan media warna hijau atau coklat (Sumber: Microbiology In Pictures, 2019)

2.1.2 Epidemiologi dan Transmisi

Streptococcus pneumoniae atau yang disebut dengan pneumokokus merupakan flora normal saluran pernafasan bagian atas (nasofaringeal) manusia (Brooks dan Mias, 2018). Infeksi pneumokokus diperkirakan menyebar dari orang ke orang melalui tetesan / aerosol dan kolonisasi nasofaring merupakan prasyarat untuk penyakit pneumokokus. Bakteri memasuki rongga hidung dan menempel

pada sel epitel nasofaring dan kemudian dapat menyebar lebih jauh ke organ lain, seperti telinga, sinus, atau melalui bronkus ke paru-paru dan kemudian berpotensi menembus penghalang mukosa untuk memasuki aliran darah dan atau melewati sawar darah otak untuk menyebabkan meningitis (Normark dan Tuomanen, 2013).

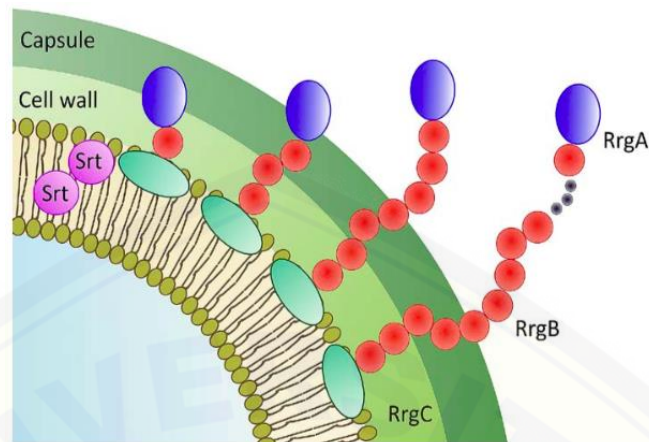
2.2 Faktor Virulensi



Gambar 2.3 Faktor Virulensi Bakteri *S. pneumoniae* (Sumber: Poll dan Opal, 2009)

Streptococcus pneumoniae merupakan flora normal yang mendiami nasofaring manusia tetapi juga dapat menyebabkan penyakit otitis media, pneumonia, bakteremia, dan meningitis. Pneumokokus memiliki berbagai macam faktor virulensi yang terlibat dalam patogenesis infeksi *S. pneumoniae*. Pemahaman terhadap peran dari faktor virulensi dapat membantu mengetahui patogenesis infeksi penyakit dan dapat memberikan terapi ataupun vaksinasi dengan tepat (Mitchel dan Mitchel, 2010). Menurut Poll dan Opal (2009), *S. pneumoniae* memiliki beberapa faktor virulensi sebagaimana yang terdapat pada Gambar 2.3.

2.2.1 Pili



Gambar 2.4 susunan pili *Streptococcus pneumoniae* (Sumber: Munguia dkk, 2018)

Pili merupakan struktur seperti seperti rambut yang terletak di permukaan sel bakteri. Pili pertama kali diidentifikasi pada bakteri Gram positif *Corynebacterium diphtheria*. Pili yang diekspresikan oleh bakteri Gram positif berbeda dengan pili bakteri Gram negatif. Pili tersusun atas pilin yang terbentuk secara kovalen, panjang dan tipis, membentuk untaian seperti manik – manik dengan diameter sekitar 3 nm dan panjang mulai dari 0,1 μm hingga 5 μm . Pili sangat kuat meskipun bentuknya tipis dan integritasnya dijaga oleh rangkaian yang berikatan silang secara kovalen antara tiap subunit pili dan dalam subunit pili tersebut membentuk ikatan isopeptida. Pembentukan pili dimulai dari membran plasma tempat enzim transpeptidase berada dan berlanjut ke dinding sel sebagai tempat protein membentuk struktur seperti rambut (Paterson dan Baker 2011; Munguia dkk., 2018).

Pili membantu perlekatan *S. pneumoniae* dan kolonisasi sel-sel epitel dalam nasofaring dan paru-paru inang (Pancotto dkk, 2013; Steel dkk, 2013). Pili ini juga membantu bakteri menghindari fagositosis oleh sel imun inang (Poll dan Opal, 2009). Ada dua jenis pili utama yang ditemukan pada *S. pneumoniae* yaitu pili tipe 1 dan pili tipe 2. Pili tipe 1 ditemukan pada 30% isolat klinis (Angelis dkk, 2011) dan memiliki beberapa sifat yang berkaitan dengan kolonisasi dan penyakit invasif sedangkan pili tipe 2 ditemukan hanya sekitar 16% (Bagnoli dkk,

2008). Pili tipe 1 terdiri dari tiga protein struktural yang melekat secara kovalen dengan RrgB sebagai protein mayor yang membentuk batang pili, sedangkan RrgC dan RrgA adalah protein minor yang menghiasi poros dan ujung pili (Gambar 2.4). Kedua tipe pili memiliki peran sebagai protein adhesin (Nelson dkk, 2007; Izore´ dkk, 2010; Munguia dkk., 2018).

Penelitian telah menunjukkan bahwa *S. pneumoniae piliated* menginduksi respon *Tumor Necrosis Factor* (TNF) yang lebih tinggi daripada yang *non-piliated* selama infeksi pneumokokus. Hal ini menunjukkan bahwa pili mampu menstimulasi respon inflamasi dari inang (Barocchi dkk, 2006). Penelitian Pancotto menjelaskan bahwa ekspresi pili tipe 1 diatur secara *in vivo*. Ekspresi pili tipe 1 yang tinggi diamati pada tahap awal kolonisasi dan terjadi penurunan ekspresi pada tahap infeksi selanjutnya. Hal ini diperlukan untuk menghindari respons imun inang tetapi perlu diteliti lebih lanjut karena mekanisme masih belum jelas (Pancotto dkk, 2013).

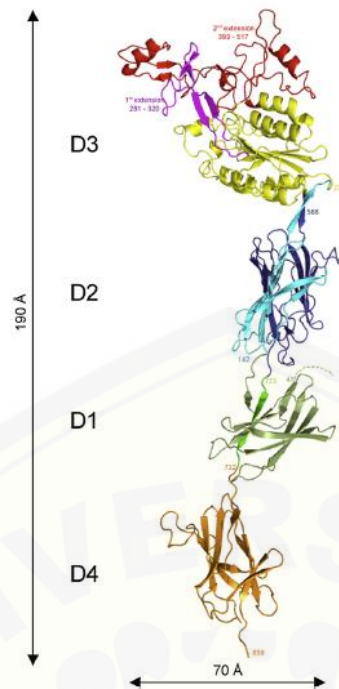
Keberadaan pili bakteri dapat diperiksa dengan menggunakan mikroskop elektron. Cara lain yaitu membandingkan beberapa pita protein yang nampak pada potongan pili juga akan terlihat pada *whole cell* (sel utuh) namun tidak didapatkan pada sel bakteri yang telah dipotong pilinya (Agustina, 2013). Namun pada penelitian sebelumnya, prediksi tersebut cukup dengan melihat hasil dari SDS-PAGE (Hidayati 2010, Mufida dkk 2010, Agustina dkk 2012). Alternatif lain untuk mengidentifikasi profil protein pili yaitu sekuens / urutan asam amino dianalisis dengan membandingkan sekuens asam amino dengan data bank protein dari *S. pneumoniae*. Data membuktikan bahwa asam amino dari pita / band 54 kDa cocok dengan *chain A structure of the pilus backbone* (Rrgb) dari *S. pneumoniae* (100% kemiripan) sehingga dapat dipastikan bahwa itu merupakan pili (Mufida dkk, 2018).

a. Pili tipe 1

Pili tipe 1 memiliki susunan yang terdiri dari 3 subunit protein RrgA, RrgB, dan RrgC. Susunan bentuk batang pili terdiri atas ikatan kovalen monomer subunit protein RrgB, subunit protein RrgA terletak di ujung distal batang pili,

sedangkan RrgC terletak dibagian dasar penempelan pili. Struktur tersebut menunjukkan bahwa protein RrgB merupakan *backbone* pili, RrgA dan RrgC merupakan protein tambahan dengan RrgA berperan sebagai adhesin dan RrgC sebagai protein untuk adhesi ke dinding sel (Lofling dkk, 2011). RrgB terdiri dari empat domain, D1-D4 (Mortaji dkk, 2010). Domain tersebut panjangnya sekitar 195 A dan lebar 70 A (Gambar 2.5). Domain D1 dan D2 membawa elemen dari daerah N-terminal dan C-terminal dari RrgA sehingga domain yang lain bisa dimasukkan (domain D3 dimasukkan ke dalam D2 dan D2 / D3 dimasukkan ke dalam D1). Keempat domain membuat kontak satu sama lain, sebagian besar dihubungkan melalui tautan pendek dan *hairpins*, yang menunjukkan itu merupakan protein *full-length* berikatan dengan RrgB yang terdapat pada *flexible* domain. Domain D1 sangat mirip dengan domain IgG. Lima β *strands* terbentuk dari *sequence* N terminus (residu 47-141), sedangkan *strand* terakhir, yang terhubung ke D4, dibentuk oleh residu C-terminal 723-731 (ditunjukkan warna hijau tua). Domain D2 dibentuk oleh residu N-terminal 144-218 dan residu C-terminal 593-722 yang mengikat 11-*b-stranded sandwich* (ditunjukkan warna cyan/biru kehijauan dan biru). Domain D2 ditautkan ke domain D3 melalui struktur *short b-hairpin* yang terdiri dari residu regio N-terminal dan C-terminal (Thr214-Gln218, dan Val587-Lys591). Domain D3 RrgA (Lys219-Ile586) terdapat *von Willebrand factor* (VWA), molekul yang berinteraksi dengan kollagen tipe I dan II (Izore dkk, 2010).

RrgB memiliki sifat antigenik yang tinggi serta memiliki lima daerah dengan panjang 13-23 asam amino sebagai potensi situs antigenik, sehingga RrgB berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat vaksin berdasarkan sifat antigeniknya. RrgB sebagai protein hemaglutinin dari *backbone* pili memiliki antigenisitas yang tinggi, dan diprediksi sebagai kandidat potensial untuk generasi baru vaksin berbasis protein pili (Mufida dkk, 2018). RrgB memiliki peran yang sangat penting dalam proses pembentukan pili karena bakteri yang tidak memiliki RrgB, maka tidak akan terbentuk pili (LeMieux dkk, 2008).



Empat domain RrgA sejajar seperti manik-manik; D1 ditampilkan dengan warna hijau tua (regio N-terminal) dan hijau muda (regio C-terminal); domain Cna-B-like domain dari D2 dibentuk oleh residu N-terminus (biru muda) dan C-terminus (biru tua) dari molekul. *Integrin I-like* domain ditampilkan dengan warna kuning, dengan lengan yang diperpanjang berwarna merah dan magenta. C terminus RrgA terdiri dari domain D4 (oranye).

Gambar 2.5 Gambar tiga dimensi RrgA (Sumber: Izore dkk, 2010)

b. Pili tipe 2

Pili tipe 2 hanya ditemui sekitar 16% isolate klinik. Gen yang mengkode pili ini adalah *Pili Islet-2* (PI-2) yang mirip dengan FTC-3 pili dari *S.pyogenes*. Pili Islet-2 mengandung lima gen yang mengkode dua sortase yaitu srtG1 dan srtG2, sebuah *signal peptidase-related protein* (*sipA*) dan dua LPXTG *-type surface anchored protein* yaitu pitA dan pitB (Bagnoli dkk, 2008).

2.2.2 Polisakarida kapsul

Bakteri *S. pneumoniae* memiliki lapisan terluar dengan ketebalan antara 200-400 nm yang disebut polisakarida kapsul. Lapisan peptidoglikan merupakan permukaan luar dinding sel yang digunakan sebagai tempat melekatnya kapsul. Penelitian pada hewan coba, menunjukkan bahwa *S. pneumoniae* yang tidak

memiliki kapsul terbukti tidak bisa menyebabkan infeksi pneumonia dan sepsis, sehingga polisakarida kapsul merupakan faktor virulensi yang penting pada mikroorganisme ini (Kadioglu dkk, 2008).

Peran kapsul dalam virulensi berasal dari aktivitas antiphagositiknya. Antibodi terhadap konstituen dinding sel pneumokokus melekat pada permukaan organisme dan mengikat komplemen. Kapsul ini juga penting untuk kolonisasi, mencegah pengangkatan secara mekanik oleh lendir, dan juga dapat membatasi autolisis serta mengurangi paparan antibiotik (Mitchell dan Mitchell, 2010).

Kapsul polisakarida sebagai salah satu faktor virulensi *S. pneumoniae* bisa melakukan adhesi pada permukaan epitel dan berperan penting untuk menghindari dari pertahanan inang oleh fagositosis dependen dan independen (Hyams dkk, 2013). Selain melakukan adhesi juga membantu mengawali infeksi dengan membiarkan bakteri menempel pada sel inang dan menyebabkan peradangan, serta memberikan perlindungan dari sistem kekebalan inang (Mitchell dan Mitchell, 2010; dan Hyams dkk., 2013). Kapsul menghambat pertahanan inang seperti lapisan lendir dan silia serta penting untuk kolonisasi sel bakteri pneumokokus (Nelson dkk, 2007).

2.2.3 Protein permukaan

a. *Pneumococcus surface protein A* (PspA)

PspA adalah protein permukaan yang sangat elektronegatif dan karakteristik ini dapat menghalangi pengikatan komplemen yang mencegah opsonisasi *S. pneumoniae* (Kadioglu dkk, 2008). PspA juga dapat mengikat inang laktoferin, khususnya apolacto-ferrin (bebas zat besi), yang pada gilirannya memberikan perlindungan terhadap *S. pneumoniae* melawan pembunuhan bakterisida apolaktoferin (Poll dan Opal, 2009; dan Steel dkk, 2013).

b. *Pneumococcus surface protein C* (PspC)

PspC adalah protein permukaan sel multifungsi yang dikenal dengan beberapa nama lain yang mencerminkan aktivitasnya yang berbeda. Sebagai contoh, ia juga dikenal sebagai *choline-binding protein A* (CbpA). PspC juga mengikat reseptor imunoglobulin polimer yang biasanya mengangkut sekretori

IgA; karenanya juga disebut SpsA (*secretory pneumococcal surface protein A*) (Brooks dan Mias, 2018).

2.2.4 Toksin pneumolysin (PLY)

Toksin pneumolysin (PLY) yang mampu membentuk pori-pori dalam membran sel dapat ditemukan dalam sitoplasma *S. pneumoniae* dan bakteri Gram positif lainnya (Keller dkk, 2016). PLY dilepaskan sebagai hasil dari lisis sel dan bersifat toksik bagi sel inang (Hotomi dkk, 2016). PLY berikatan dengan membran yang mengandung kolesterol dan membentuk pori-pori yang kemudian mengarah pada lisis sel inang (Marshall dkk, 2015 dan Rabes dkk, 2016). Selain menyebabkan lisis sel, PLY berperan dalam menyebabkan pembentukan biofilm (Shak dkk, 2013), mengurangi pembersihan (*clearance*) lendir bakteri, dan dapat mengganggu sistem kekebalan tubuh inang (Lemon dan Weiser, 2015; Hotomi dkk, 2016; dan Keller dkk, 2016).

Peran PLY dalam patogenesis infeksi telah dipelajari pada hewan coba. Eksperimen awal dengan strain PLY menunjukkan bahwa kurangnya toksin mengurangi virulensi organisme dalam rute infeksi intranasal dan sistemik. Ketika ditanamkan ke paru-paru tikus, PLY *S. pneumoniae* menyebabkan peradangan yang jauh lebih sedikit (Brooks dan Mias, 2018).

2.3 Protein Adhesin

Proses infeksi mikroba melibatkan serangkaian peristiwa kompleks yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan inang. Adhesi bakteri pada sel inang merupakan langkah penting dalam proses patogenik dan biasanya dimediasi oleh protein yang terpapar permukaan bakteri. Protein adhesin pada pili dianggap sebagai faktor virulensi potensial dan kunci utama dalam proses infeksi (Moschioni dkk, 2010).

Adhesi *S. pneumoniae* ke saluran pernapasan bagian atas merupakan prasyarat untuk kolonisasi dan karena itu dianggap sebagai faktor risiko utama untuk pengembangan penyakit pneumokokus (Vernatter dan Pirofski, 2013; Siegel dan Weiser, 2015). *Streptococcus pneumoniae* mengkolonisasi nasofaring

dengan menempel pada sel mukosa saluran pernapasan atas sebagai syarat untuk perkembangan penyakit (Shak dkk, 2013). Sifat adhesin *S. pneumoniae* telah diteliti selama dua dekade terakhir (Paterson dan Orihuela, 2010). Molekul yang telah diketahui mengawali interaksi *S. pneumoniae* dengan sel inang untuk mengarah ke kolonisasi nasofaring adalah pili (Moschioni dkk, 2008; Harfouche dkk, 2012).

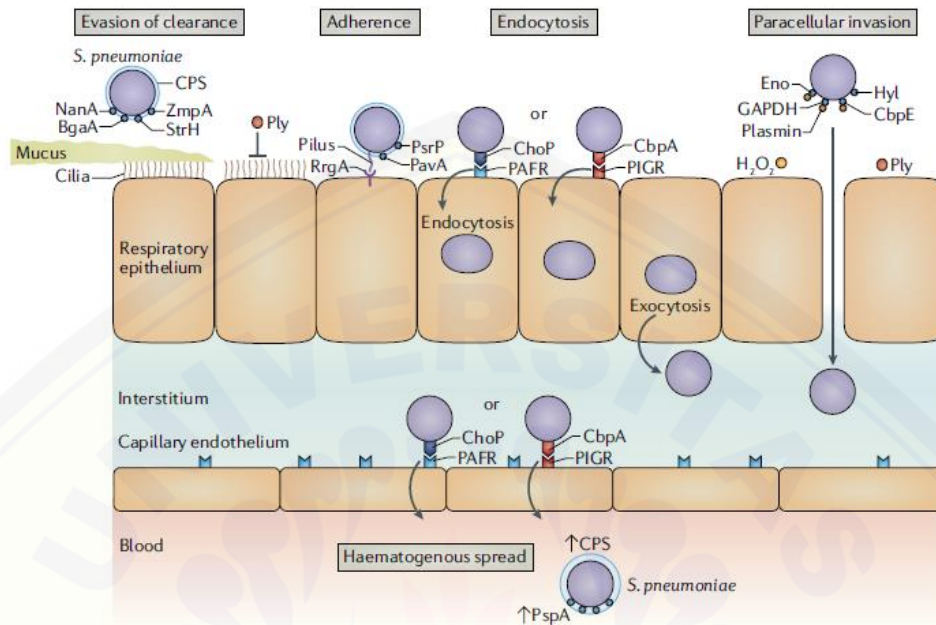
2.3.1 Fimbrial Adhesi

Fimbrial adhesi yaitu perlekatan bakteri ke sel inang yang diperantarai komponen bakteri berupa pili atau fimbria. Pili tersebut mempunyai protein adhesin yang dapat melakukan kontak dengan sel inang. Bakteri *S. pneumoniae* memiliki 2 jenis pili yaitu pili 1 dan pili 2. Pili 1 mempunyai protein adhesin yaitu RrgA yang merupakan adhesin mayor dari bakteri *S. pneumoniae* serta berperan dalam memediasi adhesi bakteri ke epitel paru-paru. Komponen yang pertama kali melakukan adhesi ke sel inang adalah fimbrial adhesi yang kemudian akan diikuti oleh afimbrial adhesi (Basset dkk, 2013).

2.3.2 Afimbrial Adhesi

Protein *S. pneumoniae* yang melekat pada dinding sel ada 3 jenis. Jenis pertama terdiri dari protein permukaan yang berikatan secara kovalen antara bakterial peptidoglikan melalui reaksi transpeptidase yang dikatalis oleh sortase yang mengenali motif C-terminal pentapeptida, LPxTG atau seperti LPxTG. Jenis kedua terdiri dari *family of noncovalently anchored choline-binding protein* yang berikatan dengan fosforilkolin ChoP dan lipid yang menempel di asam teikoid. Jenis ketiga diwakili oleh lipoptotein yang terdapat di lapisan phospholipid. Terdapat protein permukaan lain selain yang disebutkan di atas yaitu *pneumococcal adherence and virulence factor A* (PavA) dan dua glikolitik enzim, yaitu *gliseraldehida-3-fosfat dehydrogenase* (GAPDH) dan *a-enolase*. PavA telah diidentifikasi sebagai adhesin pneumokokus untuk fibronektin dan sebagai faktor virulensi lain dalam infeksi pneumokokus (Bergmann dan Hammerschmidt, 2006; Vob dkk, 2012).

2.4 Mekanisme Molekuler Adhesi Pili *S. pneumoniae* pada Sel Inang



Gambar 2.6 Mekanisme adhesi *S. pneumoniae* (Sumber: Weisser dkk, 2018)

Tahapan bakteri dalam adhesi ke sel inang seperti yang terlihat pada Gambar 2.6 yaitu *S. pneumoniae* menghindari mukus dan pembersihan mukosiliar menggunakan kapsul polisakarida yang bermuatan negatif (CPS) dan degradasi proteolitik dari sekresi imunoglobulin A1 (IgA1) oleh seng metalloprotease ZmpA (yang dikenal sebagai protease IgA1). *Pneumolysin* (PLY) membantu dalam menghambat pembersihan silia. Adhesi pada permukaan sel epitel paru dimediasi oleh subunit pilus tambahan RrgA di ujung pili. Protein RrgA akan menempel pada reseptor *toll-like receptor* (TLR) 2 yang terdapat pada sel paru (Weisser dkk, 2018). NanA adalah neuraminidase yang paling kuat diekspresikan dan memainkan peran penting dalam pembentukan biofilm. Neuraminidase juga memecah glikolipid, glikoprotein, dan oligosakarida yang memperlihatkan reseptor N-asetil-glikosamin pada sel epitel inang. Faktor virulensi lainnya termasuk PspC meningkatkan perlekatan pada sel inang. CbpA membantu dalam mengikat reseptor imunoglobulin polimer (pIgR) yang terdapat pada sel inang bersama dengan PspA yang berinteraksi dengan komponen pertahanan lainnya.

Interaksi ini membantu dalam migrasi lebih lanjut sel bakteri melalui penghalang mukosa. Protease IgA yang disekresikan oleh pneumokokus membelah efek opsonising dari IgA sekretori dan antibodi membantu perlekatan terhadap sel-sel epitel paru-paru. *Streptococcus pneumoniae* melakukan invasi dengan berikatan pada *platelet-activating factor receptor* (PAFR) melalui *phosphorylcholine* (ChoP) atau berikatan pada *polymeric immunoglobulin receptor* (PIGR) melalui protein pengikat kolin A (CbpA) yang menginduksi endositosis dan diikuti oleh pelepasan pneumokokus pada permukaan basolateral. Alternatif *S. pneumoniae* dalam melakukan invasi yaitu dengan cara Ply dan hidrogen peroksida (H₂O₂) langsung merusak epitel, serta merusak hyaluronate lyase (Hyl) dan plasmin, yang terikat pada permukaan pneumokokus melalui enolase (Eno), gliseraldehid 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) atau CbpE. Cara ini memecah barrier epitel dan menyediakan jalur untuk invasi paracellular (Weisser dkk, 2018).

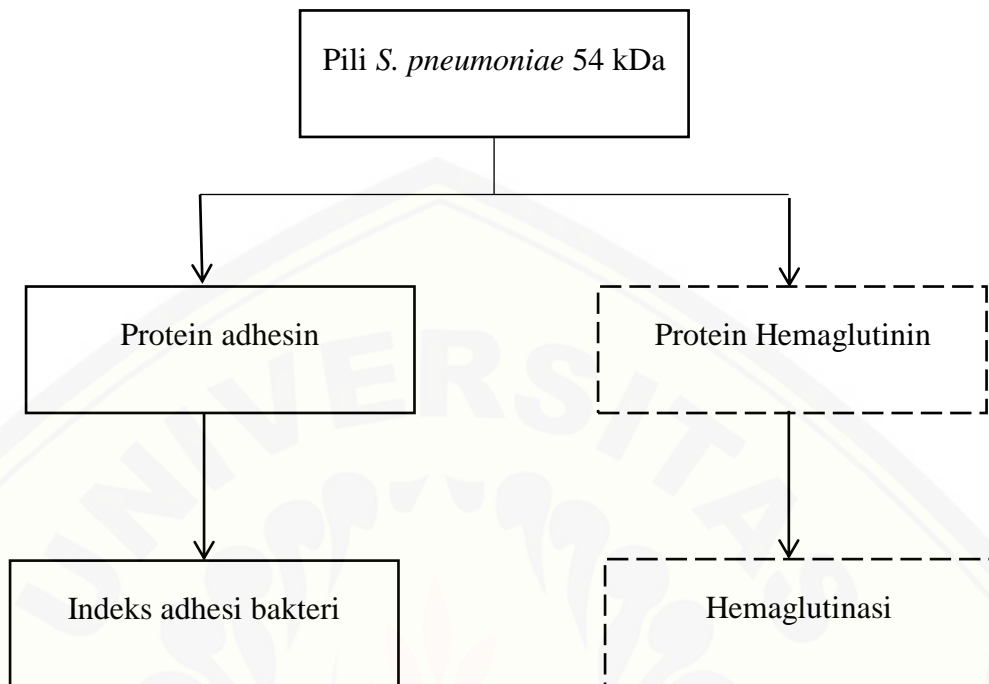
2.5 Patogenesis infeksi *Streptococcus pneumoniae*

Proses patogenesis dari pneumonia meliputi 3 faktor yaitu keadaan inang, mikroorganisme yang menyerang pasien, dan interaksi lingkungan. Interaksi yang terjadi akan menentukan klasifikasi dan bentuk manifestasi pneumonia, berat ringannya penyakit, diagnostik empiris, rencana terapi, dan prognosis dari pasien. Patogen yang sampai di daerah trakea dapat berasal dari lingkungan luar, teraspirasi oleh manusia melalui selang endotrakeal maupun inhalasi langsung. Patogen yang berhasil melewati pertahanan tubuh seperti mukus dan proses fagositosis kemudian akan mengalami kolonisasi pada permukaan epitel saluran pernapasan bagian bawah manusia. Proses kolonisasi pada epitel saluran pernapasan bagian bawah manusia dibantu dengan pili, protein permukaan, dan racun yang dikeluarkan oleh bakteri penyebab pneumonia, yang kemudian akan membentuk biofilm (Setiati, 2014).

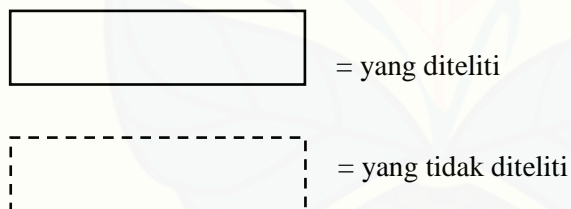
Infeksi *S. pneumoniae* menyebar luas melalui droplet. Bakteri ini mampu menginvasi inangnya dengan cara mengkolonisasi nasofaring secara asimtomatis karena *S. pneumoniae* merupakan bagian dari mikrobiota komensal (flora normal) saluran pernapasan atas. Kemampuan untuk melekat pada permukaan inang

merupakan langkah utama dalam keberhasilan kolonisasi oleh mikroba patogen. Kolonisasi dimulai dengan adhesi bakteri pada reseptor. Pili merupakan protein adhesin yang memediasi perlekatan spesifik pada permukaan sel epitel (Antão dkk., 2009). Setelah terjadi kolonisasi, jika bakteri tidak dibersihkan oleh sistem kekebalan tubuh, bakteri menyebar secara horisontal ke saluran pernapasan bawah dan menjadi patogen. Sistem imun yang kuat dapat membantu membersihkan *S. pneumoniae* sebelum menjadi patogen. Mekanisme pertahanan yang buruk menyebabkan inang menjadi sasaran kolonisasi *S. pneumoniae* yang kemudian dapat menyebabkan penyakit pneumokokus. *Streptococcus pneumoniae* yang awalnya menghuni permukaan mukosa nasofaring dapat bermigrasi ke paru-paru dan menyebabkan pneumonia pneumokokus (Brooks dan Mias, 2018). Proses ini merupakan sebuah infeksi paru-paru yang mengakibatkan peradangan pada alveoli karena terisi cairan sehingga individu kesulitan untuk bernapas. Individu yang menderita pneumonia biasanya menderita sesak napas, sering batuk, dan demam tinggi (Wunderink dan Waterer, 2014).

2.6 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2.7 Kerangka konsep penelitian



Streptococcus pneumoniae merupakan bakteri Gram positif yang memiliki pili sebagai faktor virulensi yang berperan dalam proses adhesi atau perlekatan bakteri terhadap sel inang. Hal ini disebabkan karena komponen protein penyusun pili dapat berperan sebagai adhesin. Adhesin merupakan protein dengan berat molekul tertentu yang membantu perlekatan bakteri ke reseptor sel inang sebagai langkah awal terjadinya infeksi. Selain berperan dalam adhesi, pili *S. pneumoniae* juga berperan dalam kolonisasi bakteri. Kemampuan kolonisasi bakteri berkorelasi dengan kemampuan mereka untuk hemagglutinasasi sel darah merah. Uji hemagglutinasasi menunjukkan bahwa protein dengan berat molekul 54 kDa terbukti sebagai protein hemagglutinin. Peneliti akan melakukan penelitian terhadap protein

hemagglutinin pili *S. pneumoniae* berat molekul 54 kDa dengan beberapa konsentrasi untuk mengetahui peran protein tersebut sebagai protein adhesin melalui uji adhesi pada sel paru mencit. Pada penelitian sebelumnya dibuktikan bahwa semakin rendah konsentrasi protein pili maka reseptor yang dijenuhi oleh protein adhesin semakin sedikit sehingga indeks adhesi bakteri semakin banyak. Alasan dipilih sel paru karena sesuai dengan patogenitas bakteri. Hasil dapat diketahui dengan menghitung indeks adhesi yaitu jumlah bakteri yang menempel pada 100 sel paru mencit.

2.7 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini yaitu:

- a. protein pili *S. pneumoniae* 54 kDa dapat berperan sebagai adhesi.
- b. penurunan konsentrasi protein pili *S. pneumoniae* 54 kDa berpengaruh terhadap indeks adhesi.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian *true* eksperimental dengan tujuan untuk membuktikan bahwa penurunan konsentrasi protein pili 54 kDa *S. pneumoniae* dapat meningkatkan indeks adhesi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Pelaksanaan penelitian ini direncanakan sekitar 2 bulan yaitu pada Oktober 2019 sampai November 2019.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah protein pili 54 kDa *S. pneumoniae*, sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah indeks adhesi bakteri ke sel paru.

3.4 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel berikut;

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur / Alat Bantu Pengamatan	Cara Ukur	Hasil Ukur	Jenis Data
Protein pili 54 kDa	Protein yang terdapat pada pili bakteri <i>S. pneumoniae</i> yang didapat dengan cara isolasi pili kemudian dilanjutkan dengan SDS-PAGE dan hasilnya dapat dilihat pada gel hasil SDS-PAGE	SDS-PAGE	Membandingkan dengan protein marker	Kuantitatif	Rasio
Indeks adhesi	Jumlah bakteri yang menempel pada 100 sel paru mencit. Perhitungan ini dilakukan tiga kali pengulangan kemudian diambil rata-ratanya	Mikroskop	Menghitung secara manual jumlah bakteri yang menempel pada seluruh lapang pandang sel paru mencit sampai ditemukan 100 sel paru dengan perbesaran mikroskop 1000x.	Kuantitatif (jumlah bakteri yang menempel / 100 sel)	Rasio

3.5 Instrumen Penelitian

3.5.1 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu vortex, *centrifuge*, *pilli cutter*, *shaking incubator*, sterilisator, elektroforesis SDS-PAGE, tabung Erlenmeyer, *object glass*, *cover glass*, *beaker glass*, *refrigerator*, mikroskop, *auto clave*, *magnetic stirer*, tabung *falcon*, *plate*, *dialysis tube*, gunting, gelas ukur, pipet tetes, mikropipet, tabung eppendorf, spuit 3 cc, spuit 5 cc, spuit 10 cc, botol Schott, dan tabung reaksi.

3.5.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

- a. Bahan untuk kultur *S. pneumoniae* yaitu media *Thiaproline Carbontae Glutamate* (TCG) dan media *Brain Heart Infusion* (BHI)
- b. Bahan untuk isolasi pili *S. pneumoniae* yaitu *Tri Chloroacetic Acid* (TCA) dan cairan *Posphat Bufferd Saline* (PBS) pH 7,4
- c. Bahan untuk elektroforesis guna mengetahui berat molekul protein yaitu PBS steril, larutan penyangga (5 mM Tris HCL pH 6,8, *2-mercapto ethanol* 5%, *sodium dodecyl sulfate* 2,5%, gliserol 10%, dengan warna pelacak *bromophenol blue*), *mini slab gel* 12,5% dengan *stacking gel* 4%, dan *coomasive brilliant blue*
- d. Bahan untuk elektroelusi dan dialisis yaitu larutan buffer, aquades steril, PBS steril, etanol dingin, dan larutan buffer pH 6,8 *Tris HCL* 0,5 M
- e. Bahan untuk isolasi sel paru mencit yaitu mencit, kloroform, PBS pH 7,4 yang berisi 1 mM *dithiothretiol*, PBS steril, cairan yang berisi 1,55 mM KCL; 9,6 mM NaCl; 8 mM KH₂SO₄; 27 mM Na *Citrate* dan 5,6 mM Na₂HPO₄ dengan pH 7,4, cairan yang berisi 1,5 mM EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*) dan 0,5 mM *dithiothreitol*
- f. Bahan untuk uji adhesi protein pili *S. pneumoniae* yaitu bakteri *S. pneumoniae*, PBS, protein pili, sel paru mencit, dan pewarnaan gram.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Uji Kelayakan Etik

Peneliti mengajukan permohonan persetujuan etik kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penelitian dapat dilaksanakan setelah mendapat persetujuan etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.6.2 Kultur bakteri *S. pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae ditanam pada media *brain heart infusion* (BHI). Suspensi bakteri diambil sebanyak 10 ml dan dimasukkan ke dalam botol yang mengandung media agar bifasik *thiaproline carbonate glutamate* (TCG) untuk memperbanyak pili. Media TCG mengandung

0,02% *thioprolin*, 0,3% NaHCO₃, 0,15 *bactotryton*, ekstrak ragi 0,2%, 0,5% NaCl, agar bacto 2%, dan 1 mM EGTA (Ehara dkk, 1987 dalam Mufida dkk, 2010).

3.6.3 Isolasi pili bakteri *S. pneumoniae*

Bakteri yang telah dikultur kemudian dipanen dengan cara dikerok dan selanjutnya ditambahkan *Tri Chloroacetic Acid* (TCA) hingga konsentrasi mencapai 3%. *Tri Chloroacetic Acid* berfungsi untuk melemahkan bakteri dan juga membuat pili kaku tegak agar mudah untuk dipotong. Tabung yang berisi bakteri dan TCA tersebut disentrifugasi 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Hasil sentrifugasi bagian supernatannya dibuang dan pelet diresuspensi dengan PBS pH 7,4 kemudian pili bakteri dipotong menggunakan *pili cutter* selama 30 detik dengan kecepatan 5.000 rpm pada suhu 4°C. Prosedur ini diulang sampai supernatan jernih seperti PBS dengan masa istirahat 1 menit setiap pengulangan. Hasil yang diperoleh dari pemotongan pili bakteri kemudian disentrifugasi selama 30 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 12.000 rpm dan bagian supernatan berisi pili yang akan digunakan (Sumarno dkk, 2012 dalam Mufida dkk, 2018).

3.6.4 Identifikasi Berat Molekul pili bakteri dengan Elektroforesis (SDS-PAGE)

Penentuan berat molekul protein dilakukan dengan menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis*). Sampel protein dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit dalam larutan penyangga yang mengandung 5 mM Tris pada pH 6,8, 5% 2-*mercaptoethanol*, 2,5% w/v *sodium dodecyl sulfat*, 10% v/v gliserol dengan warna pelacak *bromophenol blue*. Pemanasan sampel dilakukan agar terjadi denaturasi protein untuk mengubah struktur protein multimer menjadi monomer sehingga protein membentuk rantai garis lurus yang akan terlihat seperti pita/band. Proses elektroforesis digunakan *mini slab gel* 12,5% dan *stacking gel* 4%. Pewarna yang digunakan untuk proses pewarnaan gel atau *staining* ialah *Coomassie Brilliant Biru* dan digunakan *pre stained broad range* sebagai protein marker. Waktu yang diperlukan

untuk *running* elektroforesis menggunakan SDS-PAGE ialah 90 menit dengan arus 400 mA dan voltase 120 mV (Laemli, 1970 dalam Mufida dkk 2018).

3.6.5 Pemurnian protein pili *S. pneumoniae* 54 kDa

Protein pili 54 kDa dimurnikan dengan elektroelusi. Hasil elektroforesis SDS-PAGE menunjukkan pita-pita protein *S. pneumoniae*. Gel hasil SDS-PAGE dipotong lurus pada berat molekul yang diinginkan. Potongan pita dikumpulkan lalu dimasukkan dalam *dialysis tube* yang berisi *buffer sample*. Kemudian dilakukan elektroelusi menggunakan elektroforesis frontal apparatus yang berisi *buffer sample* pada tegangan 125 mV selama 25 menit. Hasil elektroforesis tersebut kemudian dilakukan dialisis dengan cara memindahkan *dialysis tube* ke dalam *beaker glass* yang berisi 1 liter PBS steril pH 7,4 dan diberi *magnetic stirrer* lalu diletakan dalam *refrigerator* selama 2 x 24 jam. PBS diganti sebanyak 2 kali selama proses dialisis (Ehara dkk., 1987).

3.6.6 Isolasi Sel Paru Mencit

Isolasi sel paru mencit dilakukan berdasarkan metode Wiesser. Dilakukan anestesi pada mencit menggunakan kloroform, kemudian diambil bagian paru-parunya dengan cara dipotong dan dibuka. Paru mencit dicuci dengan cairan PBS pH 7,4 yang mengandung 1mM dithiotheriol (DTT) pada suhu 4°C hingga bersih. Setelah itu, paru dimasukkan ke dalam cairan yang berisi 1,55 mM KCl; 9,6 mM NaCl; 8 mM KH₂SO₄; 27 mM Na Citrate dan 5,6 mM Na₂HPO₄ dengan pH 7,4, lalu jaringan paru tersebut diinkubasi pada *shaking incubator* selama 15 menit, dengan suhu 37°C. Supernatan yang dihasilkan kemudian dibuang dan jaringan yang mengendap dipindahkan ke dalam cairan PBS pH 7,4 yang mengandung 1,5 mM EDTA dan 0,5 mM DTT. Jaringan tersebut digoyang kuat pada *shaking waterbath* selama 15 menit pada suhu 37°C, kemudian supernatan dibuang. Jaringan dicuci dengan PBS dan disentrifugasi selama 5 menit

dengan kecepatan 1000 rpm, dan diulang sebanyak tiga kali. Setelah dicuci sebanyak tiga kali, endapan hasil sentrifugasi ditambahkan dengan PBS steril. Sel paru ini siap untuk dilakukan uji adhesi (Nagayama dkk, 1995).

3.6.7 Uji Adhesi

Uji adhesi dilakukan sesuai modifikasi Nagayama dkk. (1995) yang dimulai dengan mengkultur bakteri *S. pneumoniae* pada media *Blood Agar Plate* (BAP) dengan suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri yang sudah dikultur kemudian dipanen dan ditambah PBS sampai kekeruhan mencapai standart *McFarland*. Selanjutnya dilakukan preparasi konsentrasi bertingkat protein pili dan ditambahkan PBS sebagai pelarut. Pada setiap konsentrasi protein pili diberikan suspensi sel paru 300 µl dan dicampur perlahan pada *shaking waterbath* selama 30 menit dengan suhu 37°C. Pada setiap campuran antara protein pili dan suspensi sel paru tersebut ditambahkan suspensi bakteri sebanyak 300 µl dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit menggunakan *shaking incubator*. Penambahan suspensi bakteri dimaksudkan agar bisa diketahui bahwa protein pili benar mampu menempel pada sel inang Hal tersebut dikarenakan apabila hanya protein pili yang digunakan maka tidak bisa divisualisasi karena protein tidak bisa terlihat dan tidak bisa diberi pewarnaan Gram. Suspensi bakteri bisa diberikan pewarnaan Gram sehingga bisa dihitung berapa banyak bakteri yang menempel pada sel inang. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm pada suhu 4°C selama 3 menit. Endapan hasil sentrifugasi dicuci dua kali dengan cairan PBS. Kemudian endapan diambil dan dibuat hapusan pada *object glass* dan diwarnai menggunakan pewarnaan Gram. Preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali, kemudian menghitung secara manual jumlah bakteri yang menempel pada 100 sel paru. Indeks adhesi yaitu jumlah rerata bakteri yang menempel pada sel paru, dihitung untuk setiap pengamatan terhadap 100 sel paru (Nagayama dkk, 1995).

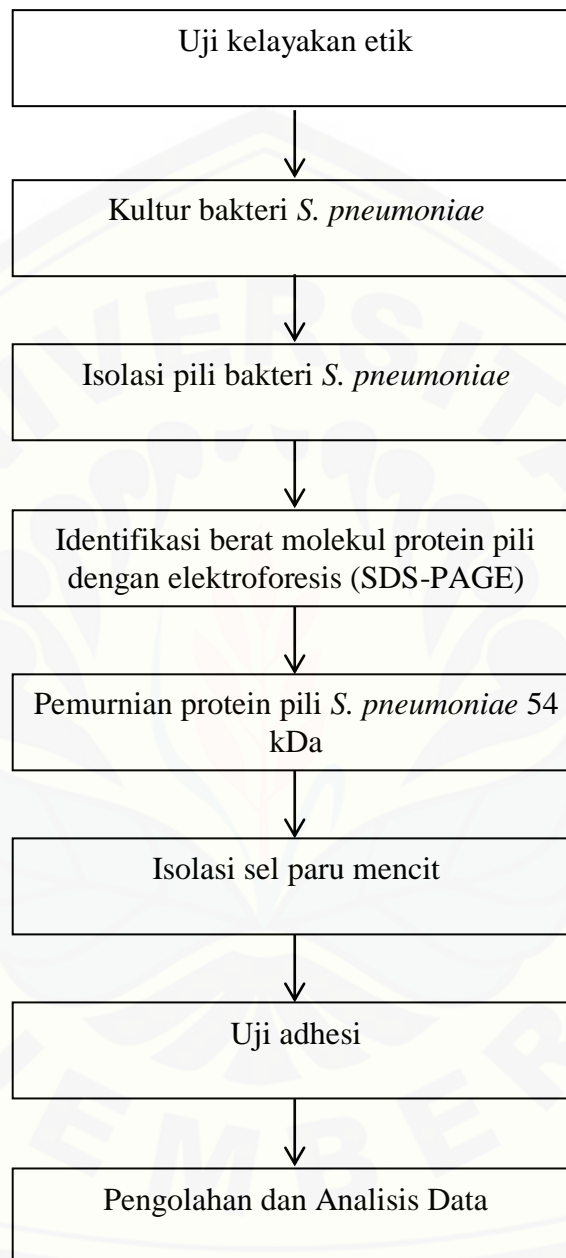
3.7 Analisis Data

Analisis data digunakan uji korelasi-regresi untuk mengetahui hubungan antara penurunan konsentrasi protein pili *S. pneumoniae* 54 kDa dengan indeks adhesi, dengan batas signifikansi 0,05 ($p < 0,05$).



3.8 Alur Penelitian

Secara sistematis alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.2



Gambar 3.1 Skema Alur Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan sebagai berikut.

1. Protein hemagglutinin pili *S. pneumoniae* 54 kDa terbukti berperan sebagai protein adhesin.
2. Penurunan konsentrasi protein pili *S. pneumoniae* 54 kDa berpengaruh terhadap indeks adhesi. Semakin rendah konsentrasi protein pili *S. pneumoniae* 54 kDa maka semakin tinggi indeks adhesinya.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan oleh peneliti dari penelitian ini ialah sebagai berikut.

1. Proses kultur bakteri dapat dilakukan lebih dari sekali agar pili yang didapatkan dari bakteri *S. pneumoniae* lebih banyak.
2. Peneliti selanjutnya dapat memanfaatkan penelitian ini sebagai dasar penelitian lebih lanjut untuk pembuatan agen pencegah penyakit infeksi karena *S. pneumoniae*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, W. 2012. Antibody Protein Hemagglutinin Subunit Pili with MW 49,8 kDa *Shigella dysenteriae* Can Inhibit *Shigella dysenteriae* Adhesion on Mice Enterocyte. *IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR)*. 2(5):13–20.
- Agustina, D. 2013. Respons imunoglobulin G terhadap protein hemagglutinin pili *Klebsiella pneumoniae* berat molekul 12,8 kDa sebagai protein adhesin. *Tesis*. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Agustina, D., S. Retoprawiro, dan N. As. 2014. Inhibition of Bacterial Adhesion on Mice Enterocyte by The Hemagglutinin Pili Protein 12,8 kDa *Klebsiella pneumoniae* Antibody. 4(1):7.
- Angelis, G., M. Moschioni, A. Muzzi, A. Pezzicoli, S. Censini, I. Delany, 2011. The *Streptococcus Pneumoniae* Pilus-1 Displays A Biphasic Expression Pattern. *PLoS ONE*. 6(6):e21269.
- Antão, E.-M., L. H. Wieler, dan C. Ewers. 2009. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic escherichia coli. *Gut Pathogens*. 1(1):22.
- Bagnoli, F., M. Moschioni, C. Donati, V. Dimitrovska, I. Ferlenghi, C. Facciotti, dkk. 2008. A Second Pilus Type in *Streptococcus Pneumoniae* is Prevalent in Emerging Serotypes and Mediates Adhesion to Host Cells. *Journal of Bacteriology*. 190(15):5480–5492.
- Barocchi, M. A., J. Ries, X. Zogaj, C. Hemsley, B. Albiger, A. Kanth, dkk. 2006. A Pneumococcal Pilus Influences Virulence and Host Inflammatory Responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(8):2857–2862.
- Basset, A., K. H. Turner, E. Boush, S. Sayeed, S. L. Dove, dan R. Malley. 2011. Expression of The Type 1 Pneumococcal Pilus is Bistable and Negatively Regulated by The Structural Component RrgA. *Infection and Immunity*. 79(8):2974–2983.
- Basset, A., F. Zhang, C. Benes, S. Sayeed, M. Herd, C. Thompson, D. T. Golenbock, A. Camilli, dan R. Malley. 2013. Toll-like receptor (TLR) 2 Mediates Inflammatory Responses to Oligomerized RrgA Pneumococcal Pilus Type 1 Protein. *Journal of Biological Chemistry*. 288(4):2665–2675.
- Bergmann, S. dan S. Hammerschmidt. 2006. Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology*. 152(2):295–303.

- Bridy-Pappas, A. E., M. B. Margolis, K. J. Center, dan D. J. Isaacman. 2005. *Streptococcus pneumoniae*: Description of the Pathogen, Disease Epidemiology, Treatment, and Prevention. *Pharmacotherapy*. 25(9):1193–1212.
- 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.
- Danne, C. dan S. Dramsi. 2012. Pili of Gram Positive Bacteria: Roles in Host Colonization. *Research in Microbiology*. 163(9–10):645–65.
- Ehara, M., M. Ishibashi, Y. Ichinose, M. Iwanaga, S. Shimotori, dan T. Naito. 1987. Purification and Partial Characterization of Fimbriae of *Vibrio Cholerae* o1. *Vaccine*. 5(4):283–288.
- Geno, K. A., G. L. Gilbert, J. Y. Song, I. C. Skovsted, K. P. Klugman, C. Jones, dkk. 2015. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clinical Microbiology Reviews*. 28(3):871–899.
- 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.
- Harfouche, C., S. Filippini, C. Gianfaldoni, P. Ruggiero, M. Moschioni, S. Maccari, dkk. 2012. RrgB321, A Fusion Protein of the Three Variants of the Pneumococcal Pilus Backbone RrgB, Is Protective *in vivo* and Elicits Opsonic Antibodies. *Infection and Immunity*. 80(1):451–460.
- Hidayati D.Y.N., 2010. Identifikasi Molekul Adhesi Pili *Pseudomonas aeruginosa* pada *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (huvecs) culture. *The Journal of Experimental Life Sciences*. 1(1):7–14.
- Hotomi, M., J. Yuasa, D. E. Briles, dan N. Yamanaka. 2016. Pneumolysin Plays A Key Role at the Initial Step of Establishing Pneumococcal Nasal Colonization. *Folia Microbiologica*. 61(5):375–383.
- Hyams, C., K. Trzcinski, E. Camberlein, D. M. Weinberger, S. Chimalapati, M. Noursadeghi, dkk. 2013. *Streptococcus Pneumoniae* Capsular Serotype Invasiveness Correlates with the Degree of Factor H Binding and Opsonization with c3b/ic3b. *Infection and Immunity*. 81(1):354–363.
- Izore, T., C. Contreras-Martel, L. El Mortaji, C. Manzano, R. Terrasse, T. Vernet, dkk. 2010. Structural Basis of Host Cell Recognition by the Pilus Adhesin from *Streptococcus Pneumoniae*. *Structure*. 18(1):106–115.

- 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., D. A. Robinson, dan L. S. McDaniel. 2016. Nonencapsulated *Streptococcus Pneumoniae*: Emergence and Pathogenesis. *MBio*. 7(2):e01792-15, /mbio/7/2/e01792-15.atom.
- Kline, K. A., S. Fälker, S. Dahlberg, S. Normark, dan B. Henriques-Normark. 2009. Bacterial Adhesins in Host Microbe interactions. *Cell Host & Microbe*. 5(6):580–592.
- LeMieux, J., S. Woody, dan A. Camilli. 2008. Roles of The Sortases of *Streptococcus pneumoniae* in Assembly of The Rlra Pilus. *Journal of Bacteriology*. 190(17):6002–6013.
- Lemon, J. K. dan J. N. Weiser. 2015. Degradation Products of the Extracellular Pathogen *Streptococcus Pneumoniae* Access the Cytosol Via its Pore-forming Toxin. *MBio*. 6(1):e02110-14.
- Lofling, J., V. Vimberg, P. Battig, dan B. Henriques-Normark. 2011. Cellular Interactions by LPXTG-anchored Pneumococcal Adhesins And Their Streptococcal Homologues: Streptococcal Adhesion and Pathogenesis. *Cellular Microbiology*. 13(2):186–197.
- Liu, L., H. L. Johnson, S. Cousens, J. Perin, S. Scott, J. E. Lawn, dkk. 2012. Global, Regional, and National Causes of Child Mortality: An Updated Systematic Analysis For 2010 With Time Trends Since 2000. *The Lancet*. 379(9832):2151–2161.
- Marshall, J. E., B. H. A. Faraj, A. R. Gingras, R. Lonnen, Md. A. Sheikh, M. El-Mezgueldi, dkk. 2015. The Crystal Structure of Pneumolysin at 2.0 Å Resolution Reveals the Molecular Packing of the Pre-pore Complex. *Scientific Reports*. 5(1):13293.
- McEldowney, S. dan M. Fletcher. 1988. Effect of pH, Temperature, and Growth Conditions on the Adhesion of A Gliding Bacterium and Three Nongliding Bacteria to Polystyrene. *Microbial Ecology*. 16(2):183–195.
- Melvin, J. A., E. V. Scheller, C. R. Noël, dan P. A. Cotter. 2015. New Insight into Filamentous Hemagglutinin Secretion Reveals A Role for Full-length Fhab in *Bordetella* Virulence. *MBio*. 6(4):e01189-15.
- Microbiology In Pictures. 2015. *Streptococcus pneumoniae* Bacteria. <https://www.microbiologyinpictures.com/streptococcus-pneumoniae.php> [Diakses pada 5 November 2019].

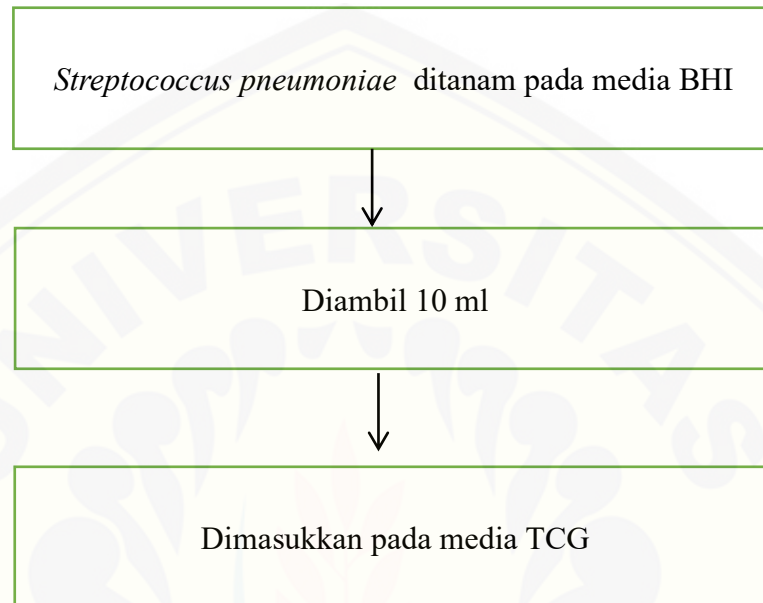
- Mitchell, A. M. dan T. J. Mitchell. 2010. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors and Variation. *Clinical Microbiology and Infection*. 16(5):411–418.
- Mitra, S., D. R. Saha, A. Pal, S. K. Niyogi, U. Mitra, dan H. Koley. 2012. Hemagglutinating Activity Is Directly Correlated with Colonization Ability of Shigellae in Suckling Mouse Model. *Canadian Journal of Microbiology*. 58(10):1159–1166.
- Mortaji, L., R. Terrasse, A. Dessen, T. Vernet, dan A. M. Di Guilmi. 2010. Stability and Assembly of Pilus Subunits of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*. 285(16):12405–12415.
- Moschioni, M., C. Donati, A. Muzzi, V. Masignani, S. Censini, W. P. Hanage, dkk. 2008. *Streptococcus pneumoniae* Contains 3 *rlra* Pilus Variants that are Clonally Related. *The Journal of Infectious Diseases*. 197(6):888–896.
- Moschioni, M., W. Pansegrau, dan M. A. Barocchi. 2010. Adhesion Determinants of the Streptococcus Species. *Microbial Biotechnology*. 3(4): 370–388.
- Mufida, D. C. dan E. Suswati. 2007. Protein Hemagglutinin 35,2 kDa Pili *Proteus mirabilis* P355 sebagai Adhesin pada Epitel Vesika Urinaria Kelinci. *Jurnal ILMU DASAR*. 8 (1) : 68-74.
- Mufida, D. C., Sumarno, dan S. Santoso. 2010. Identifikasi Protein Adhesin Pili *Proteus Mirabilis* P355 dan Protein Reseptor pada Vesika Urinaria Kelinci. *The Journal of Experimental Life Sciences*. 1(1).
- Mufida, D. C., K. Handono, S. R. 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(1)
- Munguia, J. I., L. Pulzová, K. Bhide, E. Čomor, E. Káňová, Z. Tomečková, I. Širochmanová, dan M. Bhide. 2018. Contribution of pili of *S. pneumoniae* in the onset of meningitis. *Folia Veterinaria*. 62(1):67–72.
- Nagayama, K., T. Oguchi, M. Arita, dan T. Honda. 1995. Purification and Characterization of A Cell Associated Hemagglutinin of *Vibrio Parahaemolyticus*. *INFECT. IMMUN*. 63:6.
- Nelson, A. L., J. Ries, F. Bagnoli, S. Dahlberg, S. Fälker, S. Rounioja, dkk. 2007. RrgA is A Pilus Associated Adhesin in *Streptococcus Pneumoniae*. *Molecular Microbiology*. 66(2):329–340.

- Normark, B. H., dan E. I. Tuomanen. 2013. The Pneumococcus: Epidemiology, Microbiology, and Pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 3(7):a010215–a010215.
- Pancotto, L., G. De Angelis, E. Bizzarri, M. A. Barocchi, G. D. 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(1):2040.
- Parija, S. C. 2012. *Microbiology and Immunology*. Edisi 2. Elsevier.
- Paterson, G. K. dan C. J. Orihuela. 2010. Pneumococcal Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules Targeting of the Extracellular Matrix: Pneumococcal MSCRAMMS and Virulence. *Molecular Microbiology*. 77(1):1–5.
- Paterson, N. G. dan E. N. Baker. 2011. Structure of the full-length major pilin from streptococcus pneumoniae: implications for isopeptide bond formation in gram-positive bacterial pili. *PLoS ONE*. 6(7):e22095.
- Poll, T. dan S. M. Opal. 2009. Pathogenesis, Treatment, and Prevention of Pneumococcal Pneumonia. *The Lancet*. 374(9700):1543–1556.
- Rabes, A., N. Suttorp, dan B. Opitz. 2016. *Inflammasomes in Pneumococcal Infection: Innate Immune Sensing and Bacterial Evasion Strategies*. Dalam *Inflammasome Signaling and Bacterial Infections*. Editor S. Backert. Cham: Springer International Publishing.
- Setiati, S. 2014. *Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi Keenam. Jilid 2. Jakarta: Interna Publishing
- Shak, J. R., H. P. Ludewick, K. E. Howery, F. Sakai, H. Yi, R. M. Harvey, dkk. 2013. Novel Role for the *Streptococcus Pneumoniae* Toxin Pneumolysin in the Assembly of Biofilms. *MBio*. 4(5):e00655-13.
- Siegel, S. J. dan J. N. Weiser. 2015. Mechanisms of Bacterial Colonization of the Respiratory Tract. *Annual Review of Microbiology*. 69(1):425–444.
- Simonetti AF, Viasus D, Garcia-Vidal C, Carratalà J. Management of community-acquired pneumonia in older adults. *Ther Adv Infect Dis* (2014) 2(1):3–16.
- 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*. 2013:1–18.

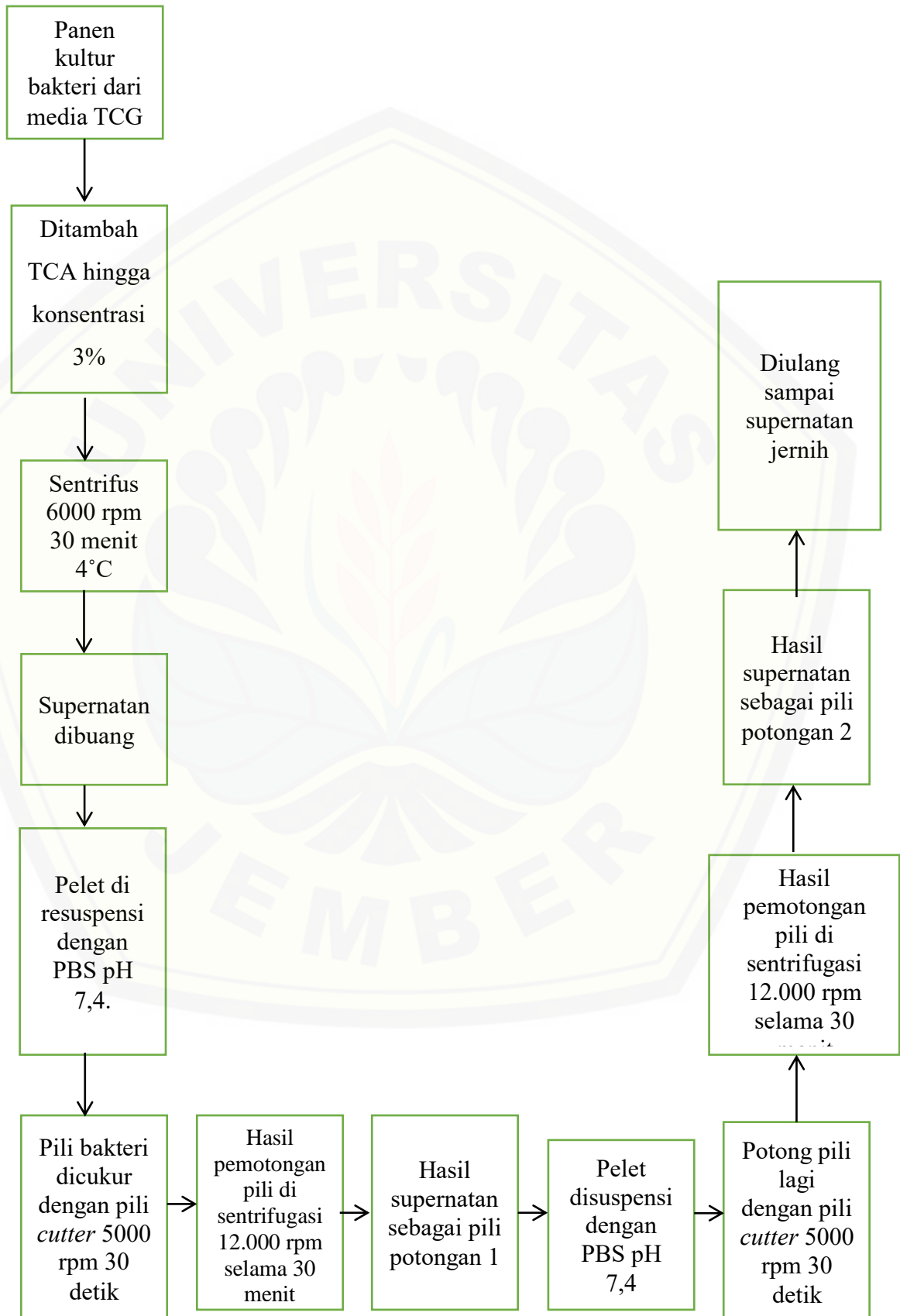
- Sumarno. 2012. Detection of Molecule Adhesion Sub Unit Pili 48 kDa Salmonella Typhi by Immunochemistry Method Using Sera Patients Suffering From Typhoid Fever. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*. 2(9): 8527-8532.
- Thanassi, D. G., J. B. Bliska, dan P. J. Christie. 2012. Surface Organelles Assembled by Secretion Systems of Gram Negative Bacteria: Diversity in Structure and Function. *FEMS Microbiology Reviews*. 36(6):1046–1082.
- United Nations Children's Fund (UNICEF). 2018. Pneumonia. <https://data.unicef.org/topic/child-health/pneumonia/> [Diakses pada 30 Desember 2019].
- Vernatter, J. dan L. Pirofski. 2013. Current Concepts in Host–microbe Interaction Leading to Pneumococcal Pneumonia. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 26(3):277–283.
- Vob, S., G. Gámez, dan S. Hammerschmidt. 2012. Impact of Pneumococcal Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules on Colonization. *Molecular Oral Microbiology*. 27(4):246–256.
- Weiser, J. N., D. M. Ferreira, dan J. C. Paton. 2018. *Streptococcus pneumoniae*: Transmission, Colonization and Invasion. *Nature Reviews Microbiology*. 16(6):355–367.
- World Health Organization. 2017. Pneumonia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia> [Diakses pada 25 Oktober 2019].
- Wunderink, R. G. dan G. W. Waterer. 2014. Community-acquired Pneumonia. *New England Journal of Medicine*. 370(6):543–551.

LAMPIRAN

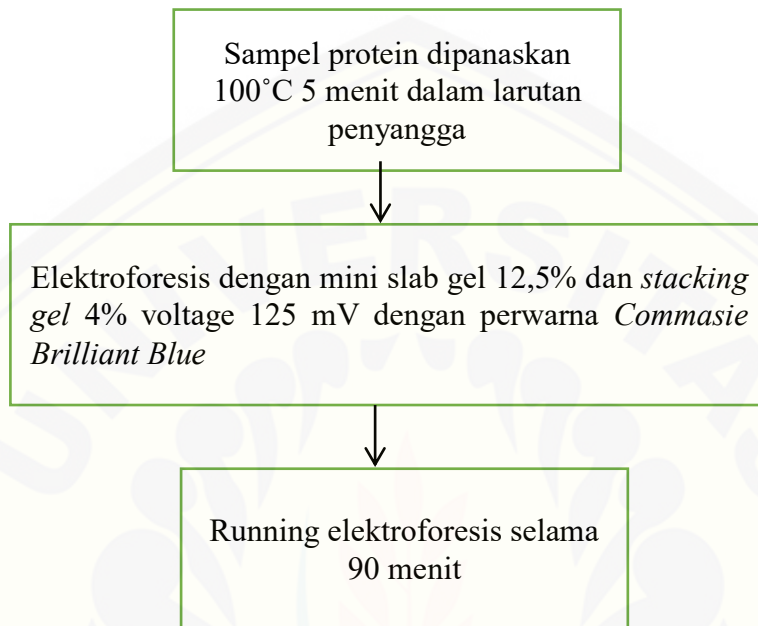
Lampiran 3.1 Prosedur Kultur *S. pneumoniae*



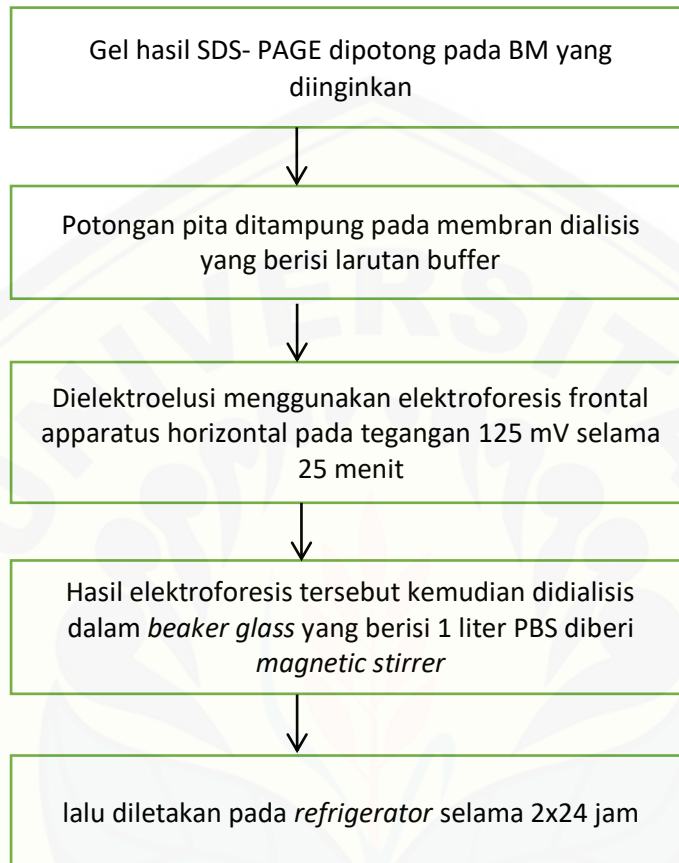
Lampiran 3.2 Prosedur Isolasi Pili



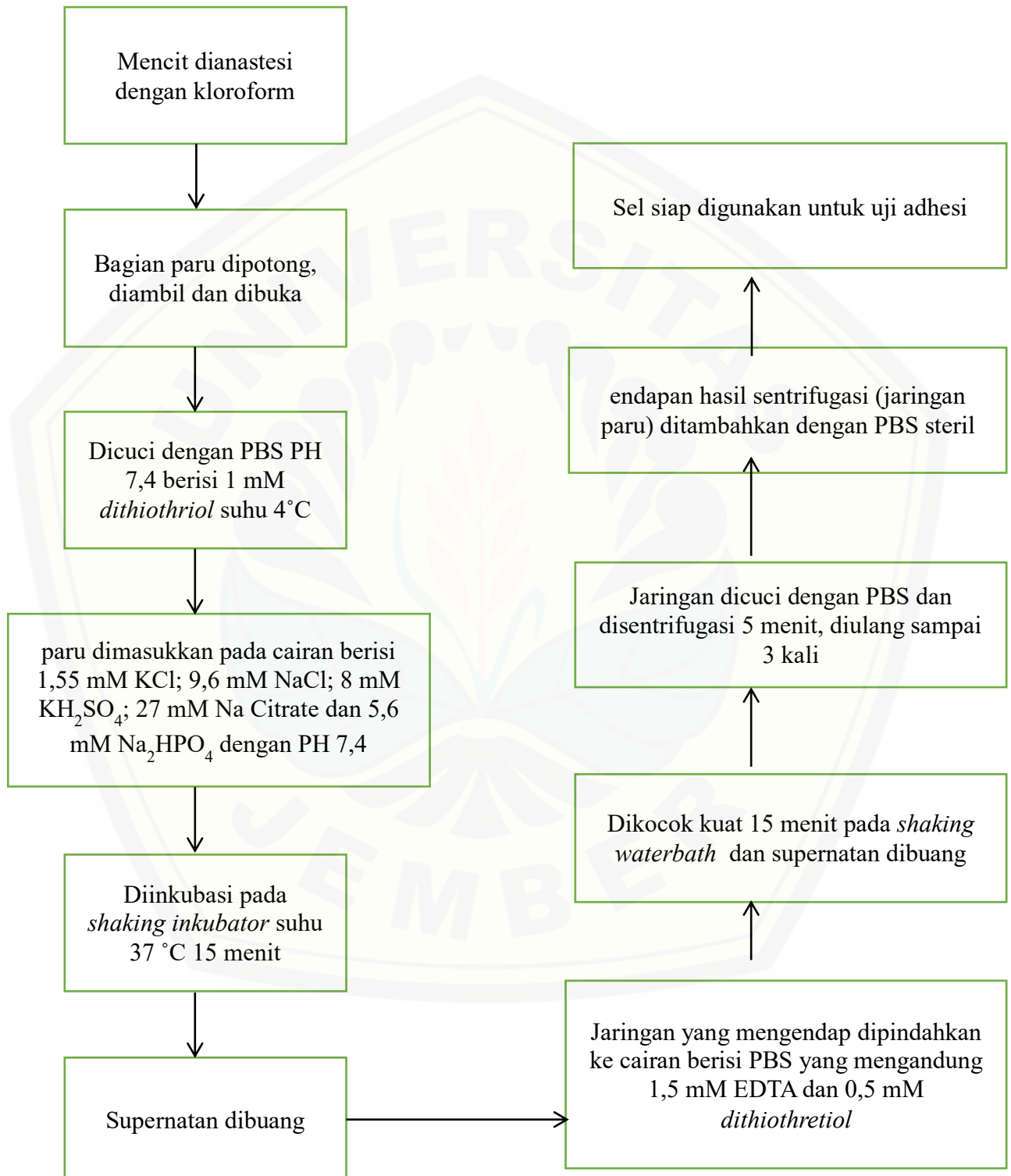
Lampiran 3.3 Prosedur Identifikasi berat molekul pili dengan elektroforesis (SDS- PAGE)



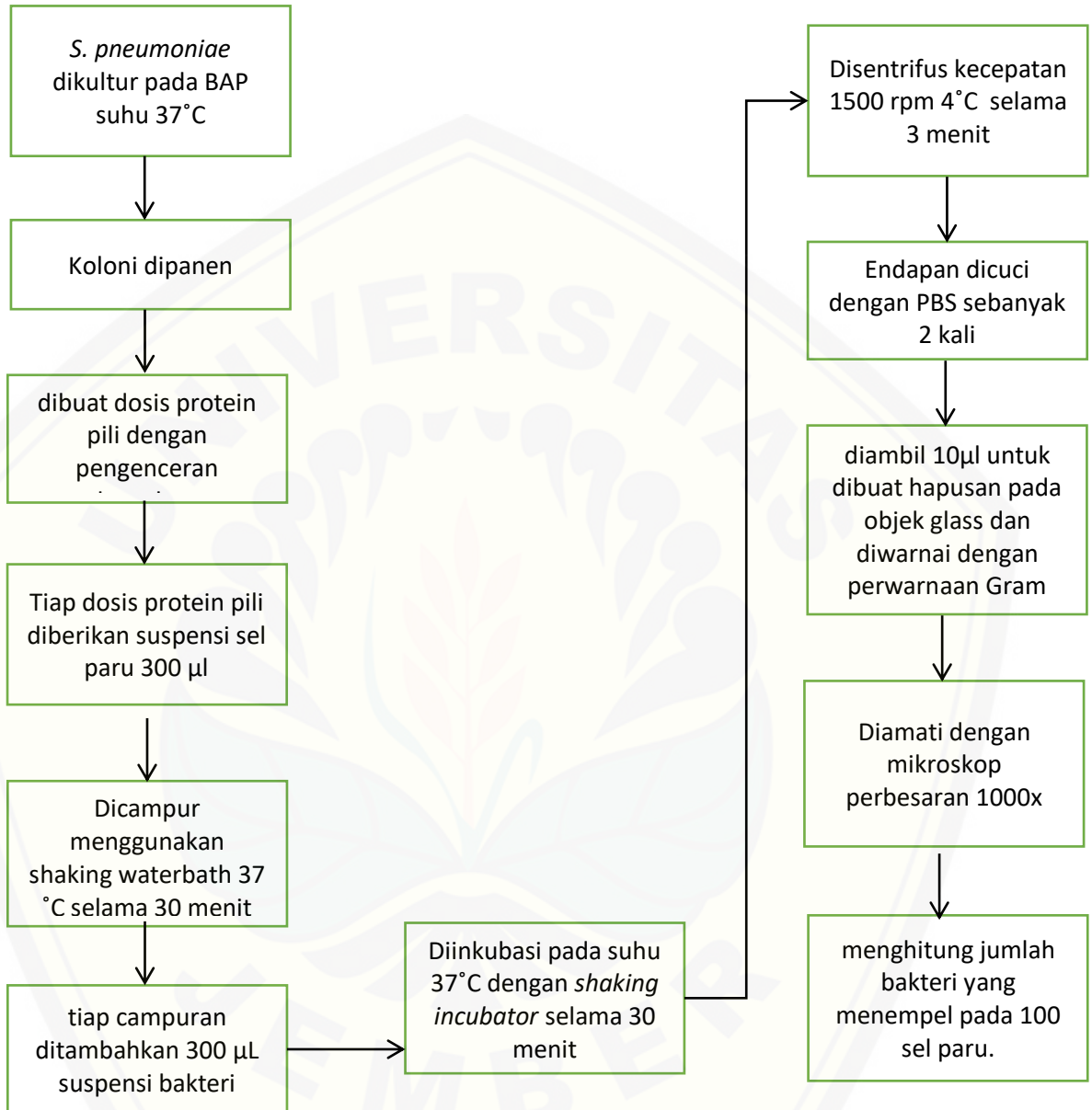
Lampiran 3.4 Prosedur Pemurnian pili dengan Metode Elektroelusi dan Dialisis



Lampiran 3.5 Prosedur Isolasi Sel Paru Mencit



Lampiran 3.6 Prosedur uji adhesi



Lampiran 3.7 Perhitungan Konsentrasi

Hasil nano drop protein pili 54 kDa= 1,226 µg/ µL

Konsentrasi yang dibutuhkan 0,3 µg/µL, 0,16 µg/µL, 0,08 µg/µL, 0,04 µg/µL, dan 0,02 µg/µL.

RUMUS :

$$\frac{M_1}{V_1} = \frac{M_2}{V_2}$$

$$\frac{1,226}{1} = \frac{100}{V_2}$$

$$V_{2_1} = 100/1,226 = 82 \mu\text{L}$$

$$V_{2_2} = 50/1,226 = 41 \mu\text{L}$$

$$V_{2_3} = 25/1,226 = 20,5 \mu\text{L}$$

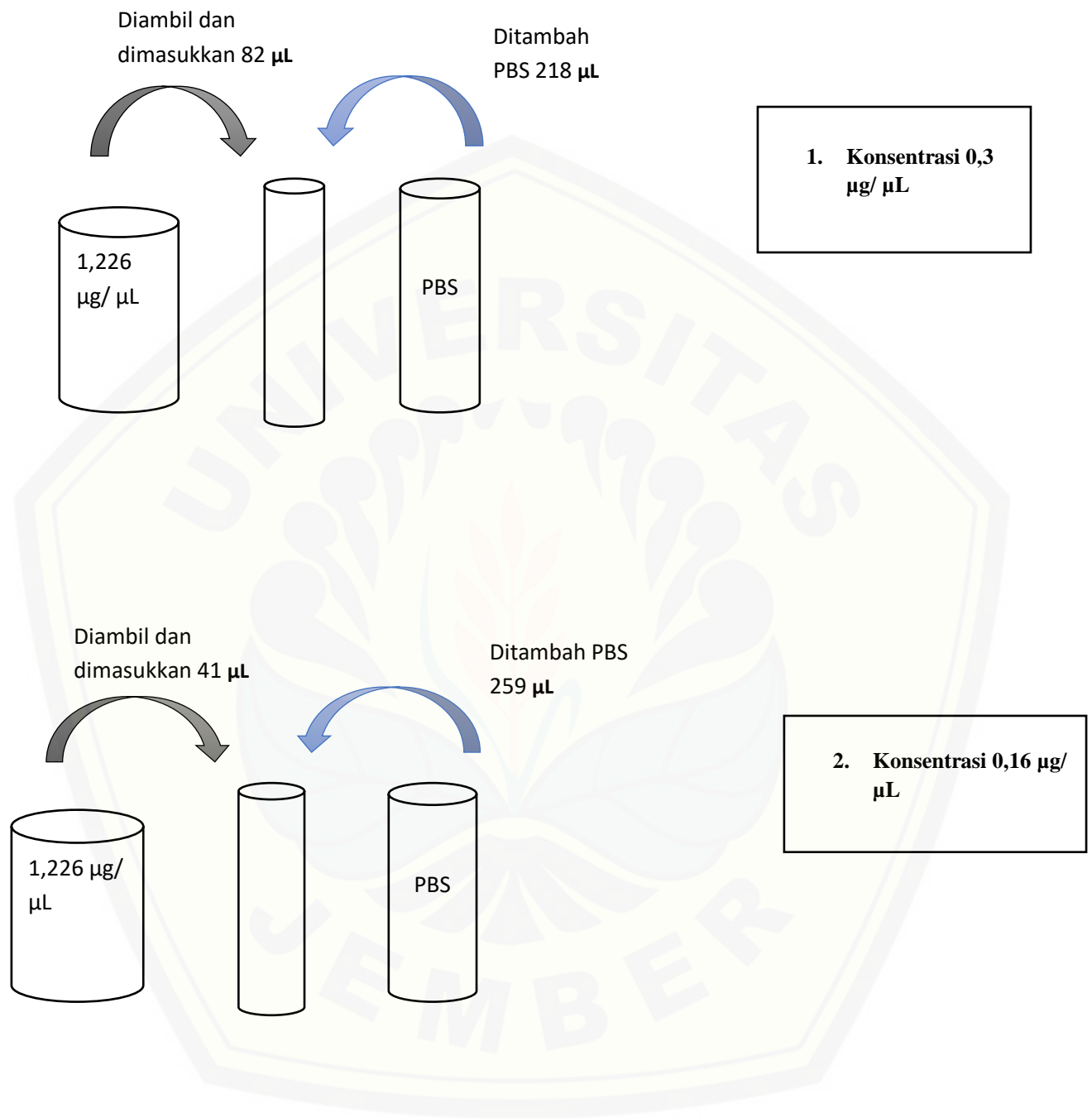
$$V_{2_4} = 12,5/1,226 = 10,3 \mu\text{L}$$

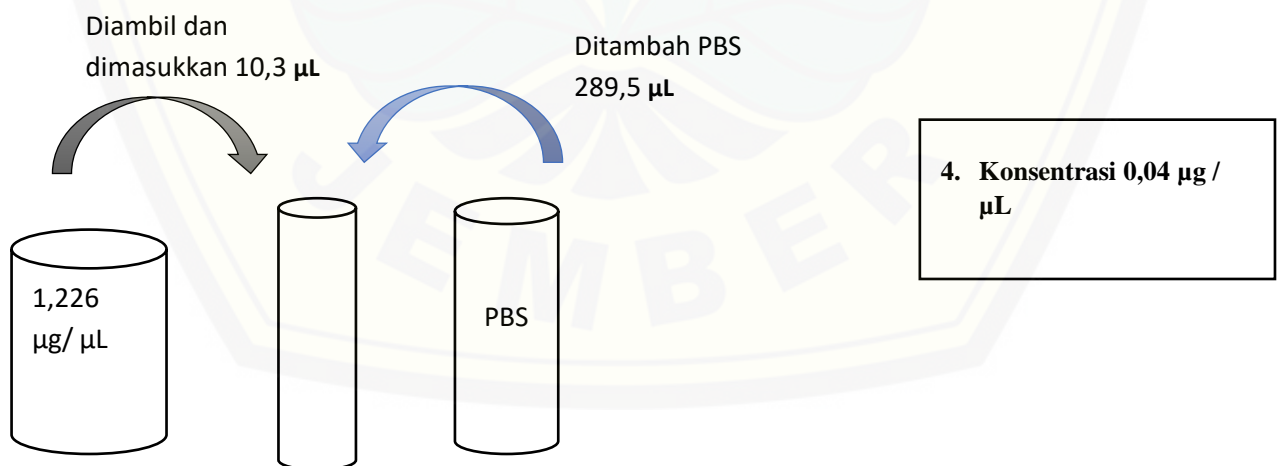
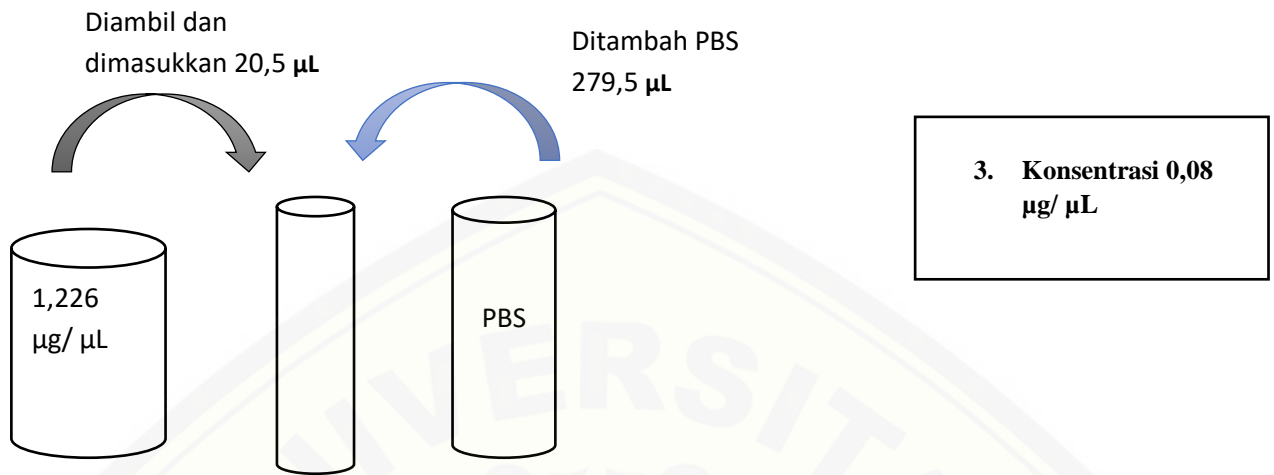
$$V_{2_5} = 6,25/1,226 = 5,2 \mu\text{L}$$

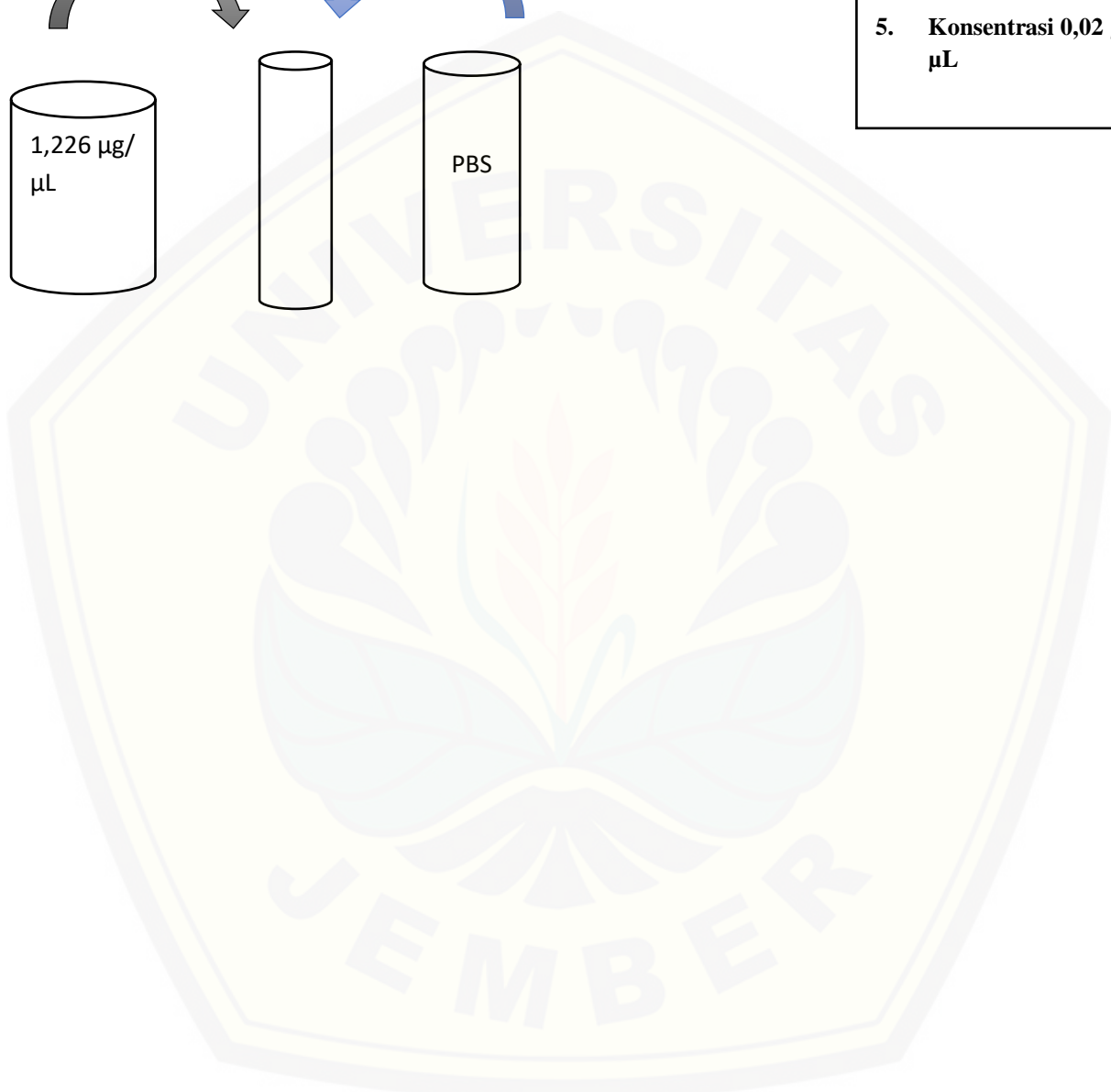
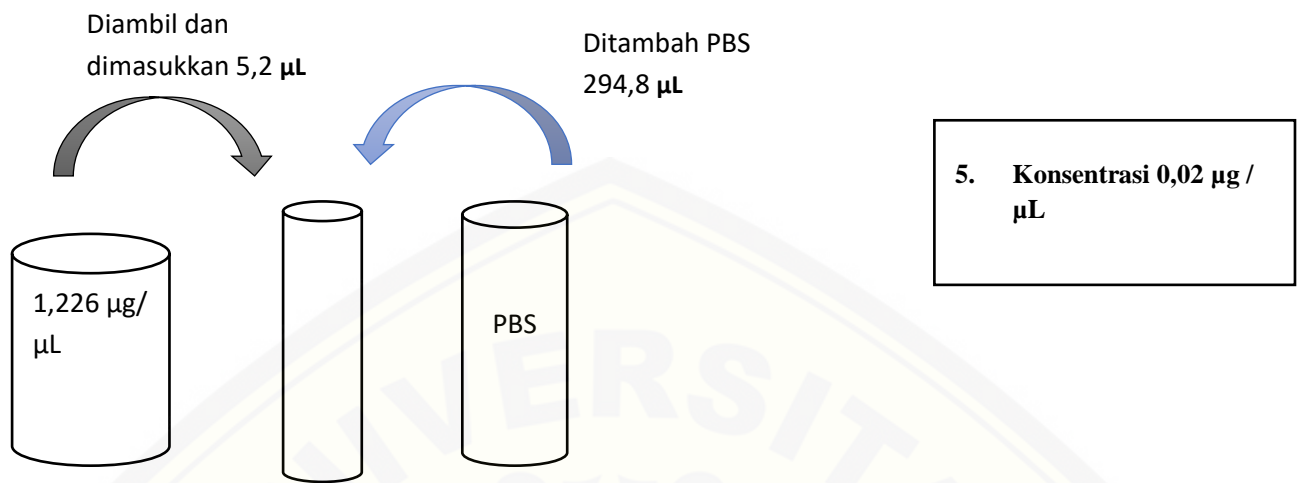
Keterangan:

M₂= konsentrasi protein pili yang akan dibuat

V₂= volume yang diambil dari hasil nano drop protein pili







Lampiran 3.8 Penggunaan Alat Pelindung Diri (APD)

Penelitian ini menggunakan Alat pelindung diri (APD) berikut ini :

- a. *Disposable face mask*
- b. Masker N95 sekali pakai
- c. *Handsoon nitril cobalt blue*
- d. Jas laboratorium

Penelitian ini menggunakan alat-alat laboratorium yang mencegah penyebaran bakteri seperti:

- a. Laminar, sebelum pemakaian laminar, sinar UV yang berada didalam laminar dihidupkan terlebih dahulu selama 30 menit. Seluruh prosedur penelitian dilakukan di dalam laminar untuk mencegah penyebaran bakteri di ruang laboratorium.
- b. Bunsen, digunakan untuk memastikan terhindarnya penyebaran bakteri selama penelitian.

Lampiran 3.9 Tata Cara Pembuangan Limbah Mikrobiologi

Pembuangan limbah mikrobiologi baik media cair maupun agar yang telah terkontaminasi dan ditumbuhi bakteri akan dilakukan sebagai berikut:

- a. Media padat maupun cair yang telah ditanam bakteri dan tidak terpakai akan di *autoclave* selama 1 jam
- b. Media tersebut dimasukkan kaleng aluminium untuk mencegah perembesan
- c. Dilakukan penggalian tanah dan kaleng yang berisi media dimasukkan ke dalam tanah tersebut sampai dapat menutupi kaleng
- d. Kemudian bagian dalam kaleng dibakar sampai mengering dan ditutup
- e. Kaleng tersebut dikubur dengan tanah. Penguburan dilakukan di tanah kosong bagian belakang Laboratorium Mikrobiologi FK UNEJ untuk menghindari pemukiman masyarakat
- f. Sedangkan barang-barang laboratorium yang telah terpakai untuk media diguyur dengan klorin serta dicuci dengan sabun kemudian dilakukan sterilisasi kering pada suhu 170°C selama 1 jam.

Pembuangan limbah alat pelindung diri seperti *disposable face mask*, masker N95 sekali pakai, dan *handscoon nitril cobalt blue* mengikuti prosedur Laboratorium Mikrobiologi FK UNEJ, peneliti menampung pada tas kresek khusus kemudian setiap hari petugas bagian umum dan perlengkapan FK UNEJ akan mengambil sampah tersebut untuk selanjutnya di proses dengan menggunakan insinerator.

Lampiran 3.10 Keterangan Bebas Plagiasi



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN

Alamat : Jalan Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto. Kotak Pos Jember 68121
Telp/Fax. (0331) 337877, 324446, *Faksimili (0331) 337877
E mail : fk@unej.ac.id/Laman//www.fk.unej.ac.id

Nomor : 3086 /UN25.1.11/PT/2019
Lampiran : -
Perihal : **Rekomendasi Permohonan Uji Turnitin/
Persetujuan Bebas Plagiasi Skripsi**

10 DEC 2019

Yth. Ketua
Komisi Karya Tulis Ilmiah
Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Jember

Dengan hormat,

Dalam rangka penyusunan skripsi mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember di bawah ini:

Nama : Adellia Fira Fa'idha
NIM. : 162010101048
Angkatan : 2016

Judul Skripsi : **Peran Protein Hemagglutinin Pili Streptococcus pneumonie 54 kDa
Ssebagai Adhesin**

Bersama ini kami merekomendasikan permohonan Bebas Plagiasi penelitian kesehatan.

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




Mengetahui,
Wakil Dekan I

Dr. Ancah Caesarina Novi M. Ph.D
NIP. 19820309 200812 2 002

Komisi Bimbingan Skripsi & Ilmiah
Ketua,

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

Lampiran 3.11 Etik Keris Mikrobiologi



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 3.12 Etik Penelitian



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 : 1.332 /H25.1.11/KE/2019

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

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

PERAN PROTEIN HEMAGLUTININ PILI *Streptococcus pneumoniae* 54 kDa SEBAGAI ADHESIN

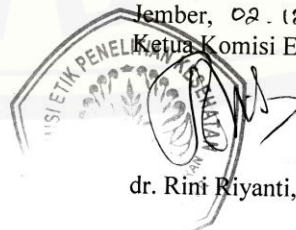
Nama Peneliti Utama : Adellia Fira Fa'idha
Name of the principal investigator

NIM : 162010101048

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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

Jember, 02.12.2019
Ketua Komisi Etik Penelitian



dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Lampiran 4.1 Hasil Analisis Data

1. Hasil Uji Normalitas

Tests of Normality

	konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
indeks adhesi	100 µg / 300µl	.288	3	.	.928	3	.482
	50 µg / 300µl	.243	3	.	.973	3	.682
	25 µg / 300 µl	.211	3	.	.991	3	.817
	12,5 µg/ 300 µl	.308	3	.	.902	3	.391
	6,25 µg / 300 µl	.280	3	.	.937	3	.516
	kontrol	.262	3	.	.957	3	.600

a. Lilliefors Significance Correction

2. Hasil Uji Korelasi *Pearson*

Correlations

		konsentrasi	indeks adhesi
konsentrasi	Pearson Correlation	1	-.840*
	Sig. (2-tailed)		.036
	N	6	6
indeks adhesi	Pearson Correlation	-.840*	1
	Sig. (2-tailed)	.036	
	N	6	6

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

3. Hasil Estimasi Analisis Data Regresi

Equation	R square	Constant	b1	b2
Linear	0,706	577,135	-566,987	
Quadratic	0,958	619,912	-1827,999	3759,300
Cubic	0,997	638,374	-3069,791	15302,235
Compound	0,747	575,587	0,328	
Growth	0,747	6,355	-1,116	
Exponential	0,747	575,587	-1,116	
Logistic	0,747	0,002	3,052	

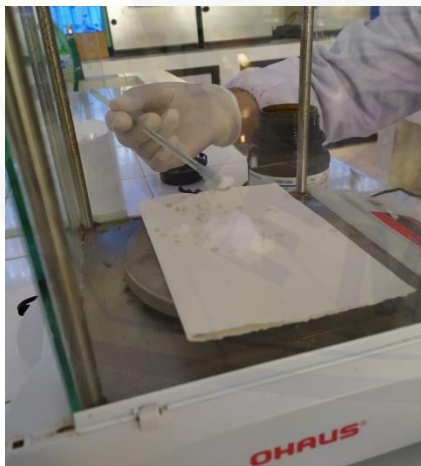
Lampiran 4.2 Dokumentasi Penelitian



Kultur bakteri *S. pneumoniae* pada media BHI



Kultur bakteri *S. pneumoniae* pada media TCG



Penambahan TCA pada bakteri yang telah dipanen



Pemotongan pili menggunakan *pili cutter*



Proses elektroforesis menggunakan SDS-PAGE



Isolasi sel paru mencit