KARAKTERISASI PROTEIN BIOFILM BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN PRODUKSI ANTIBODI POLIKLONAL PADA MENCIT (*Mus musculus*)

TESIS

Untuk Memenuhi PersyaratanMemperoleh
Gelar Magister Ilmu Biomedik

Oleh:
INDRA TAUFIK SAHLI
NIM : 156070100111001

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
MINAT MIKROBIOLOGI, IMUNOLOGI DAN PARASITOLOGI

PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

TESIS

KARAKTERISASI PROTEIN BIOFILM BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN PRODUKSI ANTIBODI POLIKLONAL PADA MENCIT (*Mus musculus*)

Oleh :
Indra Taufik Sahli
NIM. 156070100111001

Dipertahankan di depan penguji
Pada Tanggal : 06 Desember 2018
Dan dinyatakan memenuhi syarat

Komisi Pembimbing,

Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM., Sp.MK (K)	**Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes**
Ketua	**Anggota**

Penguji,

Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt	**Drs. Sofy Permana, M.Sc., D.Sc**
Penguji 1	**Penguji 2**

Malang,06 Desember 2018
Universitas Brawijaya
Dekan

Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes
NIP. 195804141987012001

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah di ajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia TESIS ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 06 Desember 2018
Mahasiswa,

Nama : Indra Taufik Sahli
NIM : 156070100111001
PS : Ilmu Biomedik
Pro. : Pascasarjana
Fak. : Kedokteran UB

IDENTITAS TIM PENGUJI

JUDUL TESIS :

KARAKTERISASI PROTEIN BIOFILM BAKTERI *Staphylococcus aureus*DAN PRODUKSI ANTIBODI POLIKLONAL PADA MENCIT (*Mus musculus*)

Nama Mahasiswa : Indra Taufik Sahli

NIM :156070100111001

Program Studi : Ilmu Biomedik

Minat : Mikrobiologi, Imunologi dan Parasitologi

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM., Sp.MK(K)

Anggota : Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes

KOMISI PENGUJI

Penguji I : Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt

Penguji II : Drs. Sofy Permana, M.Sc., D.Sc

TIM MONITORING EVALUASI

Monev : Dr. dr. Endang Sri Wahyuni, MS

Tanggal Ujian : 06 Desember 2018

SK Penguji : 266 / SK/UN10.7/2016

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Repository Universitas Brawijaya

RINGKASAN

Indra Taufik Sahli, NIM 156070100111001. Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Karakterisasi Protein Biofilm Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan Produksi Antibodi Poliklonal Pada Mencit (*Mus musculus*). Komisi pembimbing: Sumarno dan Umi Kalsum.

Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan penyebab infeksi nosokomial. Bakteri ini patogen pada manusia karena mempunyai faktor virulensi seperti biofilm, *Panton Valentine Leucocidine* (PVL) dan beberapa enzim (protease, lipase, dan elastase), yang memungkinkan untuk menghancurkan jaringan hospes dan metastase ke tempat lainnya (Buyukcangaz *et al.*, 2014). Biofilm bakteri merupakan bentuk struktural dari sekumpulan mikroorganisme yang dilindungi oleh matriks ekstraseluler yang disebut *Extracelluler Polymeric Substance* (EPS), dimana EPS merupakan produk yang dihasilkan oleh mikroorganisme itu sendiri dan dapat melindungi dari pengaruh lingkungan yang buruk (Prakash *et al.*, 2003). EPS biofilm *Staphylococcus* terdiri dari *Polysaccharide Intercellular Adhesin(PIA),* ekstraseluler-DNA, protein, *amiloid fibrils*dan polisakarida (Boles and Horswill, 2011; Arciola *et al.,* 2015).Bakteri dalam biofilm dapat menahan antibiotik pada konsentrasi hingga 1000 kali lebih tinggi dari pada bakteri yang sama dalam keadaan planktonik (Arciola *et al.,* 2015).

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi laboratorium. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakterisasi Protein Biofilm bakteri *S. aureus* berdasarkan berat molekul, protein hemaglutinin dan melihat respon antibodi poliklonal terhadap antigen Protein Biofilm dari bakteri *S. aureus.*Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri strain *S. aureus* yang di peroleh dari laboratorium RSUD Saiful Anwar Malang.Tahapan penelitian ini mulai dari identifikasi bakteri *S. aureus* yang menghasilkan biofilm, selanjutnya dilakukan identifikasi profil Protein Biofilm menggunakan SDS-PAGE. Kemudian dilakukan uji hemaglutinasi, selanjutnya dilakukan imunisasi pada mencit untuk mendapatkan antibodi poliklonal. Antibodi poliklonal yang diperoleh dari serum di gunakan untuk uji hambatan hemaglutinasi, uji *dot blot* dan uji *western blotting.*

Hasil penelitian profil Protein Biofilm menggunakan SDS-PAGE mempunyai berat molekul 35 kDa, 22,4 kDa dan 17 kDa. Ketiga protein tersebut dilakukan uji hemaglutinasi untuk mendapatkan protein hemaglutinin. Protein Biofilm 35 kDaterjadi aglutinasi pada titer 1/2, Protein Biofilm 22,4 kDanampak aglutinasi pada titer 1/4, Protein Biofilm 17,2 kDa mengalami aglutinasi pada titer 1/2. Sedangkan pada *crude* Protein Biofilm terjadi aglutinasi pada titer 1/8. Protein 22,4 kDa di pilih untuk menghasilkan antibodi poliklonal pada mencit karena mempunyai titer tertinggi dibandingkan dengan Protein Biofilm yang di purifikasi (35 kDa, 22,4 kDa dan 17,2 kDa). Hasil uji hambatan hemaglutinasi Protein Biofilm bakteri *S. aureus* menunjukan bahwa antibodi poliklonal yang terbentuk mampu menghambat hemaglutinasi Eritrosit mencit dengan titer 1/4. Uji *check board* digunakan untuk melihat efektifitas terjadinya reaksi antara antigen antibodi. Hasil uji *check board* menunjukan reaksi terkuat terlihat pada pengenceran 1/640 untuk antigen dan 1/300 untuk antibodi. Titer pengenceran antibodi tersebut yang digunakan sebagai dasar untuk melakukan uji *western blotting*. Hasil *uji western blotting* menunjukan bahwa antibodi poliklonal 22,4 kDa*S. aureus* dapat merespon antigen Protein Biofilm dari bakteri *S. aureus*yang mempunyai berat molekul 120 kDa, 63kDa, 48 kDa, 30 kDa dan 22,4 kDa.

Repository Universitas Brawijaya

SUMMARY

Indra Taufik Sahli, NIM 156070100111001. Master Program in Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Brawijaya University Malang. The Characterization of Bacterial Biofilm Protein of *Staphylococcus aureus* and Production of Polyclonal Antibodies in Mice (*Mus musculus*). Advisory Commission: Sumarno and Umi Kalsum.

Staphylococcus aureus is bacteria which causes nosocomial infections. The pathogenicity of these bacteria in humans is caused by the virulence factors such as biofilms, Valentine's Panton Leucocidine (PVL) and several enzymes (protease, lipase and elastase), which make it possible to destroy host and metastatic tissue elsewhere (Buyukcangaz *et al*., 2014). Bacterial biofilm is a structural form of a group of microorganisms protected by an extracellular matrix called Extracellular Polymeric Substance (EPS), the EPS is a product produced by microorganisms to protect themselves from adverse environmental influences (Prakash *et al*., 2003). Staphylococcus EPS biofilm consists of Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA), extracellular-DNA, protein, amyloid fibrils and polysaccharides (Boles and Horswill, 2011; Arciola *et al*., 2015). Bacteria in biofilms can hold antibiotics at concentrations up to 1000 times higher than the same bacteria in planktonic conditions (Arciola *et al*., 2015).

This study was a laboratory exploration research. The of this study was to determine the profile of Biofilm Protein *S. aureus* bacteria based on molecular weight, hemagglutinin protein and to obtain the polyclonal antibody responses to Biofilm Protein antigens from *S. aureus*. The sample used in this study was *S. aureus* strain bacteria were obtained from the laboratory of Saiful Anwar General Hospital Malang. The identification of *S. aureus* bacteria that produced biofilms was performed prior to the Biofilm Protein profiling. Biofilm Protein characterization was performed using SDS-PAGE tecnique. The Biofilm Protein was then used for the hemagglutination test, and to immunized the mice to obtain polyclonal antibodies in for hemagglutination inhibition testing, dot blot test and western blotting test.

In this study the Biofilm Protein profile was shown as three proteins with molecular weights 35 kDa, 22.4 kDa and 17 kDa. These three proteins were proceeded to hemagglutination test to obtain hemagglutinin protein. The 35 kDa Biofilm Protein agglutination occurs in 1/2 titer, the 22,4 kDa Biofilm Protein 22.4 kDa appears to be agglutinated in 1/4 titer, while as the 17,2 kDa Biofilm Protein was agglutinated in 1/2 titer. The crude of Biofilm Protein was agglutinated in 1/8 titers. The 22.4 kDa protein was chosen to produce polyclonal antibodies in mice since it had the highest titer compared to purified Biofilm Proteins (35 kDa, 22.4 kDa and 17.2 kDa). Hemagglutination Protein barriers in Biofilm *S. aureus* showed that polyclonal antibodies formed were able to inhibit hemagglutination of erythrocytes in mice with 1/4 titer. Check board test was used to see the effectiveness of the reaction between antibody antigens. Check board test results showed the strongest reaction was occured in dilution 1/640 for antigens and 1/300 for antibodies. The antibody dilution titers were used as the basis for conducting western blotting tests. The western blotting test showed that polyclonal antibodies of 22.4 kDa*S. aureus* responded to biofilm protein antigens from *S. aureus* which had a molecular weight of 120 kDa, 63 kDa, 48 kDa, 30 kDa and 22.4 kDa.

HALAMAN PERSEMBAHAN

"……فَإِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا……"

Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan
(QS Ash Syarh, Surat ke 94 Ayat ke 5)

Kupersembahkan karya kecil inikepada
Almamaterku
Kedua orang tuaku
Alm AyahandaSahlan dan Ibunda Sri Nurhayati,

Dan buat istriku tercinta Eva Fitriana, S.Si
putriku tersayang Azzahra Vandrastea Syafira
dan Naywa Kesia Auliya
atas segala pengertian, pengorbanan, dan kesabaran sampai
pendidikan ini selesai.

21Agustus 2018

Indra Taufik Sahli

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji dan syukur kami panjatkan ke hadirat Allah *SWT*, Tuhan Yang Maha Mengetahui, Sang pemilik segala ilmu, yang memberikan limpahan rahmat dan petunjukNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis yang berjudul "Karakterisasi Protein Biofilm Bakteri *Staphylococcus aureus*Dan Produksi Antibodi Poliklonal Pada Mencit (*Mus musculus*)". Penulisan tesis ini merupakan prasyarat dalam menyelesaikan Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Sungguh banyak kendala yang penulis hadapi dalam penyusunan tesis ini, namun berkat bantuan dan dukungan berbagai pihak, akhirnya penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan kepada:

1. Rektor Universitas Brawijaya Malang beserta jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedoktersan Universitas Brawijaya Malang.
2. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang beserta seluruh staf.
3. dr. Hidayat Sujuti, Sp.M., Ph.D selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang beserta seluruh staf atas bimbingan serta asuhannya selama penulis menjalani pendidikan.
4. Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM., Sp.MK (K) sebagai pembimbing pertama yang telah banyak membantu untuk meluangkan waktu, pemikiran, memberikan arahan dan bimbingan dalam menyelesaikan tesis ini.

Repository Universitas Brawijaya
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
REPOSITORY.UB.AC.ID

5. Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes sebagai pembimbing kedua yang telah banyak membantu memberikan saran, bimbingan dan motivasi dalam menyelesaikan tesis ini.
6. Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt sebagai penguji pertama yang telah banyak membantu memberikan masukan dan saran dalam menyelesaikan tesis ini.
7. Drs. Sofy Permana, M.Sc., D.Sc sebagai penguji kedua yang telah banyak membantu memberikan masukan dan saran dalam menyelesaikan tesis ini.
8. Dr. Isak J.H. Tukayo, SKp., M.Sc, selaku Direktur Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Jayapura yang telah memberikan ijin kepada penulis untuk mengikuti tugas belajar di Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
9. Dr. Yohana Sorontou, M.Kes, selaku Ketua Jurusan Teknologi Laboratorium Medik Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Jayapura yang telah memberikan ijin kepada penulis untuk mengikuti tugas belajar di Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
10. Dosen-dosen Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang memberikan bimbingan dan ilmu selama menjalani pendidikan di Universitas Brawijaya Malang.
11. Kepala Laboratorium Farmakologi, Kepala Laboratorium Mikrobiologi dan Kepala Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang beserta seluruh staf laboratorium yang telah membantu dalam menyelesaikan penelitian ini.
12. Seluruh rekan-rekan Mahasiswa Program Studi Magister Ilmu Biomedik khususnya kelas reguler atas kerjasama yang baik selama menjalani pendidikan.

13. Kepada keluargaku Almarhum Ayahanda Sahlan dan Ibunda Sri Nurhayati yang sudah mendidik, membesarkan dan selalu mendo'akan sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan Program Magister Ilmu Biomedik ini. Demikian juga kepada mertua saya Bapak Solihin dan Ibu Munasri Budiarti, S.Pd yang telah banyak memberikan bantuan baik moril maupun materilselama saya mengikuti pendidikan hingga akhirnya dapat menyelesaikan pendidikan.
14. Buat istriku tercinta Eva Fitriana, S.Si dan kedua anakku tersayang Azzahra Vandrastea Syafira dan Najwa Kesia Auliya yang selalu setia memberikan dukungan, pengorbanan hingga akhirnya saya dapat menyelesaikan pendidikan.
15. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu baik moril maupun materil selama mengikuti pendidikan di Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari sepenuhnya ataskekurangan dan keterbatasan dalam penyusunan tesis ini, untuk itu semua saran dan kritik yang sifatnya membangun demi penyempurnaan akan penulis terima dengansegala kerendahan hati.Akhirnya semoga tesis ini bermanfaat untuk kemajuan dan pengembangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang Mikrobiologi. Amin.

Malang, 21 Agustus2018

Penulis

Repository Universitas Brawijaya
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
REPOSITORY.UB.AC.ID

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL i
HALAMAN PENGESAHAN ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS iii
IDENTITAS TIM PENGUJI iv
RINGKASAN v
SUMMARY vi
HALAMAN PERSEMBAHAN vii
KATA PENGANTAR viii
DAFTAR ISI xi
DAFTAR TABEL xv
DAFTAR GAMBAR xvi
DAFTAR LAMPIRAN xvii
DAFTAR SINGKATAN xviii
BAB I PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 4
1.3 Tujuan Penelitian 4
1.3.1 Tujuan Umum 4
1.3.2 Tujuan Khusus 4
1.4 Manfaat Penelitian 5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA 6
2.1 Biofilm 6
2.1.1 Definisi Biofilm 6
2.1.2 Struktur Biofilm 7

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

2.1.3 Pembentukan Biofilm 7
2.1.4 *Quorum Sensing* 10
2.1.5 Biofilm *S. aureus* 11
2.1.6 Resistensi Biofilm Terhadap Antibiotik 13
2.2 Bakteri *S. aureus* 14
2.2.1 Klasifikasi 14
2.2.2 Morfologi 14
2.2.3 Sifat Pertumbuhan 15
2.2.4 Struktur Antigen 15
2.2.5 Patogenesis *S. aureus* 16
2.2.6 Penghindaran Sistem Imun Oleh Bakteri *S. aureus* 17
2.3 Antibodi 19
2.3.1 Pengertian Antibodi 19
2.3.2 Struktur Antibodi 20
2.3.3 Fragmen Imunoglobulin 22
2.3.4 Imunoglobulin G 23
2.3.5 Reaksi Antigen Antibodi 23
2.3.6 Antibodi Poliklonal 24
BAB III KERANGKA KONSEP 27
BAB IV METODE PENELITIAN 29
4.1 Desain Penelitian 29
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian 29
4.3 Sampel penelitian 29
4.4 Variabel Penelitian 29
4.5 Definisi Operasional 29
4.6 Alat dan Bahan 30
4.7 Prosedur Kerja Penelitian 31

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

4.7.1 Identifikasi Bakteri *S. aureus* 31
4.7.2 Uji Pembentukan Biofilm 32
4.7.3 Isolasi Protein Biofilm Bakteri *S. aureus* 33
4.7.4 *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis* 34
4.7.5 Elektroelusi dan Dialisis 35
4.7.6 Tahapan Uji Hemaglutinasi 36
4.7.7 Produksi Antibodi Poliklonal 37
4.7.8 Purifikasi Serum 38
4.7.9 Uji Hambatan Hemaglutinasi 39
4.7.10 Uji *Cheack Board* 39
4.7.11 Uji *Western Blotting* 40
4.8 Analisis Data 41
4.9 Alur Penelitian 43
BAB V HASIL PENELITIAN 44
5.1 Hasil Identifikasi Bakteri *S. aureus* 44
5.2 Hasil Uji Pembentukan Biofilm 44
5.2.1 Metode *Congo Red Agar* 44
5.2.2 Metode Tabung 46
5.3 SDS-PAGE 47
5.4 Hasil Uji Hemaglutinasi 48
5.5 Hasil Uji Hambatan Hemaglutinasi 48
5.6 Hasil Uji *Check board* 49
5.7 Hasil Uji *Western Blotting* 51
BAB VI PEMBAHASAN 53
6.1 Identifikasi Bakteri *S. aureus* dan Uji Pembentukan Biofilm 53
6.2 Uji Hemaglutinasi dan Uji Hambatan Hemaglutinasi 56
6.3 Uji *Cheack Board* dan Uji *Western Blotting* 57

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN 60
7.1 Kesimpulan 60
7.2 Saran 60
DAFTAR PUSTAKA 61

DAFTAR TABEL

Tabel 5. 1 Hasil Identifikasi Bakteri *S. aureus* 44
Tabel 5. 2 Hasil Uji Pembentukan Biofilm Metode CRA 44
Tabel 5. 3 Hasil Uji Pembentukan Biofilm Metode Tabung..... 46
Tabel 5. 4 Hasil Uji *Check Board* antara Antigen Protein Biofilm 22,4 KDA dan Antibodi Protein Biofilm 22,4 kDa*S. aureus*..... 50

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Biofilm *Staphylococcus aureus*..... 6
Gambar 2. 2 Mekanisme Pembentukan Biofilm. 8
Gambar 2. 3 Mekanisme *Quorum Sensing* Pada Bakteri Gram Positif..... 10
Gambar 2. 4 Biofilm exopolysaccharide PIA / PNAG. 12
Gambar 2. 5 Mekanisme bakteri *S. aureus* menghindari *opsonophagocytosis*..... 18
Gambar 2. 6 Struktur Antibodi..... 20
Gambar 2. 7 Produksi Antibodi Poliklonal. 25
Gambar 3. 1 Kerangka Konsep..... 27
Gambar 4. 1 Alur Penelitian..... 43
Gambar 5. 1 Hasil uji pembentukan biofilm metode CRA..... 45
Gambar 5. 2 Hasil uji metode tabung..... 46
Gambar 5.3Hasil uji SDS-PAGE. 47
Gambar 5. 4 Hasil uji hemaglutinasi..... 48
Gambar 5. 5 Hasil uji hemaglutinasi Protein Biofilm*S. aureus*..... 49
Gambar 5. 6 Hasil uji hambatan hemaglutinasi..... 49
Gambar 5. 7 Hasil uji *check board* antara antigen Protein Biofilm 22,4 kDa dan antibodi Protein Biofilm 22,4 kDa*S. aureus*..... 50
Gambar 5. 8 Hasil Uji *Western blotting*. 51

Repository Universitas Brawijaya
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
REPOSITORY.UB.AC.ID

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Keterangan Kelaikan Etik Penelitian..... 67
Lampiran 2. Surat Keterangan Bebas Plagiasi..... 68
Lampiran 3. Keterangan Submit Jurnal..... 69
Lampiran 4. Manuscript Jurnal..... 69
Lampiran 5. Riwayat Hidup..... 80

DAFTAR SINGKATAN

AI	*: Auto Inducers*
BAP	*: Blood Agar Plate*
BHIB	*:Brain Heart Infusion Broth*
CFA	*: Complete Freund Ajuvant*
CRA	*: Congo Red Agar*
CRF	*: Coagulase Reacting Factor*
EDTA	*: EthyleneDiamineTetraacetic Acid*
EPS	*: Extracelluler Polymeric Substance*
ET	*: Exfoliatin toxin*
HA	*: Hemaglutinasi*
ICA	*: Intercellular Adhesion*
IFA	*: Incomplete Freund Ajuvant*
IgA	*: Imunoglobulin A*
IgD	*: Imunoglobulin D*
IgE	*: Imunoglobulin E*
IgG	*: Imunoglobulin G*
IgM	*: Imunoglobulin M*
MDR	*: Multi Drug Resistant*
MSA	*: Manitol Salt Agar*
NA	*: Nutrien Agar*
NaCl	*: Natrium Clorida*
NB	*: Nutrien Broth*
NC	*: Nitrocellulose*
OMP	*: Outer Membran Protein*
PBS	*: Phosphate Buffered Saline*
PBST	*: Phosphate Buffered Saline-Tween*
PIA	*: Polysaccharide Intercelluler Adhesin*
PNAG	*: Poli-β (1-6) N-asetilglukosamine*
PVL	*: Pantone Valentine Leucosidin*
QS	*: Quorum Sensing*
RSB	*: Reducing Sample Buffer*
SAS	*: Saturated Ammonium Sulfate*
SDS-PAGE	*: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
SE	*: Staphylococcus Enterotoxin*
TBS	*: Tris Buffered Saline*
TSB	*: Trypticase Soy Broth*
TSST	*:Toxic Shock Syndrome Toxin*
UV	*: Ultra Violet*

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakteri *Staphylococcus aureus (S. aureus)*merupakan penyebab infeksi nosokomial. Bakteri ini patogen pada manusia karena mempunyai faktor virulensi seperti biofilm, *Panton Valentine Leucocidine* (PVL) dan beberapa enzim (protease, lipase, dan elastase), yang memungkinkan untuk menghancurkan jaringan hospes dan metastase ke tempat lainnya (Buyukcangaz *et al*., 2014). Bakteri *S. aureus* adalah bakteri Grampositif, dan merupakan patogen utama pada manusia dan hewan, dapat menyebabkan berbagai macam penyakit seperti infeksi kulit dan jaringan lunak (Chessa *et al*., 2015).Habitat *Staphylococcus* adalah pada membran hidung dan kulit hewan berdarah panas, dan mereka dapat menyebabkan berbagai macam infeksi dari yang ringan seperti infeksi kulit dan keracunan makanan, sampai yang dapat mengancam kehidupan seperti pneumonia, sepsis, osteomielitis, dan infeksi endokarditis (Kakai, 2002).

Biofilm bakteri merupakan bentuk struktural dari sekumpulan mikroorganisme yang dilindungi oleh matriks ekstraseluler yang disebut *Extracelluler Polymeric Substance* (EPS), dimana EPS merupakan produk yang dihasilkan oleh mikroorganisme itu sendiri dan dapat melindungi dari pengaruh lingkungan yang buruk (Prakash *et al*., 2003). Diperkirakan sekitar 65% dari semua infeksi bakteri terkait dengan biofilm bakteri (Jamal *et al*., 2018).Biofilmmelindungi sel-sel bakteri dari serangan seperti radiasi UV, perubahan nilai pH, paparan zat kimia, fagositosis, dehidrasi dan antibiotik (Gupta *et al*., 2015).Bakteri dalam biofilm dapat menahan antibiotik pada konsentrasi hingga 1000 kali lebih tinggi daripada bakteri yang sama dalam

keadaan planktonik (Arciola *et al.,* 2015). Biofilm dapat berupa tunggal atau multilayer, berisi populasi bakteri baik homogen atau heterogen yang menetap di dalam matriks dan disekresikan oleh bakteri pembentuk biofilm(Satpathy *et al.*,2016). EPS biofilm *Staphylococcus*terdiri dari *Polysaccharide Intercellular Adhesin(PIA),* ekstraseluler-DNA, protein, *amyloid fibrils*dan polisakarida. PIA tersusun atas *poli-β (1-6) N-asetilglukosamin (PNAG)*, sebagian deasetilasi, bermuatan positif, yang sintesisnya dimediasi oleh lokus icaADBC(Bolesand Horswill,2011; Arciola *et al.*, 2015).

Bakteri *S. aureus* dan *S. epidermidis*mempunyai operon*intercellularadhesion (ica)* yang bertanggung jawab untuk produksi *slime*. Operon ini berisi gen icaADBC, selain gen iCaR yang berfungsi sebagai gen regulasi. Di antara gen ica, genicaA dan icaD telah dilaporkan berperan pentingdalamproses pembentukan biofilm. Gen icaA yang mengkodekan *N-acetylglucosaminyltransferase*, enzim yang terlibat dalam sintesis PIA. Gen icaD telah dilaporkan berperan penting dalam ekspresi maksimal *N-acetylglucosaminyltransferase*, yang mengarah ke ekspresi fenotipik dari kapsulpolisakarida (Nasr *et al*., 2012). Gen icaC terlibat dalam eksternalisasi polisakarida yang mulai tumbuh. Sedangkan gen icaB terletak di permukaan sel ekstraseluler mengkode *N-deacetylase*yang bertanggung jawab untuk deasetilasi parsial PIA (Arciola *et al*., 2015).

Proses pembentukan biofilm bakteri *S. aureus*terjadi melalui beberapa tahap antara lain yang pertama sel-sel planktonik mikroba melekat ke permukaan abiotik atau biotik. Perlekatan awalbersifat *reversible*dan akan menjadi *irreversibel*. Sel-sel mikroba mulai berkomunikasi antara satu sama lain oleh produksi sinyal *autoinducer*yang mengakibatkan ekspresi gen khusus biofilm.

Mikroorganisme mengeluarkan matriks EPSuntuk menstabilkan jaringan biofilm. Tahap selanjutnya meliputi agregasi sel, membentuk mikrokoloni diikuti oleh pertumbuhan dan maturasi sel. Tahap terakhir adalah *dispersion* yang menandakanpenyebaran biofilm dan kembalinya sel yang diam ke bentuk motil. Komunitasmikroba dalam biofilm menghasilkan enzim *saccharolytic* berbeda yang memecah biofilm, dan menstabilkan polisakarida. Sehingga melepaskan bakteri permukaan yang berada di bagian atas struktur biofilm untuk kolonisasi ke permukaan baru(Gupta *et al.,* 2015).

Patogenesis bakteri *S. aureus* disebabkan oleh efek gabungan dari faktor ekstraseluler dan toksin, bersama dengan sifat invasif strain seperti perlekatan, pembentukan biofilm, dan ketahanan terhadap fagositosis (Chessa*et al*., 2015).Tahap pertama infeksi bakteri patogen adalah kemampuan patogen melekat ke permukaan sel hospes. Setelah Melekat ke permukaan sel inang spesifik, bakteri patogen kemudian memulai proses biokimia spesifik yang mengakibatkan penyakit termasuk proliferasi, sekresi toksin, dan invasi pada sel hospes tertentu (Wilson *et al.,* 2002). Keberadaan molekul hemaglutinin pada bakteri sangat penting karena berperan sebagai molekul adhesi bakteri tersebut pada permukaan sel hospes (Mubarokah *et al*., 2009). Protein hemaglutininmerupakan molekul adhesin bakteri yang memperantarai perlekatan sel bakteri pada Eritrosit (Rupp *et al*., 1995).Bakteri *S. aureus* yang memiliki protein hemaglutinin mempunyai kemampuan adhesi lebih tinggi pada sel epitel dibandingkan dengan bakteri *S. aureus* yang tidak memiliki protein hemaglutinin (Abrar *et al.,* 2013).

Peran haemaglutinin pada adhesi diprediksi sebagai faktor penting untuk virulensi dari bakteri *S. aureus* (Wahyuni *et al*., 2005).Penelitian tentang protein

hemaglutinin pada bakteri *S. aureus* pernah dilaporkan oleh Rares, (2011) dan Abrar *et al.,* (2012), masing-masing menemukan protein hemaglutinin yang berbeda yaitu 22,3 kDa dan 46 kDa tetapi protein hemaglutinin tersebut bukan berasal dari Protein Biofilm*S. aureus.* Beberapa penelitian tentang protein hemaglutinin yang berfungsi sebagai molekul adhesin telah banyak diteliti di antaranyaProtein Pili *Vibrio cholerae* 38 kDa dan 76 kDa pada OMP (Sumarno, 2000), Protein Fimbria 16 kDa (AF16) *Acinetobacter baumannii* (Noorhamdani, 2005), Protein Pili *Proteus mirabilis* P35535,2kDa(Mufida*et al.,* 2007) dan Proein Pili 49,8 kDa*Shigella dysenteriae*(Sumarno *et al*., 2015).

Telah diketahui bahwa protein hemaglutinin merupakan molekul adhesin, sehingga perlu dilakukan penelitian apakah Protein Biofilm pada bakteri *S. aureus* juga mengandung protein hemaglutinin yang berperan sebagai molekul adhesin.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana karakterisasi Protein Biofilm bakteri *S.aureus*dan respon antibodi poliklonal terhadap antigen Protein Biofilmbakteri *S. aureus*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui karakterisasiProtein Biofilm bakteri *S. aureus*berdasarkan berat molekul, protein hemaglutinindan melihat respon antibodi poliklonal terhadap antigen Protein Biofilm bakteri *S. aureus.*

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui profil Protein Biofilm bakteri *S. aureus* berdasarkan berat molekulnya.

2. Untuk mengetahui Protein Biofilm yang berperan sebagai protein hemaglutinin.
3. Untuk melihat respon antibodi poliklonal terhadap antigen Protein Biofilmbakteri *S. aureus.*

1.4 Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritis;menambah informasi tentang teori karakterisasi Protein Biofilm bakteri *S. aureus,* berdasarkan berat molekul, protein hemaglutinindan respon antigen poliklonal terhadap antigen Protein Biofilm bakteri *S. aureus.*
2. Manfaat praktis: dengan ditemukannya protein khas yang bersifat imunogenik dari Protein Biofilm*S. aureus*dapat dikembangkan sebagai alat uji diagnostik secara imunologi atau sebagai candidat vaksin.

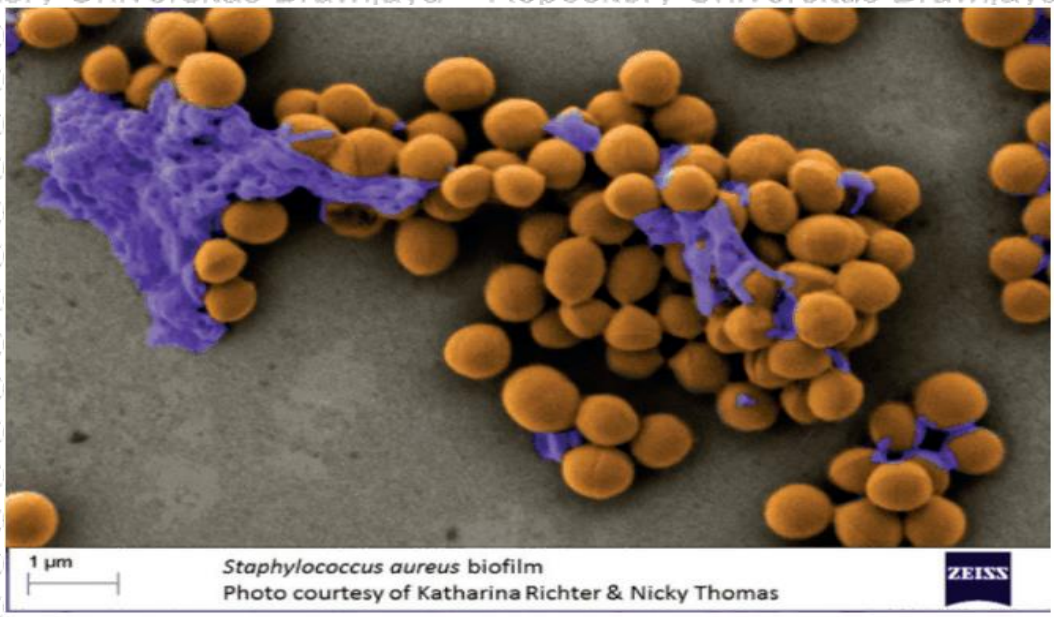
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biofilm

2.1.1 Definisi Biofilm

Biofilm bakteri merupakan bentuk struktural dari sekumpulan mikroorganisme yang dilindungi oleh matriks ekstraseluler yang disebut *Extracelluler Polymeric Substance* (EPS), dimana EPS merupakan produk yang dihasilkan oleh mikroorganisme itu sendiri dan dapat melindungi dari pengaruh lingkungan yang buruk (Prakash *et al.,* 2003). Biofilm dapat berupa tunggal atau multilayer.Biofilm berisi populasi bakteri baik homogen atau heterogen yang menetap di dalam matriks yang terdiri dari zat polimer ekstraseluler yang disekresikan oleh bakteri pembentuk biofilm(Satpathy *et al.*, 2016). Biofilm bakteri *S. aureus* di tunjukan seperti Gambar 2.1



Gambar 2. 1Biofilm *S. aureus*.Hasil Scanning electron microscope yang diberi label warna untuk menunjukkan biofilm *S. aureus*. Bakteri berwarna kuning dan biofilm diwarnai dengan warna ungu. Gambar milik Katharina Ritcher, Departemen Otolaryngology, The University of Adelaide dan Nicky Thomas, Universitas Australia Selatan, Australia (Psaltis, 2016).

2.1.2 Struktur Biofilm

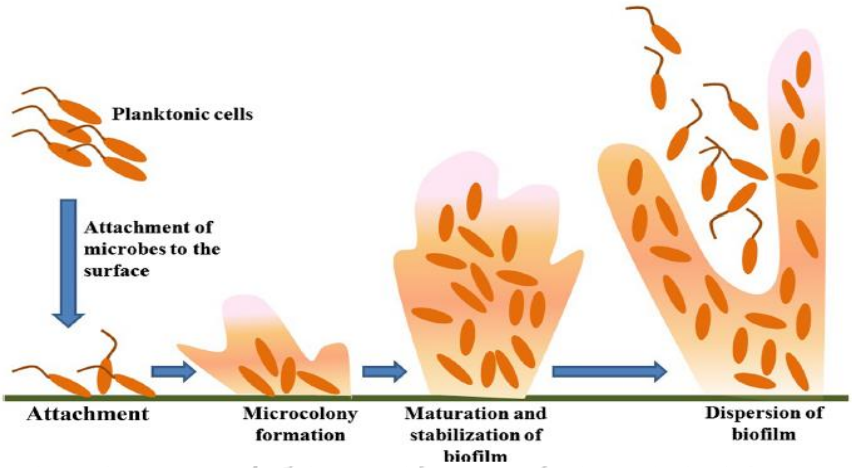
Unit struktural biofilm adalah mikrokoloni dan proses dasar pembentukan dari biofilm seperti mekanisme quorum sensing, resistensi antimikroba, dan perlekatan yang dapat menerangkan interaksi fisiologis dari mikrokoloni dalam biofilm yang telah matang. Biofilm terdiri dari85% materi matriks dan 15% kumpulan sel-sel bakteri. EPS menyusun 50-90% karbon organik biofilm dandapat dianggap sebagai material matrik yang utama.EPS bersifat hidrofilik karena dapat mengikat air dalam jumlah yang banyak, dengan tingkat kelarutan yang berbeda-beda (Gunardi, 2014).Bioflmmelindungi sel-sel bakteri dariserangan seperti radiasi UV, perubahan nilaipH, paparan zat kimia, fagositosis, dehidrasi dan antibiotik (Gupta *et al.,* 2015).Struktur biofilm memiliki pori-pori dan saluranair yang berfungsi sebagai nutrisi danpembuangan melalui pertukaran produkdengan lingkungan luar secara aktif danpasif (Galli*et al.,* 2007).

2.1.3 Pembentukan Biofilm

Biofilm mewakili hubungan kompleks bakteri yang bergerombol erat dalam matriks. Pertumbuhanbiofilm ditandai oleh serangkaian kegiatan fisik, kimia dan proses biologi (Gupta *et al.,* 2015). Pembentukan dari biofilm ini tergantung dari kosentrasi nutrisi yang tersedia dan di atur oleh zat kimia komplek yang dikeluarkan oleh sel sebagai komunikasi antar sel. Sebagai contoh ketika hidup bebas bakteri *P. aeruginosa* menghasilkan molekul signal dalam kadar yang rendah. Tetapi ketika bakteri *P. aeruginosa* membentuk biofilm maka kosentrasi molekul signal akan meningkat dan menimbulkan perubahan aktivitas dari gen - gen, salah satunya adalah gen yang mengatur sintesis dari alginat untuk membentuk matriks ekstraseluler (Donlan, 2002).

Biofilmmikroba berkembang melalui lima tahap berturut-turut seperti tahap *reversible attachment*, *irreversibleattachment*, *maturation stage I, maturationstage II and dispersion*(Edwar *et al*., 2015; Gupta *et al*., 2015).

Tahapan pembentukan biofilm terdapat pada Gambar 2.2 berikut :



Gambar 2. 2Mekanisme Pembentukan Biofilm. Sel planktonik menempel secara *reversible* ke permukaan dan kemudian menjadi *irreversible* yang mengarah pada pembentukan koloni sel bakteri di permukaan. Dengan bantuan quorum sensing dan peristiwa pensinyalan lainnya, pematangan dan stabilisasi biofilm terjadi. Setelah itu, mikroba di dalam biofilm mengalami dispersi oleh pelepasan bakteri permukaan yang berada di atas struktur biofilm untuk kolonisasi ke permukaan baru (Gupta *et al*., 2015).

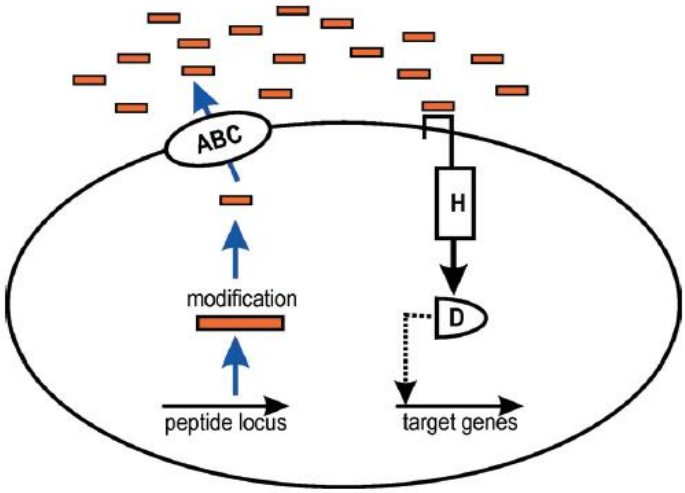
- Pada tahap pertama (*reversible attachment)*, sel-selplanktonik mikroba melekat ke permukaan abiotik atau biotik. Pada tahap ini sel bakteri masih biaslepas kembali dan belum terbentukbiofilm. Ikatan dari sel mikroba ke permukaan dikenal sebagai adhesi, sedangkan ikatan antara sel-sel mikroba disebut sebagai kohesi. kekuatan fisik yang berhubungan dengan adhesi bakteri ke permukaan termasuk ikatan van der Waals.
- Pada tahap kedua*(irreversible attachment),* beberapa perlekatan sel bersifat*reversible* menjadi terhenti dan menjadi *irreversibel*. sel bakteri memproduksi berbagai*adhesin* yang melekatkan kompleksbakteri ke permukaan. Pada tahap pertama dan kedua pembentukan biofilm, sel-sel mikroba awalnya berikatan longgar dengan permukaan yang

bersangkutan, yang kemudian digantikan oleh adhesi spesifik dan kuat. Padatahap inikompleks bakteri tidak dapat lepaskembali.

- Tahap ketiga *(maturation stage I),* sel-sel mikroba mulai berkomunikasi antara satu sama lain oleh produksi sinyal autoinduceryang mengakibatkan ekspresi gen khusus biofilm. Dalam tahap ini, mikroorganisme mengeluarkan matriks EPSuntuk menstabilkan jaringan biofilm.Dalam tahap ini, biofilm menjadi berlapis-lapis dan ketebalan mereka meningkat hingga 10 µm.
- Pada tahap ke empat*(maturationstage II)*, ukuran mikrokoloni meningkat dan ketebalannya mencapai sekitar 100 µm. Mikrokoloni di biofilm sering terdiri dari komunitas mikroba yang beragam.Pada tahap ini terjadi interaksi antara koloni bakteri danmatriks ekstraseluler yang dihasilkannya.Interaksi ini menghasilkan maturasibentuk biofilm.Dengan demikian, tahap ketiga dan keempat meliputi agregasi sel, membentuk mikrokoloni diikuti oleh pertumbuhan dan maturasi sel.
- Tahap kelima *(dispersion),* menandakanpenyebaran biofilm dan kembalinya sel yang diam ke bentuk motil. Komunitas mikroba dalam biofilm menghasilkan enzim *saccharolytic*yang berbeda untuk memecah biofilm dan menstabilkan polisakarida, sehingga melepaskan bakteri permukaan yang berada di bagian atas struktur biofilm untuk kolonisasi ke permukaan baru. Pada tahap ini, mikroorganisme meningkatkan ekspresi protein flagella sehingga organisme menjadi motil dan bakteri dapat mentranslokasi ke tempat yang baru(Gupta *et al.,* 2015).

2.1.4 *Quorum Sensing*

Quorum sensing (QS) adalah proses komunikasi sel sel bakteri yangmelibatkan produksi, deteksi, dan respon terhadap molekul sinyal ekstraseluler disebut *autoinducers* (AI). AI menumpuk di lingkungan sebagai kepadatan populasi bakteri meningkat, dan bakteri memantau informasi ini untuk melacak perubahanjumlah sel mereka dan kolektif mengubah ekspresi gen. QS mengontrol gen yang mengarahkan kegiatan yang bermanfaat bila dilakukan oleh kelompok bakteri yang bertindak selaras. Proses yang dikendalikan oleh QS meliputi *bioluminescence*, sporulasi, kompetensi, produksi antibiotik, pembentukan biofilm, dan pengeluaran faktor virulensi(Rutherford and Bassler, 2012). Mekanisme *Quorum sensing* pada bakteri gram positif terdapat pada Gambar 2.3



Gambar 2. 3Mekanisme *Quorum Sensing* Pada Bakteri Gram Positif.ABC :transpoter protein complex, H : histidin kinase, D : regulator protein (Maric and Vranes, 2007).

Bakteri gram positif menggunakan oligopeptidasebagai molekul sinyal (Gambar 2.3), protein kompleks ABC mengangkut oligopeptida dari sel ke ruang *intercelluler*. Pada konsentrasi yang cukup tinggi dari *autoinductors* di media,

sinyal dirasakan oleh sistem protein yang terdiri dari protein kinase dan protein regulator. Setelah mengikat molekul sinyal memfosforilasi protein kinase dan dengan demikian menjadi aktif. Proteinkinase teraktivasi mengaktifkan protein regulator yang kemudian mengikat gen target spesifik dan mengaktifkan transkripsi mereka(Maric and Vranes, 2007).

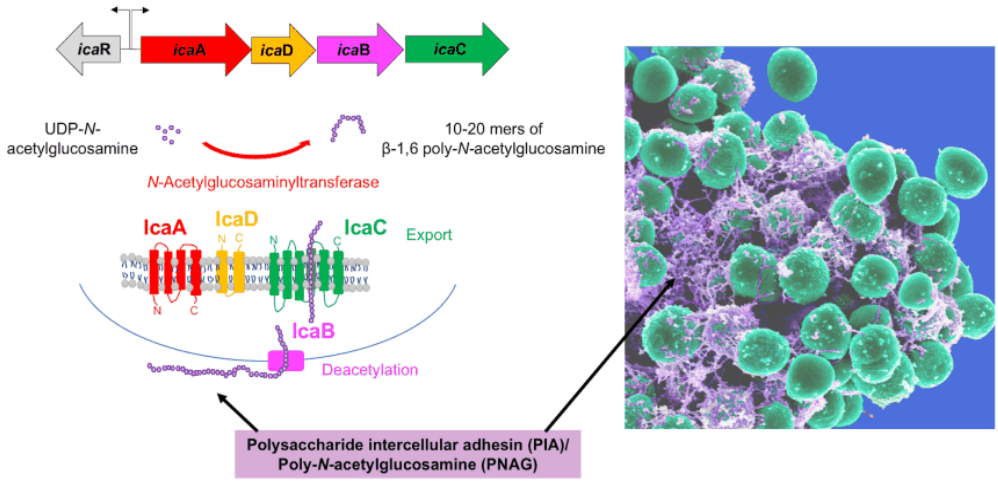
2.1.5 Biofilm *S. aureus*

Biofilm *S. aureus* diatur oleh 2 regulator utama yakni *staphylococcal accessory regulator* (*sarA*) dan *accessory gene regulator* (*agr*). *SarA* berperan dalam pertumbuhan biofilm *S. aureus* dan dapatmencegah degradasi eDNA dan protein yang menjadi struktur utama biofilm.Regulator *agr* sendiri berperan pada *quorum sensing* dari *S. aureus* denganmenurunkan tingkat perlekatan *S. aureus* dengan permukaan, sehingga terjadipenurunan tingkat pembentukan biofilm. Penekanan *agr* penting untukpembentukan biofilm, sedangkan induksi *agr* penting untuk penyebaranbiofilm yang telah matang (Fournier*et al*., 2001).

Pembentukan biofilm *S. aureus* terjadi melalui berbagai jalur yaitu jalur PIA-*dependent*, PIA-*independent*, serta eDNA.*Polysaccharide intercelluler antigen* (PIA) diproduksi *S.aureus* secara*in vitro* dari *UDP-N-acetylglucosamine* melalui produk lokus *intercellularadhesion* (*ica*). Pada jalur PIA-*dependent*, PIA terbukti sangat penting dalampembentukan biofilm serta berperan dalam pertumbuhan anaerobik. Saat PIAdiproduksi maka biofilm juga akan ikut terbentuk. Faktor lingkungan lain juga dapat berperan dalam pengaturan ica, termasuk glukosa, etanol, osmolaritas, suhu dan antibiotik seperti tetrasiklin (Archer *et al.,*2011).

Telah terbukti bahwa bakteri *S. aureus* dan *S. epidermidis*mempunyai operon*intercellularadhesion (ica)* yang bertanggung jawab untuk produksi *slime*. Operon ini berisi gen icaADBC, selain gen iCaR yang berfungsi sebagai

genregulasi. Di antara gen ica, genicaA dan icaD telah dilaporkan berperan pentingdalamproses pembentukan biofilm. Gen icaA mengkodekan *N-acetylglucosaminyltransferase*, enzim yang terlibat dalam sintesis PIA. Gen icaD berperan penting dalam ekspresi maksimal *N-acetylglucosaminyltransferase*, yang mengarah ke ekspresi fenotipik dari kapsulpolisakarida (Nasr *et al.*, 2012). Gen icaC terlibat dalam eksternalisasi polisakarida yang mulai tumbuh. Sedangkan gen icaB terletak di permukaan sel ekstraseluler mengkode *N-deacetylase*yang bertanggung jawab terhadapproses deasetilasi parsial PIA (Arciola *et al.*, 2015).



Gambar 2. 4Biofilm *Exopolysaccharide PIA/PNAG*.Lokus biosintetik PIA mencakup gen icaA, yang mengkode untuk *N-acetylglucosamine transferase* (GlcNAc), yang menambahkan residu GlcNAc ke rantai poly-GlcNAc yang sedang berkembang. IcaD membantu dalam fungsi ini dengan cara yang tidak diketahui. Rantai tersebut kemudian diyakini diekspor oleh IcaC, karena dengan tidak adanya icaC, polimerisasi berhenti pada panjang rantai sekitar 10-20 unit GlcNAc. IcaB terletak di permukaan sel ekstraseluler yang mengkode *N-deacetylase* yang bertanggung jawab untuk deasetilasi parsial PIA (Le *et al*, 2018).

Biofilm juga dapatterbentuk melalui jalur PIA-*independent*, yang mana tidak mementingkanlokus gen *ica*. Penghapusan lokus *ica* terbukti tidak menurunkan virulensibiofilm *S. aureus*. Pada *S. aureus* mutan dengan delesi *ica*, ditemukan bahwaprotein A (SpA) yang berperan penting dalam pembentukan biofilm. Protein *fibronectin-binding proteins* (FnBPs)juga dapat membentuk

formasi biofilm. Komponen penting lain dari pembentukan biofilm *Staphylococcus* adalah *extracellular DNA*(eDNA). Penemuan bahwa zat ini merupakankomponen penting dari biofilm sebelumnya dibuat oleh*Pseudomonas aeruginosa.* Bakteri *S. aureus* memiliki kemampuan menambahkan DNApada matriks awal pembentukan biofilm.Perlakuan dengan DNase menurunkan eDNA dan menghambat formasi pembentukan biofilm yang dimediasi oleh eDNA (Archer *et al.,*2011).

2.1.6 Resistensi Biofilm Terhadap Antibiotik

Bakteri dalam biofilm dapat menahan antibiotik pada konsentrasi hingga 1000 kali lebih tinggi daripada bakteri yang sama dalam keadaan planktonik (Arciola *et al.,* 2015).Faktor-faktor yang diperkirakan bertanggung jawab terhadap resistensi biofilm terhadap antibiotik adalah1). EPS yang disekresikan oleh bakteri biofilm bertindak sebagai penghalang fisik atau kimia, sehingga mencegah penetrasi oleh antibodi atau banyak antibiotik. 2). Penurunan tingkat pertumbuhan organisme dalam biofilm.Antimikroba lebih efektif membunuhsel yang tumbuh dengan cepat. 3). Enzim degradasi antibiotik seperti β-laktamase juga dapat diimobilisasi dalam matriks EPS, sehingga molekul antibiotik yang masuk dapat dinonaktifkan secara efektif. Sel biofilm *P. aeruginosa* telah terbukti menghasilkan 32 kali lipat lebih banyak β-laktamase dari pada sel-sel strain yang sama yang ditumbuhkan secara planktonik.4). Perubahan komposisi protein dinding sel bakteri dalam bentuk biofilm mencapai 40%, sehingga membran bakteri biofilm mungkin lebih siap untuk memompa keluar antibiotik sebelum mereka dapat menyebabkan kerusakan. 5). Agen antimikroba dinonaktifkan di lapisan luar biofilm. 6). Biofilm juga berperan untuk pertukaran DNA plasmid yang bertanggung jawab untuk resistensi antibiotik (Prakash, 2003; Gunardi, 2014).

2.2 Bakteri *S. aureus*

Bakteri*S. aureus*merupakan nama spesies yangmerupakan bagian dari genus *Staphylococcus.* Bakteri ini pertama kali diamati dan dibiakan oleh Pasteur dan Koch, kemudian diteliti secara lebih terinci olehOgston dan Rosenbach pada era tahun 1880-an. Nama genus *Staphylococcus*diberikan oleh Ogston karena bakteri ini, pada pengamatan mikroskopisberbentuk seperti buah anggur, sedangkan nama spesies *aureus*diberikan oleh Rosenbach karena pada biakan murni, koloni bakteri ini terlihatberwarna kuningkeemasan. Rosenbach juga mengungkapkan bahwa *S. aureus*merupakan penyebab infeksi pada luka dan furunkel (Yuwono, 2012).

2.2.1 Klasifikasi

Klasifikasi bakteri *S. aureus*dalam buku *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*(Vos *et al.,* 2009) adalah

Domain : *Bacteria*

Filum : *Furmicutes*

Klass : *Bacilli*

Ordo : *Bacillales*

Famili : *Staphylococcaceae*

Genus : *Staphylococcus*

Species : *Staphylococcusaureus*

2.2.2 Morfologi

Kuman ini berbentuk sferis,diameterkuman sekitar antara 0,8 - 1 µm. Pada sediaan langsung yang berasal dari nanah dapat terlihat sendiri, berpasangan, menggerombol dan bahkan dapat tersusun seperti rantai pendek. Kuman ini tidak bergerak, tidak membentuk spora dan termasuk dalam bakteri

gram positif.Hanya kadang-kadang ditemukan sebagai gram negatif pada bagian tengah gerombolan kuman, pada kuman yang telah di fagositosis dan pada biakan tua yang hampir mati(Warsa, 1994).

2.2.3 Sifat Pertumbuhan

Bakteri *Staphylococcus* di laboratorium tumbuh dengan baik dalam kaldu biasa pada suhu 37ºC. Pertumbuhan terbaik pada suasana aerob, kuman inipun bersifat anaerob fakultatif dan dapat tumbuh dalam udara yang hanya mengandung hidrogen dan pH optimum untuk pertumbuhan adalah 7,4.Bila kita ingin mendapatkankoloni yang berpigmen maka paling baik ditumbuhkan pada suhu 20-25°C. Koloni pada media padat berbentuk bulat, permukaannya menonjol, halus dansedikit berkilauan. Bakteri *S. aureus* umumnya membentuk koloni berwarna abu-abuhingga kuning keemasan.Pada lempeng agar darah umumnya koloni lebih besar dan pada varietas tertentu koloninya dikelilingi zona hemolisis (Warsa, 1994; Yuwono, 2012).

Bakteri *Staphylococcus* memproduksi katalase, yang membedakannya dengan *Streptococcus*, memfermentasikan banyak karbohidrat secara lambat, menghasilkan asam laktat tanpa gas. Aktivitas proteolitik pada masing-masing strain sangat bervariasi, *Staphylococcus*patogen menghasilkan banyak substansi ekstraseluler, relatif resisten terhadap pengeringan, panas (tahan suhu 50ºC selama 30 menit), dan NaCl 9% tetapi mudah dihambat oleh bahan kimia tertentu seperti heksaklorofen 3%(Jawetz *et al.*, 2004).

2.2.4 Struktur Antigen

Bakteri *Staphylococcus* mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigen. Bahan-bahan ekstraseluler yang dibuat oleh kuman ini kebanyakan juga bersifat antigenik (Warsa, 1994). Peptidoglikan, polimer

polisakarida yang mengandung subunit-subunit yang terangkai, merupakan eksoskelet yang kaku pada dinding sel. Petidoglikan dapat dihancurkan oleh asam kuat. Hal ini penting pada patogenesis infeksi : peptidoglikan memicu produksi interleukin-1 (pirogen endogen) dan antibodi opsonik oleh monosit, dan dapat menjadi *chemoattractant* untuk Leukosit polimorfonuklear, yang memiliki aktivitas mirip endotoksin, dan mengaktifkan komplemen (Jawetz *et al*., 2004)

Asam teikoat merupakan polimer gliserol atau ribitol fosfat, berhubungan dengan peptidoglikan dapat menjadi antigenik. Antibodi anti asam teikoat yang dapat dideteksi dengan difusi gel dapat ditemukan pada pasien endokarditis aktif yang di sebabkan oleh *S. aureus*. Protein A adalah komponen dinding sel pada banyak strain *S. aureus*yang berikatan dengan bagian Fc dari molekul IgG kecuali IgG3. Bagian Fab dari IgG yang terikat dengan protein A bebas berikatan dengan antigen spesifik. Protein A menjadi reagen yang penting dalam imunologi dan teknologi laboratorium diagnostik. Beberapa strain *S. aureus*memiliki kapsul yang menghambat fagositosis oleh Leukosit polimorfonuklear kecuali terdapat antibodi spesifik. Sebagian besar strain mempunyai koagulase pada permukaan dinding sel, koagulase terikat dengan fibrinogen secara nonenzimatik, sehingga menyebabkan agregasi bakteri (Jawetz *et al*., 2004; Yuwono, 2012).

2.2.5 Patogenesis *S. aureus*

Kemampuan *S. aureus* menimbulkan penyakit ditentukan kemampuannya menyebabkan kerusakan jaringan secara langsung dan kemampuan untuk tumbuhserta menghindar dari imunitas hospes. Faktor-faktor yang terlibat dalam patogenesis yang mengakibatkan kerusakan jaringan meliputi *surfaceassociated factor, extracellular enzyme* dan toksin. Ketiga macam faktor ini terlibat dalam perlekatan, penetrasi dan degradasi jaringan serta toksisitas.Toksin tersebut

sebagian disandi oleh gen-gen di plasmid dan sebagian oleh gen-gen di kromosom. Katalase adalah enzimyang mampu mengkonversi *hydrogen peroxide* menjadi air dan oksigen. Ujikatalase digunakan untuk membedakan *Staphylococcus* (katalase positif) dengan*Streptococcus* (katalase negatif). Bakteri *S. aureus* memproduksi enzim koagulase yangdapat menggumpalkan oksalat atau plasma sitrat. Koagulase berikatan denganprotrombin, akan bekerja secara enzimatik memulai polimerisasi fibrin yang akanmenutupi di permukaan *Staphylococcus* sehingga selamat dari sel-sel fagosit (Yuwono, 2012).

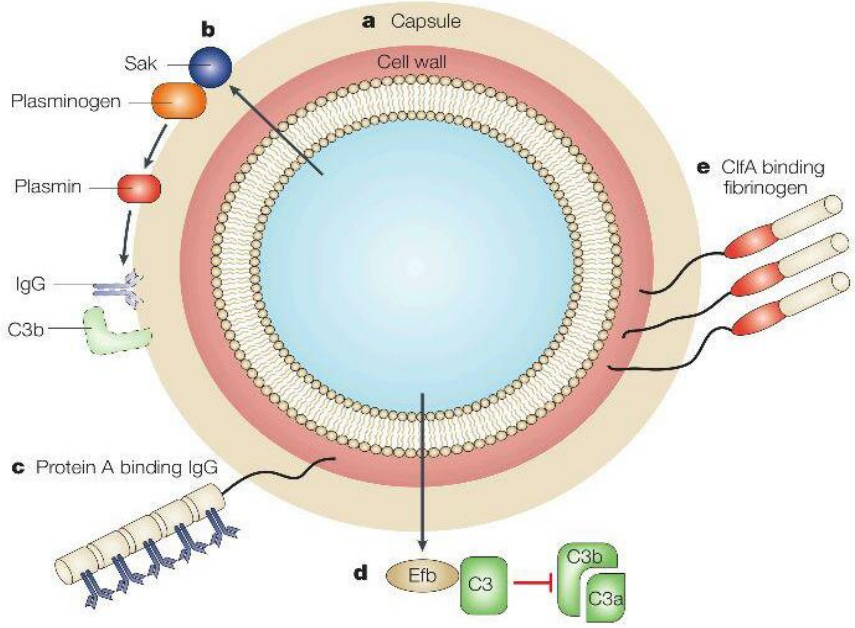
Bakteri *S. aureus* mengekspresikan banyak faktor virulensi potensial seperti: (1). Protein permukaan yang mendorong kolonisasi dalam jaringan hospes*(protein adhesin, hemaglutinin, fibronecting, laminin,* dan *fibrinogen binding protein)*; (2). Invasin yang mempromosikan penyebaran bakteri dalam jaringan *(leukocidin, kinase, hyaluronidase)*; (3). Faktor permukaan yang menghambat fagositosis (kapsul, Protein A); (4).Sifat biokimia yang meningkatkan ketahanan hidup bakteri di fagosit (karotenoid, produksi katalase); (5).Reaksi imunologi (Protein A, koagulase); (6). Toksin yang melisiskan membran sel eukariotik (*hemolysin, leukotoxin, leukocidin*; (7) eksotoksin yang merusak jaringan hospes atau menimbulkan gejala penyakit (SE-A,B,C,D,E dan G, TSST, ET), dan (8). Resistensi yang melekat dan diperoleh bakteri terhadap agen antimikroba (Todar, 2012).

2.2.6 Penghindaran Sistem Imun Oleh Bakteri *S. aureus*

Mikroba telah banyak mengalami berbagai evolusi dalam mekanisme untuk lolos dari imunitas humoral. Virulensi bakteri ekstraseluler dikaitkan dengan sejumlah mekanisme yang memungkinkan mikroba untuk melawan kekebalan bawaan. Bakteri yang kaya dengan kapsul polisakarida dapat menahan

fagositosis dan karena itu jauh lebih virulen daripada strain homolog yang kekurangan kapsul. Kapsul dari beberapa bakteri Gram-positif dan Gram-negatif mengandung residu asam sialat yang menghambat aktivasi komplemen oleh jalur alternatif (Abbas *et al*., 2015).

Mekanisme penghindaran sistem imun humoral oleh bakteri *S. aureus* seperti pada Gambar 2.4



Gambar 2. 5 Mekanisme bakteri*S. aureus* menghindari*opsonophagocytosis*.Gambar tersebut mengilustrasikan (a) kapsul polisakarida, dapat berkompromi terhadap akses neutrofil dengan mengikat komplemen dan antibodi;(b) ekstraseluler staphylokinase (Sak),mengaktifkan plasminogen yang terikat sel dan memotong IgG dan C3b; (c) protein A mengikat domain Fc 5 imunoglobulin G (IgG); (d) fibrinogen bindingprotein (Efb), yang mengikat faktor komplemen C3 dan memblokir pengendapannya pada permukaan sel bakteri. Aktivasi komplemen mencegah perlekatan C3b, sehingga menghambat opsonisasi. (e) Clumping factor A (ClfA), yang mengikat rantai γ pada fibrinogen (Foster, 2005).

S. aureus juga memiliki kemampuan untuk menonaktifkan faktor komplemen C3b dan molekul IgG yang terikat permukaan sel bakteri. Molekul plasminogen hospesmenempel pada permukaan sel bakteri, di mana mereka terikat dalam stoikiometri 1: 1 oleh *staphylokinase*, protein aktivator plasminogen yang disekresikan oleh *S. aureus*. Serine protease yang kuat dari plasmin

diaktifkan dan memotong C3b dan IgG yang terikat di permukaan, sehingga mengurangi fagositosis oleh neutrofil.*Fibrinogen binding protein* (Efb) yang mengikat komplemen faktor C3 untuk memblokir pengendapan C3 pada permukaan sel bakteri. Oleh karena itu, aktivasi komplemen mencegah perlekatan C3b dan opsonisasi dihambat. Protein A adalah protein yang menempel di dinding sel bakteri dengan empat atau lima domain yang masing-masing mengikat ke wilayah Fc dari IgG. *Clumping factor A* (ClfA) adalah protein pengikat fibrinogen dominan yang ada di permukaan sel *S. aureus* pada fase pertumbuhan stasioner. Tidak seperti kebanyakan protein permukaan, yang diekspresikan secara dominan selama fase eksponensial, gen clfA diaktifkan dalam fase diam dari promotor dependent σB (Foster, 2005).

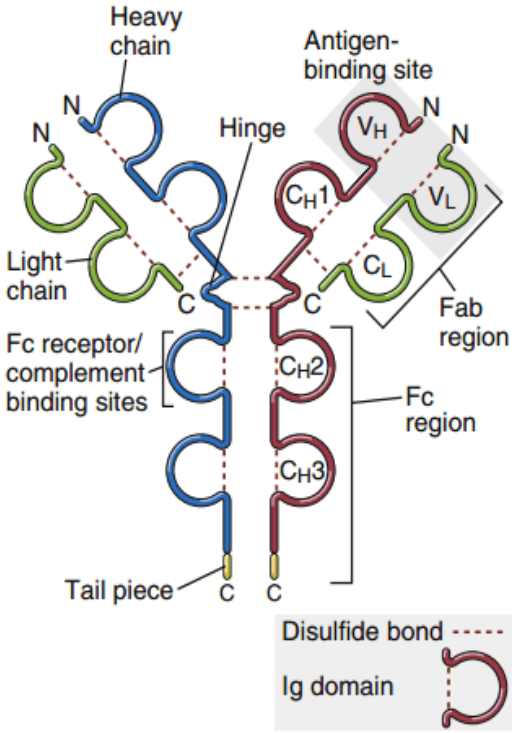
2.3 Antibodi

2.3.1 Pengertian Antibodi

Antibodi adalah protein yang bersirkulasi dalam darah yang di hasilkan oleh sel B dan sel plasma sebagai respon terhadap paparan antigen asing. Antibodi sangat bervariasi spesifitasnya sehingga dapat mengenal antigen asing dan menjadi mediator primer respon imun humoral. Peran sebagai mediator berarti antibodi bukanlah eksekutor membunuh antigen tetapi memediasi eksekutor lain (makrofag, komplemen, sel NK dan *sel mast*) untuk eliminasi antigen (Wahid dan Miskad, 2016).Ada lima jenis antibodi yaitu antibodi IgA, IgD, IgE, IgG dan IgM yang diberi nama sesuai dengan rantai berat yang dimilikinya α, δ, ε , γ, dan μ. Pada manusia, isotipe IgAdan IgG dapat dibagi lagi menjadi subclass atau subtipe, yang disebut IgA1 dan IgA2 danIgG1, IgG2, IgG3, dan IgG4. Setiap isotipe memiliki sifat fisik dan biologis yang berbeda serta fungsi efektor yang berbeda (Abbas *et al*., 2015).

IgA merupakan antibodi utama dalam saliva, berfungsi menghalangi perlekatan bakteri ke epitel mulut, faring, dan gastrointestinal. IgD, berperan sebagai reseptor antigen di permukaan limfosit. IgE ditemukan dengan jumlah sangat sedikit dalam serum, berpartisipasi dalam reaksi hipersensitivitastipe I. IgG merupakan pertahanan utama terhadapmikroorganisme dan toksin.IgM adalah antibodi pertama yang disekresikan untuk merespons rangsangan antigen (Sudiono, 2014).

2.3.2 Struktur Antibodi



Gambar 2. 6 Struktur Antibodi. Molekul Imunoglobulin (Ig G) yang di sekresikan (Abbas *et al.*, 2015).

Imunoglobulin mempunyai berbagai struktur dasar yaitu (Soedarto, 2015).

a. Rantai berat dan ringan. Semua imunoglobulin mempunyai empat struktur rantai sebagai unit dasar berupa dua rantai ringan yang identik 23 kDa dan dua rantai berat yang identik 50-70 kDa.

b. Ikatan disulfida. Terdapat ikatan di antara rantai-rantai *(inter-chain)* dan di dalam rantai *(intra-chain)* ikatan di sulfida.

1. *Inter-chain disulfida bonds* : Rantai berat dan rantai ringan dan dua rantai berat terikat bersama melalui *inter-chain disulfida bonds* dan melalui interaksi *non-covalent*. Jumlah *inter chain disulfida bond* berbeda untuk setiap molekul imunoglobulin.
2. *Intra-chain disulfida bonds*: di dalam masing-masing rantai polipeptida juga terdapat *intra-chain disulfida bond*.

c. Region V (variabel) dan region C (constant). Asam amino terdiri dari deretan rantai berat dan rantai ringan yang pada masing-masing rantai terdiri dua region yaitu rantai ringan *(light chain)* dan rantai berat *(heavy chain)*.Rantai ringan terdiri dari V_L (110 asam amino) dan C_L (110 asam amino) sedangkan rantai berat terdiri dari V_H (110 asam amino) dan C_H (330-440 asam amino).

d. Hinge region. Region ini merupakan tangan molekul antibodi yang berbentuk huruf Y yang memberikan fleksbilitas molekul di daerah tersebut.

e. Domain. Pada Gambaran tiga dimensi dari molekul imunoglobulin dapat ditunjukan bahwa molekul tidak lurus bentuknya, terlipat menjadi bagian atau region yang bundar (*globular region*) yang masing-masing mengandung suatu ikatan *intra-chain disulfide*. Region ini disebut domain. Terdapat domain pada rantai ringan yaitu V_L dan C_L sedangkan pada rantai berat terdapat V_H, C_H sampai C_{H4}.

f. Oligosakarida. Pada sebagian besar imunoglobulin, karbohidrat melekat pada domain C_{H2}, meskipun pada beberapa keadaan dapat juga melekat di tempat lain.

2.3.3 Fragmen Imunoglobulin

Fragmen imunoglobulin yang dihasilkan melalui digesti proteolitik dapat sangat berguna untuk menjelaskan hubungan antara struktur dan fungsi imunoglobulin.

1. Fragmen Fab. Digesti papain akan memecah molekul imunoglobulin pada *hinge region* dan menghasilkan pembentukan dua fragmen identik mengandung rantai ringan dan domain V_H dan C_H dari rantai berat. Fragmen Fab mengandung tempat perlekatan antigen yang terdapat pada antibodi.
2. Fragmen Fc. Digesti dengan papain juga menghasilkan fragmen yang mengandung dua rantai berat yang masing-masing mengandung domain C_{H2} dan C_{H3}. Fc disebut demikian karena mudah mengkristal. Fungsi efektor imunoglobulin dilakukan dengan perantara bagian molekul ini. Fungsi yang berbeda akan dimediasi oleh domain yang berbeda pada fragmen ini.
3. Fragmen F(ab')2. Pemberian pepsin (digesti pepsin) menyebabkan terjadinya pemecahan rantai berat yang menghasilakn fragmen yang mengandung dua antigen binding site. Fragmen ini disebut F(ab')2 karena divalen. Fc region di cerna menjadi peptida-peptida kecil oleh pepsin.F(ab')2 yang mengikat antigen tetapi tidak menjadi perantara fungsi efektor antibodi.

2.3.4 Imunoglobulin G

Struktur subkelas semua imunoglobulin G (IgG) adalah monomer (7S imunoglobulin), perbedaan subkelas terdapat pada jumlah ikatan disulfida dan panjang dari *hinge region*. IgG merupakan komponen utama imunoglobulin dalam serum dengan berat molekul 160.000 dalton.Kadarnya dalam serum sekitar 13 mg/ml, merupakan 75% dari semua imunoglobulin.IgG paling mudah berubah-ubah karena ia mampu membawa semua fungsi molekul imunoglobulin.IgG dapat menembus plasenta masuk ke janin dan berperan pada imunitas bayi sampai umur 6-9 bulan.IgG dapat mengikat komplemen kecuali IgG4 tidak bisa mengikat komplemen (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009; Soedarto, 2015).

2.3.5 Reaksi Antigen Antibodi

Antigen adalah bahan yang dapat di ikat secara spesifik oleh molekul antibodi atau molekul reseptor pada sel T. Antibodi dapat mengenal hampir setiap molekul biologik sebagai antigen seperti protein, asam nukleat, lipid, hormon, dan fosfolipid. Tempat kombinasi suatu antibodi (*antibody combining site*) terletak pada bagian Fab molekul dan terbentuk *regio hipervariabel* dari rantai berat dan rantai ringan. Konsep reaksi antigen antibodi seperti anak kunci dan kunci. Perlekatan antigen pada tempat kombinasi antibodi secara alami bersifat non-kovalensi dan reversibel, seperti halnya ikatan hidrogen, ikatan elektrostatik, gaya van der Waals dan ikatan hidrofobik. Kekuatan ikatan antara satu antibodi dengan epitop disebut afinitas antibodi. Kekuatan ikatan antibodi dengan epitop antigen secara keseluruhan disebut afiditas (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009; Soedarto, 2015).

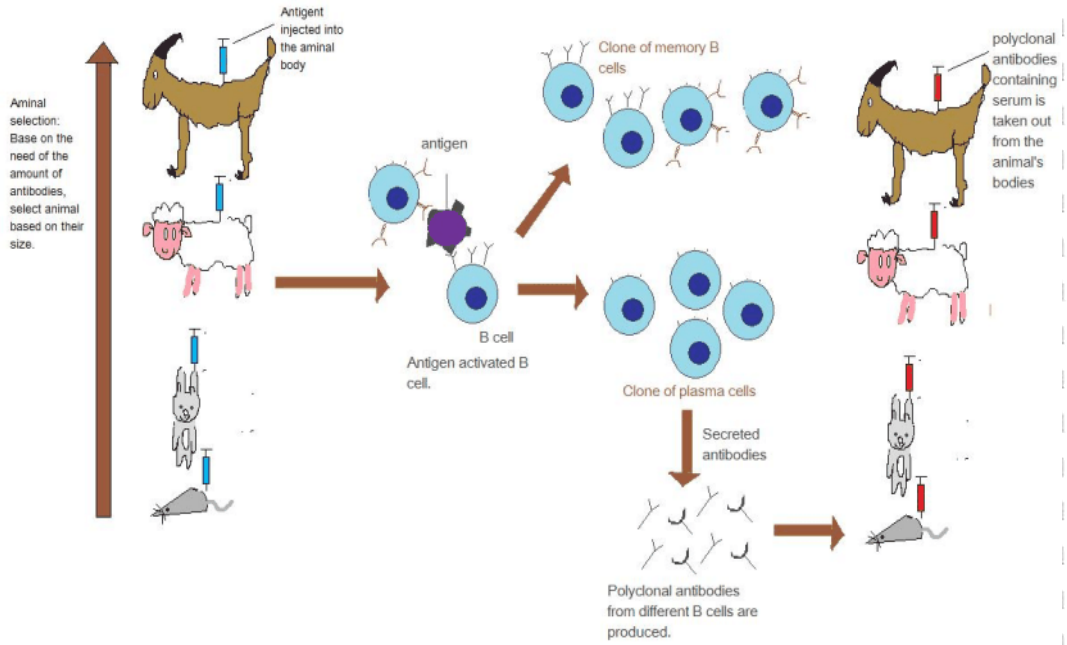
Bagian dari antigen yang dikenali oleh antibodi disebut epitop atau determinan. Epitop yang berbeda dari antigen protein dapat dikenali berdasarkan urutan bentangan asam amino (epitop linier) atau pada bentuk aslinya (epitop konformasional). Beberapa epitop ini tersembunyi di dalam molekul antigen dan akan menjadi tampak sebagai akibat dari perubahan fisikokimia. Setiap molekul antibodi IgG, IgD dan IgE memiliki 2 tempat pengikatan antigen. IgA disekresikan dalam bentuk dimer sehingga memiliki 4 tempat pengikatan antigen, dan IgM di sekresikan berbentuk pentamer dengan 10 tempat pengikatan. Oleh karena itu setiap molekul antibodi dapat mengikat 2-10 epitop dari satu antigen. Antibodi yang dihasilkan terhadap satu antigen dapat mengikat antigen lain dengan struktur yang sama. Kemampuan mengikat epitop yang serupa di sebut reaksi silang (Abbas *et al*., 2016).

Antibodi merupakan komponen imunitas didapat yang melindungi tubuh terhadap infeksi mikroorganisme dan produknya bersifat toksik. Oleh karena reaksi antigen dan antibodi sangat penting dan banyak digunakan secara invitro untuk tujuan diagnostik. Titer antibodi adalah pengenceran tertingi yang menunjukan aglutinasi atau presipitasi. Untuk menentukan titer antibodi, dibuat pengenceran serial serum dan selanjutnya ditambahkan sejumlah antigen yang konstan dan campuran larutan tersebut diinkubasikan dan diperiksa adanya aglutinasi atau presipitasi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

2.3.6 Antibodi Poliklonal

Antibodi poliklonal adalah campuran heterogen yang biasanya dihasilkan oleh klon sel B yang berbeda dalam tubuh. Mereka dapat mengenali dan mengikat banyak epitop yang berbeda dari satu antigen.Antibodi poliklonal diproduksi dengan menyuntikkan antigen ke hewan coba. Setelah disuntik

dengan antigen untuk mendapatkan respon imun primer, hewan tersebut diberikan imunisasi sekunder bahkan tersier untuk menghasilkan titer antibodi yang lebih tinggi terhadap antigen tertentu. Antibodi poliklonal dapat diperoleh langsung dari serum. Disebut poliklonal karena mengandung produk yang berasal dari banyak klon sel B. Klon adalah segolongan sel yang berasal dari satu sel dan karenanya identik secara genetik (Baratawidjaja *et al*., 2009)Proses produksi antibodi poliklonal ditunjukkan pada Gambar 2.4



Gambar 2. 7 Produksi Antibodi Poliklonal. Imunisasi adalah langkah pertama dari produksi antibodi poliklonal. Seekor hewan coba diimunisasi oleh antigen tertentu. Antigen ini mungkin mengandung beberapa epitop. Sistem kekebalan menghasilkan antibodi yang berbeda terhadap masing-masing epitop pada antigen yang disuntikkan. Antibodi poliklonal dapat diambil langsung dari serum hewan (Lakna, 2017).

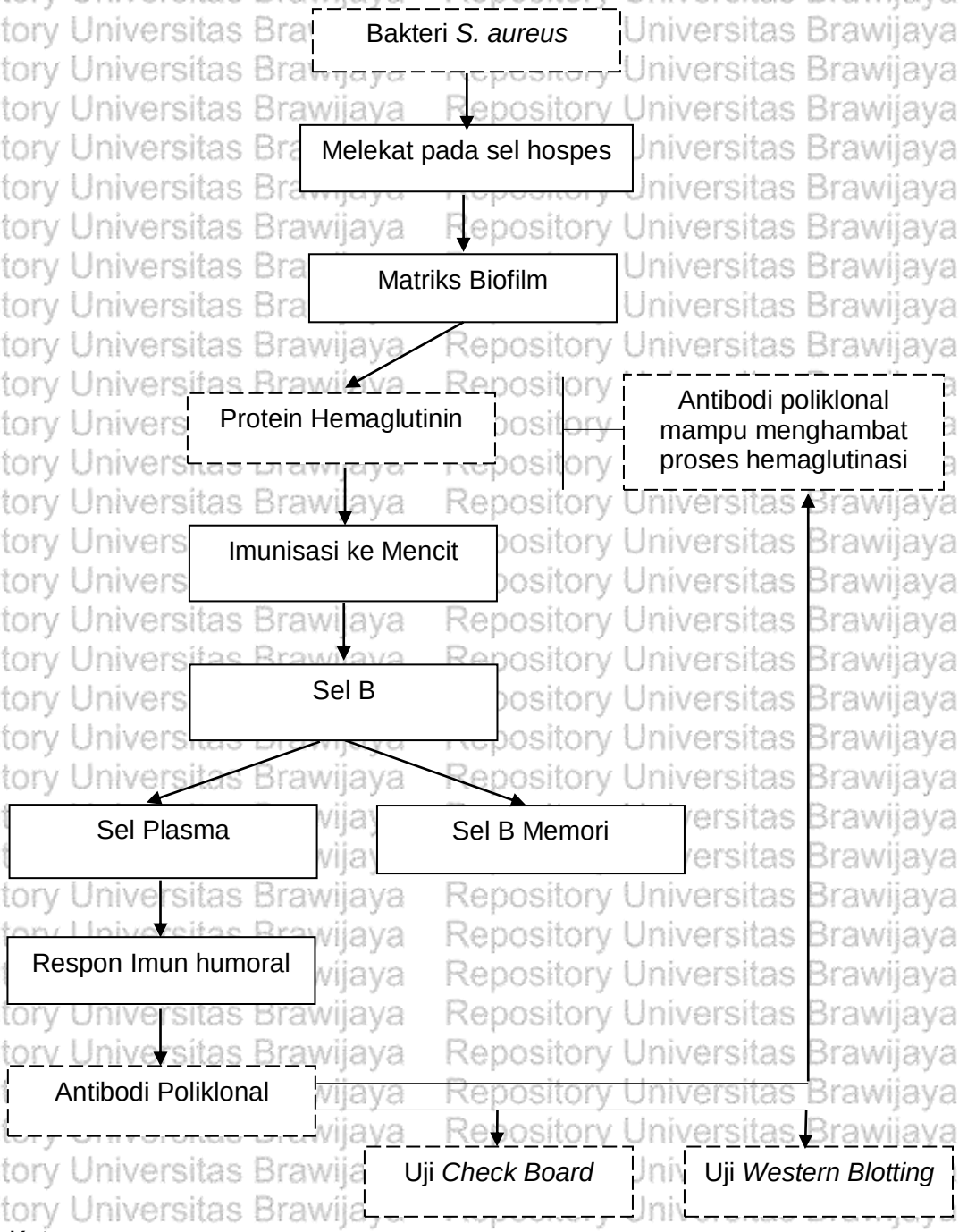
Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) jenis Balb/c betina umur 6-8 minggu. Penggunaan hewan coba mencit jenis Balb/c ini karena hewan tersebut memiliki komponen sistem imun yang mirip Manusia (Santoso, 2002). Selain itu hewantersebut mudah untuk ditangani (Widiyanti*et al.,*2009).Peningkatan respon imun pada hewan coba dapat dipacu dengan menambahkan*adjuvant* pada antigen sebelum disuntikkan. *Complette Freund's*

Adjuvant (CFA) yangmengandung *Mycobacterium tubercolosum* merupakan *adjuvant* yang digunakan padaimunisasi pertama. Adanya *Mycobacterium tubercolosum* akan menstimulasi danmempertinggi respon imun yang spesifik terhadap antigen. Imunisasi kedua menggunakan*Incomplette Freund's Adjuvant* (IFA) yang tidak mengandung *Mycobacterium tubercolosum*untuk menghindari reaksi hipersensitivitas (Syamsuri *et al*., 2013).

Keuntungan dan kerugian dari antibodi poliklonal terutama ditentukan oleh spesifisitas multi-epitopnya. Keuntungan antibodi poliklonal adalah waktu produksi singkat dan biaya rendah.Sangat stabil dan toleran terhadap perubahan pH atau buffer. Afinitas tinggi, karena antibodi mengikat lebih dari satu epitop, mereka dapat membantu memperkuat sinyal dari protein target bahkan dengan tingkat ekspresi rendah. Toleran terhadap perubahan minor antigen. Antibodi poliklonal kurang sensitif terhadap perubahan antigen (sedikit denaturasi, polimorfisme, heterogenitas glikosilasi) daripada antibodi monoklonal. Sedangkan kerugiannya adalah rawan terhadap variabilitas batch ke batch dan banyaknya epitop membuat penting untuk memeriksa *sequence imunogen* untuk setiap reaksi silang (Lakna, 2017).

BAB III

KERANGKA KONSEP



Keterangan :

: Variabel yang di teliti

Gambar 3. 1Kerangka Konsep

Bakteri *S. aureus*merupakan penyebab infeksi nosokomial yang patogen pada manusia karena mempunyaifaktor virulensi seperti biofilm.Proses pembentukan biofilm bakteri *S. aureus*di awali dengan sel-sel planktonik mikroba melekat ke permukaan sel.Sel-sel mikroba mulai berkomunikasi antara satu sama lain oleh produksi sinyal autoinduceryang mengakibatkan ekspresi gen khusus biofilm.Pada penelitian ini Protein Biofilm*S. aureus* di isolasi kemudian di uji hemaglutinasi untuk mengetahui kemampuan Protein Biofilmdalam menghemaglutinasi Eritrosit mencit dan disebut sebagai protein hemaglutinin. Protein hemaglutinin yang berasal dari biofilm di imunisasikan ke mencit jenis Balb/c betina. Antigen ini diharapkan dapat memicu respon imun humoral kemudian mengaktivasi sel B untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel-sel plasma yang mensekresi antibodi. Beberapa sel B berdiferensiasi menjadi sel B memori yang bertahan hidup lama. Antibodi yang terbentuk pada tubuh mencit di isolasi dengan cara mengambil darahnya kemudian dipisahkan bagian serum dan darahnya dengan cara sentrifugasi. Antibodi poliklonal terdapat dalam serum. Disebut poliklonal karena mengandung produk yang berasal dari banyak klon sel B. Antibodi poliklonal yang terbentuk kemudian di uji hambatan hemaglutinasi untuk melihat apakah antibodi poliklonal yang terbentuk mempunyai kemampuan menghambat proses hemaglutinasi dari protein hemaglutinin. Uji c*heck board* antara antigen dan antibodi dilakukan untuk melihat efektifitas respon antibodi terhadap antigen. Uji *western blotting* digunakan untuk melihat respon antibodi poliklonal 22,4 kDa terhadap Protein Biofilm *S. aureus*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah jenis penelitian eksplorasi laboratoris untuk mendapatkan profil Protein Biofilm bakteri *S. aureus* yang di gunakan untuk produksi antibodi poliklonal pada mencit.Semua prosedur yang melibatkan hewan coba sudah sesuai dengan standar etika Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya (No.95/EC/KEPK/03/2017).

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan diLaboratorium Farmakologi, Laboratorium Mikrobiologi danLaboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Waktu penelitian dimulai bulan Maret 2017 sampai dengan Agustus tahun 2018.

4.3 Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri strain *S. aureus*sebanyak 7 sampel yang di peroleh dari laboratorium RSUD Saiful Anwar Malang.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bakteri *S. aureus*

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah Protein Biofilm bakteri *S. aureus*

4.5 Definisi Operasional

1. Bakteri *S. aureus* adalah bakteri yang diperoleh dari laboratorium RSUD Saiful Anwar Malang dan telah dilakukan uji biokimia meliputi uji pada

media BAP, media MSA, pewarnaan Gram, uji katalase dan uji koagulase.

2. Protein Biofilmbakteri *S. aureus*adalah protein yang dihasilkan oleh bakteri *S. aureus*yang di kultur pada media *TSB* + glukosa 2,5%.
3. Antibodi poliklonal adalah antibodi yang diperoleh dari serum mencit yang telah disuntikanProtein Biofilm*S. aureus* 22,4 kDa.

4.6 Alat dan Bahan.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ose bulat, Erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, beaker gelas, objek gelas, tabung eppendorf 1,5 ml, tabung *falcon*, *white tips, yelow tips, blue tips,Freezer,Disposable syringe* 27G, autoklaf, inkubator, lampu spirtus, neraca analitik,mikroskop, *nanodrop spectrophotometer,safety cabinet (Biohazard)*,vortex, sentrifuge, Vertikal elektroforesis, mikroplate V, *Gel doc(Biorad),Dot blotter aparatus(Biorad),Semi Dry Trans Blot Equipment (Biorad)*, Mikropipet, refrigerator,*rotator plate, magnetic stirrer*dan *vacuum rotary evaporator.*

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel bakteri *S. aureus*, mencit jenis Balb/c betina, media *manitol salt agar* (MSA), NaCl Broth, *blood agar plate* (BAP), media *congo red agar* (CRA), larutan standart NaCl fisiologis steril, H_2O_2 3%, kristal violet, lugol, etanol 96%, safranin,*separating gel* 12%, *stacking gel 4*%, buffer Tris-HCl dingin 20 mM, *sample buffer* (RSB), buffer phosphat 0,1 M; 0,2 M, *coomassie brilliant blue, marker Gangnamstainprestained protein ladder, Complete Freund Ajuvant* (CFA), *Incomplete Freund Ajuvant* (IFA), dan *Saturated Ammonium Sulfate* (SAS) 50%, membran *nitrocellulose*, PBST *skim milk* 5%, dan antibodi sekunder *Alkali Phosphatase Conjugated.*

4.7 Prosedur Kerja Penelitian

4.7.1 Identifikasi Bakteri *S. aureus*

Identifikasi bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FKUB untuk tiap-tiap isolat seperti inokulasi pada media BAP, media MSA, pewarnaan Gram, tes katalase, dan tes koagulase. Proses ini dilanjutkan dengan menginokulasi bakteri pada media CRAuntuk melihat apakan *strain* yang digunakan merupakan *strain* pembentuk biofilm (Benson, 2001; Harley and Prescott, 2002).

4.7.1.1 Pewarnaan Gram

Sediaan bakteri di buat dengan mencampurkan larutan NaCl fisiologis yang di teteskan pada objek gelas dengan satu koloni bakteri menggunakan ose dari media BAP kemudian di buat hapusan setipis mungkin, di keringkan dan di fiksasi di atas lampu spiritus. Sediaan di tetesi dengan larutan kristal violet selama 1 menit, dibilas dengan air. Kemudiansediaan ditetesi dengan larutan lugol selama 1 menit, dibilas dengan air.Kemudian sediaan ditetesi dengan larutan alkohol 96% selama 30 detik, dibilas dengan air. Selanjutnya sediaan di tetesi dengan zat warna penutup safranin selama 1 menit, bilas dengan air. Kemudian dikeringkan dan siap untuk dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif 100 x menggunakan oil imersi. Hasilnya bakteri Gram positif akan berwarna ungu dan bakteri Gram negatif akan berwarna merah (Kumar, 2012).

4.7.1.2 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan cara meneteskan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% pada gelas obyek yang bersih dan kering. Di ambil biakan kuman menggunakan ose kemudian dioleskan pada gelas obyek yang sudah ditetesi hidrogen peroksida. Suspensi dicampur secara perlahan menggunakan

osesambil di amati.Hasilpositif ditandai oleh terbentuknya gelembung-gelembung udara (Benson, 2001).

4.7.1.3 Uji Koagulase

Uji koagulase di lakukan dengan cara setetesaquadest atau NaCl fisiologis steril diletakkan pada objek gelas, kemudian ditambahkan satu ose biakan, disuspensikan. Diambil Setetes plasma sitrat diletakkan di dekatsuspensi biakan tersebut, keduanya dicampurdengan menggunakan ose dan kemudiandigoyangkan. Reaksi positif terjadi apabila dalamwaktu 2-3 menit terjadiaglutinasi plasma sitrat (Lebofe and Pierce, 2011).

4.7.2 Uji Pembentukan Biofilm

4.7.2.1 Uji Kualitatif Dengan Metode *Congo Red Agar*

Metode *Congo red Agar* (CRA) adalah metode skrining secara kualitatif untuk mendeteksi bakteri *S. aureus* dalam memproduksi biofilm. Media yang digunakan terdiri dari *brain heart infusion broth* (BHIB) (37 g/l) yang di tambahkan dengan sukrosa (50 g/l), agar No 1 (10g/l) dan *Congo red* (0.8 g/l).Hasil positif ditandai dengan terbentuknya pigmen koloni berwarna hitam, sedangkan koloni berwarna merah merupakan biofilm negatif (Freeman *et al*., 1989).

4.7.2.2 Uji Kuantitatif Dengan Metode Tabung

Metode tabung dilakukan sesuai dengan yang dijelaskan oleh Christensen *et al* 1982. Satu ose organisme uji diinokulasi dalam 10 mL *trypticase soy broth (TSB)* dengan glukosa 1% dalam tabung reaksi. Tabung diinkubasi pada 37 ºC selama 24 jam. Setelah inkubasi, tabung dicuci dan dilarutkan dengan *phosphat buffer saline* (PBS) pH 7.3 dan dikeringkan. Tabung kemudian diwarnai dengan kristal violet 0,1% selama 15 menit. Sisa zat warna di buang dan dicuci dengan aquadest. Tabung dikeringkan dalam posisi terbalik.

Pembentukan biofilm dianggap positif ketika film yang terlihat berjajar di dinding dan bagian bawah tabung. Untuk mengetahui intensitas warna pada area dinding dan bagian bawah tabung digunakan program aplikasi *Adobe Photoshop CS6*untuk mengukur nilai *mean gray value.*

4.7.2.3 Cara Pengukuran *Mean Gray Value*

Langkah-langkah untuk mengetahui intensitas warna pada area dinding dan bawah tabung pada penelitian ini adalah menggunakan program *Adobe Photoshop CS6*. Pertama buka aplikasi *Adobe Photoshop CS6,* pilih file dan masukan hasil foto yang akan dilihat hasil nilai *mean gray value* nya, selanjutnya pilih *measurenment log.* Blok area yang akan dilihat intensitas warnanya dengan menggunakan *rectangular marquee tool,* klik *record measurenment,* maka nilai *mean gray value* didapatkan.Nilai*mean gray value* yang didapatkan merupakan nilai rerata dari intensitas warna pada pengecatan tabung. Semakin pekat warna biofilm yang terbentuk pada tabung penelitian maka semakin kecil hasil nilai *mean gray value*. Sebaliknya jika warna biofilm semakin terang dan tipis maka semakin besar hasil nilai *mean gray value*.

4.7.3 Isolasi Protein BiofilmBakteri*S. aureus*

Isolasi bakteri yang digunakan untuk kontrol *(whole cell S. aureus)* dilakukan inokulasi pada media *Nutrient Broth* (NB) di inkubasi pada suhu 37ºC selama 24 jam. Setelah 24 jam bakteri yang tumbuh pada media NB di sentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit pada 4ºC. Supernatan dibuang dan *pellet* di gunakan untuk runing di SDS PAGE (Herlina *et al*., 2015). Untuk memproduksi biofilm,Bakteri *S. aureus*yang menghasilkan biofilm ditumbuhkan pada media TSB + glukosa 2,5 % pada suhu 37°C selama 48 jam (Chamdit and Siripermpool, 2012).

Isolasi Protein Biofilm bakteri *S. aureus* menggunakan metode *chloroformmethanol precipitation* menurut Wessel and Flugge (1984).

1. Siapkan sampel yang telah di kultur pada media TSB + glukosa 2,5 % pada suhu 37°C selama 48 jam sebanyak 100 µl/1 mL dalam microtube/valcon, tambahkan 400 µl/4 mL metanol kemudian vortex
2. Tambahkan 100 µl/1 mL kloroform, vortex.
3. Tambahkan 300 µl/3 mL H_2O bidest, vortex.
4. Sentrifuge dengan kecepatan 14.000 g selama satu menit untuk memisahkan fase. Tiga fase/lapisan akan terlihat. Urutan lapisan dari yang paling atas adalah lapisan H_2O-metanol, protein dan kloroform.
5. Hilangkan lapisan yang paling atas dengan hati-hati tanpa menyentuh bagian protein.
6. Tambahkan 300 µl/3 mL metanol ke fase yang tersisa, vortex
7. Sentrifuge dengan kecepatan 14.000 g selama dua menit untuk menghasilkan *pellet* protein.
8. Hilangkan bagian supernatan dengan hati-hati dan keringkan *pellet* (Sampai tidak ada bau kloroform yang dapat dideteksi lagi).
9. *Pellet* kering sekarang dapat dilarutkan dalam buffer yang sesuai untuk pemrosesan lebih lanjut misalnya, buffer Laemmli untuk pemisahan SDS-PAGE.

4.7.4 *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

Monitoring berat molekul dikerjakan dengan menggunakan SDS-PAGE metode Laemli (1970). Sample protein dipanaskan 100ºC selama 5 menit dalam larutan penyangga yang mengandung 5 mM Tris pH 6,8; 5% 2-*mercapto ethanol*;

2,5% w/v *sodium dodecyl sulfate*, 10% v/v *glycerol* dengan menggunakan warna pelacak *bromophenol blue*. Dipilih mini slab 12 % mini slab gel dengan *tracking gel* 4%. Voltase aliran listrik yang digunakan adalah 120 mV. Sebagai bahan pewarna yang digunakan adalah *coomassie brilliant blue* dan marker protein menggunakan *Gangnam-stain™ prestained protein ladder marker*.Setelahdilakukan perhitungan berat molekul proteinkemudian dilakukan permurnian protein target denganelektroelusi dan dialisis.

4.7.5 Elektroelusi dan Dialisis

Elektroelusi dilakukan dengan memotong gel hasil *running* SDS-PAGEsesuai dengan berat molekul yang di inginkan. Protein yang terpotong diletakkan dalam cawan petri berisi *running buffer* agar geltidak mengering.Geldengan protein 22,4 kDa dimasukkan dalam kantong selofan, kemudian ditambahkan *buffer* fosfat 0,2 M. Gel dalam kantong selofan yang mengandung protein 22,4 kDa dimasukkan ke dalam *chamber* elektroelusi yang berisi *buffer* fosfat 0,1 M, lalu dielektroelusi pada 250 V, 20 mA selama 60 menit, kemudian kantong selofan diangkat dari *chamber* elektroelusi dan siap untuk didialisis. Dialisis dilakukan dengan memasukkan selofan terelektroelusi ke dalam beaker glass yang berisi *PBS* steril yang kemudian di aduk dengan *stirrer* dalam suhu 4ºC selama 24 jam. Setelah 24 jam selofan dibuka dan protein yang berada di dalamnya dikoleksi dan ditempatkan dalam tabung eppendorf. Protein ditambahkan dengan etanol absolut dingin dengan perbandingan volume sebesar 1:1 dan disimpan pada 4 ºC selama 24 jam. Setelah 24 jam, eppendorf disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit dalam suhu 4 ºC. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang, dan endapat dikering-anginkan, lalu ditambahkan dengan *buffer* Tris-Cl dengan perbandingan 1 : 1, lalu disimpan

pada suhu -20º C(Agustina*et al.,* 2012).Sebelum pelet digunakan untuk imunisasi pada hewan coba di lakukan uji hemaglutinasi untuk melihat kemampuan protein tersebut dalam mengaglutinasi Eritrosit mencit. Titer HA tertinggi di pilih untuk digunakan dalam imunisasi pada hewan coba.

4.7.6 Tahapan Uji Hemaglutinasi

4.7.6.1 Pengambilan Darah Mencit

Mencit yang diinginkan dikoleksi dari laboratorium parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawjaya, Malang. Mencit yang sudah dikoleksikemudian dianastesi menggunakan Kloroform hingga tidak didapatkan tanda pernafasan. Sumber pengambilan darah untuk uji hemaglutinasi adalah jantung mencit. Jantung mencit diakses dengan memotong abdomen mencit menurut garis sagital hingga sampai ke batas bawah dinding *thorax* mencit (diafragma mencit). Diafragma yang terlihat kemudian disobek hingga jantung dapat terlihat.Darah kemudian dievakuasi dari jantung mencit sebanyak 1 cc denganmenggunakan *disposable syringe* insulin ukuran 27 G yang diambil dari bagian ventrikelkanan jantung mencit karena bagian ini adalah bagian yang paling mudah diakses.

4.7.6.2 Pembuatan Suspensi Eritrosit Mencit 0,5%

Darah dimasukkan ke dalam tabung berisi *EDTA* dan ditambah dengan *PBS* sampai 10 ml. Setelah itu, tabung digoyang perlahan agar campuran menjadi homogen.Homogenat yang terbentukdisentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit. Supernatanyang didapat dari hasil sentrifugasi ini dibuang, dan pellet (endapan) yangada ditambah dengan *PBS.* Langkah ini diulangi sebanyak tiga kali atauhingga supernatan hasil sentrifugasi terlihat jernih.Pelet (Eritrosit) yang didapat dari proses ulangan ke-tiga

diambilsebanyak 50µl dan ditambah *PBS* hingga volumenya mencapai 10ml.Suspensi Eritrosit dalam *PBS* siap digunakan untuk uji hemaglutinasi.

4.7.6.3 Uji Hemaglutinasi

Uji hemaglutinasi di lakukan dengan cara mula mula Eritrosit dicuci dengan PBS pH 7,4 di sentrifuge dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit (dicuci 3x). Pada sumur satu sampai sumur ke dua belas dari mikroplate V dimasukkan 50 µl PBS. Kedalam sumur1 ditambahkan 50 µl sampel, selanjutnya dibuat pengenceran serial kedalam sumur berikutnya sampai sumur 10.Sumur12 digunakan sebagai kontrol negatif (tanpa diberi sampel). Kemudian kedalam masing-masing sumur ditambahkan 50 µl suspensi Eritrosit, digoyang menggunakan rotator plate selama 1 menit kemudian didiamkan suhu kamar (27ºC) sampai terlihat hasilnya. Hasil uji hemaglutinasi untuk sampel dibaca apabila pada sumur kontrol negatif sudah terlihat hasilnya yaitu Gambaran bentuk noda merah (McGarey and Allred, 1994).

4.7.7 Produksi Antibodi Poliklonal

Penyiapan mencit (*Mus musculus*), Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah Balb/c betina umur 6 - 8 minggu. Sebanyak 5 ekor digunakan untuk imunisasi antigen Protein Biofilm.Protein Biofilm22,4 kDa yang telah di isolasi diukur kadar proteinnya dengan*nanodrop spectrophotometer*selanjutnya di*aliquot* masing - masing menjadi 100 µg/mL dalam *ependorf*,kemudian disimpan pada suhu -20ºC.Sebelum di suntikan pada mencit, Protein Biofilm 22,4 kDa di emulsikan dengan *Complete Freund's Adjuvant (CFA)* dengan perbandingan 1 : 1,lalu di vortex hingga terbentuk emulsi, kemudian disuntikkan ke mencit dengan dosis 10 µg/0,2 ml secara intraperitonial.Minggu ke 2 dan ke 3 di booster menggunakan antigen yang sama

dan diemulsikan dengan *Incomplete Freund's Adjuvant (IFA)* dengan perbandingan 1 : 1 dengan dosis yang sama secara intraperitonial**.** Minggu ke 4 dilakukan booster dengan Antigen yang sama tanpa adjuvant sejumlah 200 µl disuntikan secara intraperitonial.Pengambilan serum mencit dilakukan seminggu setelah mencit diimunisasi terakhir.Prosedur isolasi serum adalah dengan mengambil darah mencit yang sudah diimunisasi dengan antigen biofilm sebanyak 1ml, lalu dibiarkan selama 1-1,5 jam atau hingga darah dan serum terpisah, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit pada suhu ruang. Dari proses sentrifugasi, didapatkan pemisahan antara presipitat dan supernatan. Presipitat (yang berisi sel darah) dibuang, sedangkan supernatan (yang berupa serum) siap digunakan untuk prosedur selanjutnya(Liddell and Cryer, 1991;Swacita *et al*., 2015). Serum yang di dapat kemudian dilakukan purifikasi.

4.7.8 Purifikasi Serum

Purifikasi serum dilakukan dengan menambahkan *Saturated Ammonium Sulfate* (SAS) 50% dengan perbandingan volume 1 : 1, lalu dibiarkan ± 30 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4ºC selama 10 menit. Dari proses sentrifugasi, didapatkan pemisahan antara supernatan dan presipitat. Supernatan dibuang. Presipitat dicuci dengan SAS 50% 10x volume, lalu di-*vortex*, kemudian disentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 4ºC selama 10 menit. Dari proses sentrifugasi, didapatkan pemisahan antara supernatan dan presipitat. Supernatan dibuang, presipitat dilarutkan dalam *buffer fosfat* 0,2 M, pH 7 dengan perbandingan 1 : 1, lalu dimasukkan dalam kantong selofan, kemudian didialisis menggunakan *buffer fosfat* 0,1, pH 7 selama 12 jam pada kondisi dingin. *Buffer fosfat* ditambahkan dengan etanol absolut dingin, lalu diinkubasi

dalam *refrigerator* selama 1 jam atau sampai terlihat endapan, kemudian disentrifugasi dingin dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit, lalu didiamkan dalam *freezer* selama ± 15 menit. Dari proses sentrifugasi, didapatkan pemisahan antara supernatan dan *pellet*. Supernatan dibuang, *pellet*dikeringkan dengan diangin-anginkan, lalu ditambahkan dengan *buffer* Tris-Cl dengan perbandingan 1 : 1, lalu disimpan pada suhu -20ºC(Howard and Bethell, 2001). *Pellet* ini merupakan antibodi terhadap Protein Biofilm, dan siap digunakan untukuji *cheak board*dan w*estern blotting*.

4.7.9 Uji Hambatan Hemaglutinasi

Menggunakan mikroplate V, ke dalam masing masing sumur dimasukkan larutan PBS pH 7.4 sebanyak 50 µl. Selanjutnya pada sumur ke-1 ditambahkan serum (antibodi poliklonal 22,4 kDa) sebanyak 50 µl dan dilakukan pengenceran serial sampai sumur ke-10. Sesudah itu ke dalam masing masing sumur dimasukkan Protein Biofilm (kadar sesuai dengan titer uji HA tertinggi) sebanyak 50 µl sampai sumur ke-10. Kemudian ke dalam masing-masing sumur pada mikroplate V tersebut ditambahkan suspensi Eritrosit mencit 0,5% sebanyak 50 µl, digoyang selama 5 menit. Mikroplate V didiamkan pada suhu kamar sampai hasilnya terlihat. Sumur ke -11 digunakan sebagi kontrol hemaglutinasi negatif berisi serum dan Eritrosit tanpa Protein Biofilm, sedangkan sumur ke-12 digunakan sebagai kontrol hemaglutinasi positif berisi Protein Biofilm dan Eritrosit tanpa penambahan serum (Santoso, 2002).

4.7.10 Uji *Cheack Board*

Uji *check board* digunakan untuk melihat efektifitas terjadinya reaksi antara antigen dan antibodi yang akan diuji. Uji *check board* dilakukan menggunakan metode *dot blot* dengan mereaksikan antigen dan antibodi yang

sudah diproduksi. Antigen diencerkan dengan pengenceran 1/10 - 1/640, sedangkan antibodi poliklonal 22,4 kDa dengan pengenceran 1/100 - 1/1000. Metode *dot blot* dilakukan dengan cara membran nitrocellulose (NC) direndam terlebih dahulu dalam H_2O steril selama 30 menit. Kemudian membran NC diletakan dalam *dot blotter apparatus (Biorad)*. Melalui lubang alat, membran yang telah dibasahi dengan TBS, ditetesi dengan antigen 50 µl, diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Selanjutnya dilakukan *blocking* dengan *blocking buffer* TBS, diinkubasi semalam pada suhu 4°C, larutan *blocking* dibuang. Membran ditetesi antibodi primer sebanyak 50 µl, diinkubasikan selama 2 jam pada suhu ruang dan diletakkan di atas *shaker.* Larutan *blocking* dibuang, kemudian dicuci 3 kali dengan TBS-Tween-20 0,05 %. Ditambahkan antibodi sekunder dengan pengenceran 1:1000 dalam larutan TBS, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam, diatas shaker. Dicuci lagi 3 kali dengan TBS Tween-20 0,05 %. Selanjutnya ditambahkan substrat berkromogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan H_2O. Hasil positif apabila terbentuk dot-dot pada membran nitrocellulose. Kualitas hasil dilihat berdasarkan gradasi warna. Pada pengenceran yang menghasilkan gradasi warna tebal merupakan pengenceran yang paling efektif terjadinya reaksi. Pengencerantersebut kemudian digunakan sebagai dasar untuk uji western blot (Harlow and Lane, 1988).

4.7.11 Uji *Western Blotting*

Pemeriksaan *western blotting* menggunakan metode Towbin (1979). Lembaran gel hasil SDS-PAGE yang mengandung pita protein dipindahkan pada kertas *nitrocellulose* menggunakan *semi dry trans blot equipment* buatan Biorad. Aliran listrik yang digunakan sebesar 300 mA, 20 V selama 120 menit. Kemudian

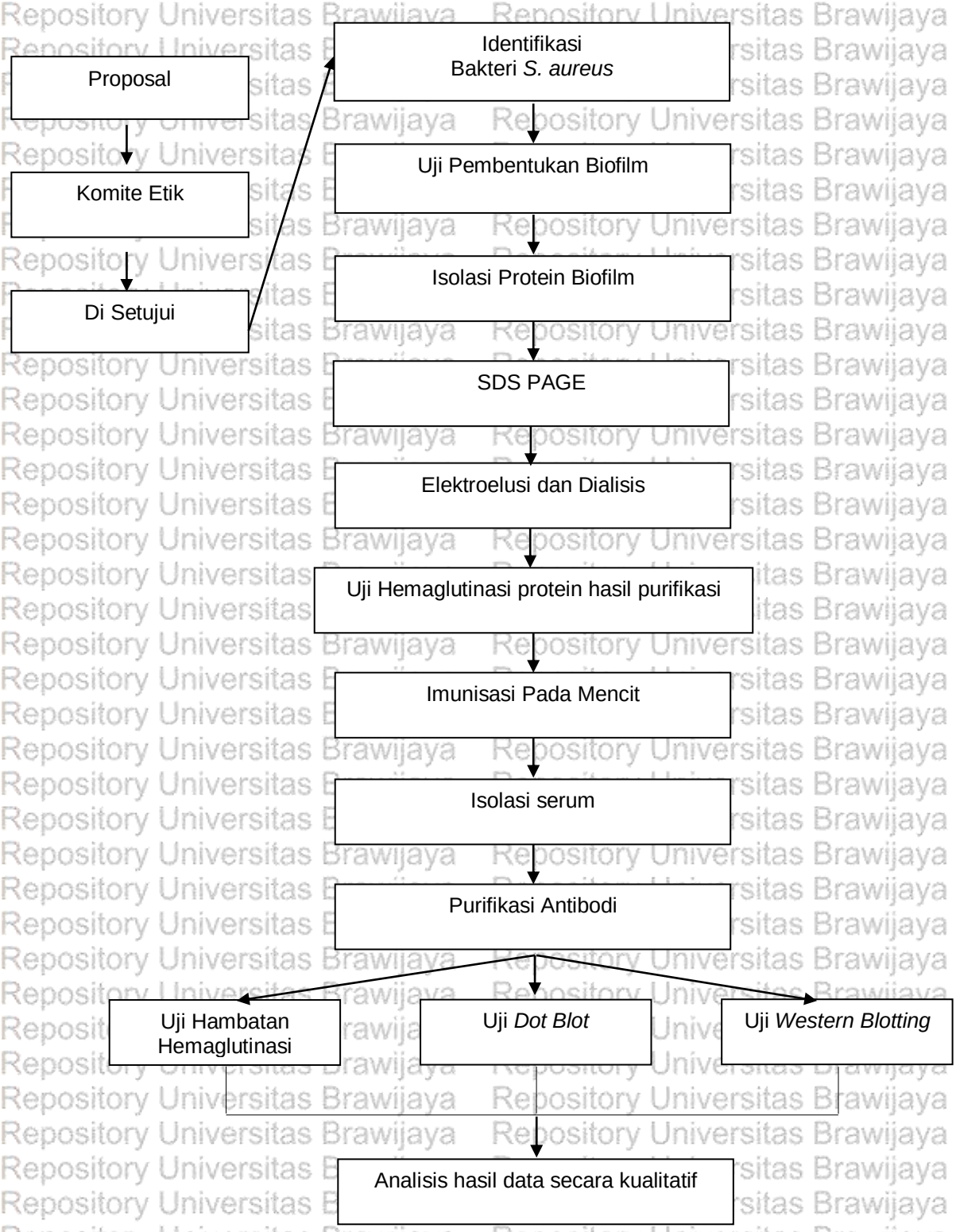
dilakukan pengecatan menggunakan pewarna ponco 2% yang mengandung TCA sampai konsentrasi mencapai 30%. Sebagai petanda untuk menentukan bobot molekul protein hasil pemeriksaan *western blotting* maka menggunakan lajur yang berisi protein petanda (marker). Pada setiap pita protein petanda tersebut ditusuk dengan jarum supaya tidak kehilangan jejak oleh karena pada waktu dibilas dengan air warna tersebut tidak tampak. Untuk menghilangkan warna ponco dibilas dengan H_2O. Selanjutnya *diblocking* dengan TBS- skim milk 5 %, diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Membran NC dicuci dengan larutan TBS pH 7,4 - Tween 20 0,05 %, kemudian *ditapping* pada tisue hingga tidak ada larutan tersisa, ulangi langkah ini sebanyak 3 x 3 menit. Selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer (antibodi poliklonal)dengan konsentrasi 1/300 dalam pelarut TBS pH 7,4 - BSA 1% inkubasi selama 2 jam. Membran dicuci lagi dengan larutan TBS - Tween 20 0,05 %, kemudian *ditapping* pada tisue hingga tidak ada larutan tersisa, ulangi langkah ini sebanyak 3 x 3 menit. Selanjutnya diinkubasi dengan antibodi sekunder (IgG-*anti mouse label biotin)* dengan konsentrasi 1/1000 dalam pelarut TBS pH 7,4 - BSA 1% selama 2 jam. Membran dicuci dengan larutan TBS pH 7,4 - Tween 20 0,05 % sebanyak 3 x 5 menit, di *shaker* pelan. Diinkubasidengan SAHRP selama 40 menit, dicuci dengan TBS-Tween 20 0,05% selama 3x5 menit. Membran direndam dalam substratTMB sampai muncul pita protein lalu distop dengan aquades. Membran dikering anginkan dan segera scan untuk mendapatkan hasil (Towbin*et al.,* 1979).

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh di analisa menggunakan analisa data deskriptif untuk melihat profil Protein Biofilm pada bakteri *S. aureus*, uji hemaglutinasi, uji

hambatan hemaglutinasi,uji *cheack board (dot blot)*dan uji *werstern blot*.Hasil akanditampilkan dalam bentuk Tabel danGambar.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4. 1 Alur Penelitian

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Identifikasi Bakteri *S. aureus*

Dari hasil identifikasi sampel bakteri yang di peroleh dari RSUD Saiful Anwar malang di peroleh data seperti pada Tabel 5.1

Tabel 5. 1Hasil Identifikasi Bakteri *S. aureus*

No	Kode Sampel	Hasil Uji					Keterangan
		BAP	Gram	Katalase	Koagulase	MSA	
1	S1	Hemolisa β	+	+	+	Koloni kuning	*S. aureus*
2	S2	Hemolisa β	+	+	+	Koloni kuning	*S. aureus*
3	S3	Hemolisa β	+	+	+	Koloni kuning	*S. aureus*
4	S4	Hemolisa β	+	+	+	Koloni kuning	*S. aureus*
5	S5	Hemolisa β	+	+	+	Koloni kuning	*S. aureus*
6	S6	Hemolisa β	+	+	+	Koloni kuning	*S. aureus*
7	S7	Hemolisa β	+	+	+	Koloni kuning	*S. aureus*

Hasil identifikasi bakteri *S. aureus*(Tabel 1), sampel S1-S7 membentuk hemolisa β pada media BAP, gram positif, uji katalase positif dan uji koagulase positif, hal ini menunjukan bahwa sampel S1-S7 adalah bakteri *S. aureus*.

5.2 Hasil Uji Pembentukan Biofilm

5.2.1 Metode *Congo Red Agar*

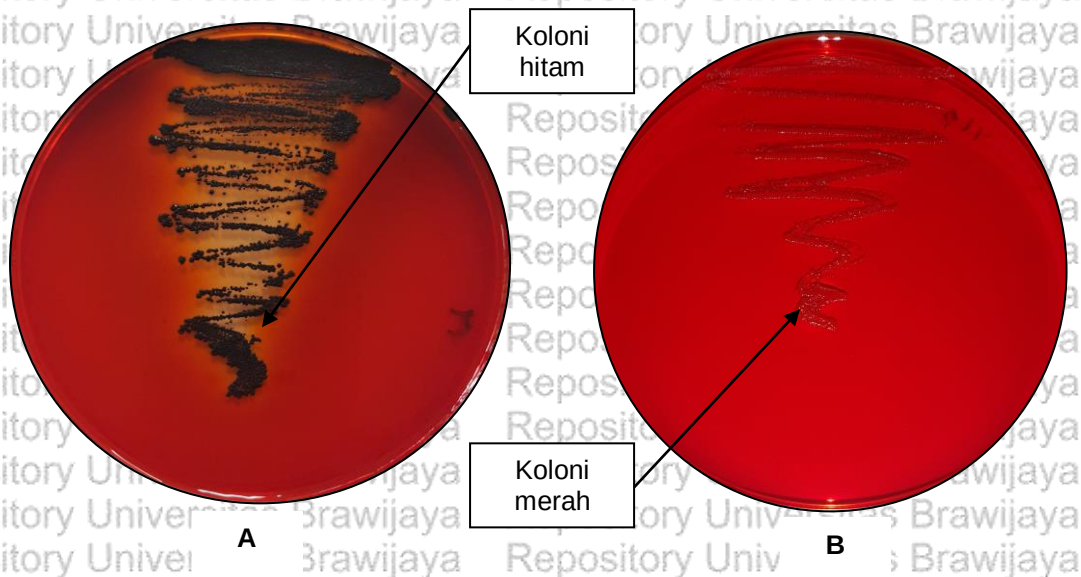
Dari hasil pemeriksaan biofilm dengan metode CRA di peroleh data seperti pada Tabel 5.2 dan Gambar 5.1

Tabel 5. 2Hasil Uji Pembentukan Biofilm Metode CRA

No	Kode Sampel	Media CRA	Hasil uji Metode CRA
1	S1	koloni warna hitam	Positif (+)
2	S2	Koloni warna hitam	Positif (+)
3	S3	koloni warna hitam	Positif (+)
4	S4	Koloni warna hitam	Positif (+)
5	S5	Koloni warna hitam	Positif (+)
6	S6	Koloni warna hitam	Positif (+)
7	S7	Koloni warna hitam	Positif (+)

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Hasil positif uji pembentukan biofilm metode CRA di tunjukan oleh koloni yang berwarna hitam seperti Gambar 5.1 di bawah ini :



Gambar 5. 1Hasil uji pembentukan biofilm metode CRA.A. Gambarkoloni bakteri *S. aureus* yang memproduksi biofilm (koloni berwarna hitam). B. Gambarkoloni bakteri *S. aureus* yang tidak memproduksi biofilm (koloni berwarna merah).

Hasil uji pembentukan biofilm metode CRA terhadap 7 sampel terdapat pada (Tabel5.2). Sampel S1-S7 membentuk koloni berwarna hitam pada media CRA (Gambar 5.1). Hal ini menunjukan bahwa semua sampel S1-S7 positif membentuk biofilm. Untukmengetahui bakteri yang memproduksi biofilm paling tinggidilanjutkan dengan metode tabung untuk melihat densitas warna biofilm yang menempel pada dinding dan bagian bawah tabung dengan menggunakan program *Adobe photoshop CS6.*

5.2.2 Metode Tabung

Hasil pengukuran nilai mean biofilm dari metode tabung menggunakan program *Adobe Photoshop CS6* seperti pada Tabel 5.3

Tabel 5. 3 Hasil Uji Pembentukan Biofilm Metode Tabung

No	Kode Sampel	Metode Tabung (Nilai *Mean)*
1	S1	82,80
2	S2	122,15
3	S3	93,09
4	S4	87,58
5	S5	86,38
6	S6	72,49
7	S7	83,95

Hasil positif uji pembentukan biofilm metode tabung di tunjukan oleh adanya film yang menempel pada dinding dan bagian bawah tabung seperti Gambar 5.1 di bawah ini :

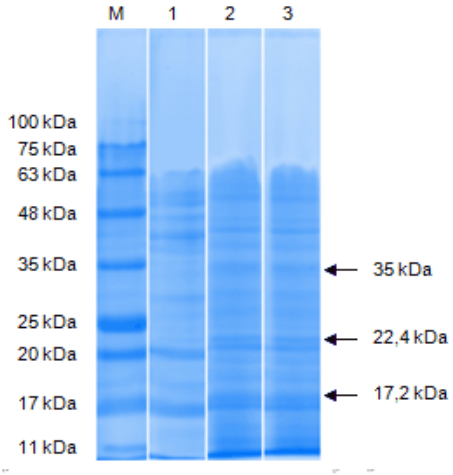
Gambar 5. 2 Hasil uji metode tabung

Untuk mengetahui densitas warna pada area dinding dan bagian bawah tabung digunakan program *Adobe Photoshop CS6.*Hasil uji pada metode tabung berdasarkan nilai densitasnya terdapat pada Tabel(5.3).Jika semakin pekat

warna biofilm yang terbentuk pada tabung penelitian maka semakin kecil nilai *mean gray value*. Sebaliknya jika warna biofilm semakin terang dan tipis maka semakin besar nilai *mean gray value*. Hasil uji metode tabung didapatkan nilai terendah pada sampel S6 dengan nilai 72,49. Artinya sampel S6 adalah bakteri yang memproduksi biofilm paling tinggi. Sehingga sampel S6 ini yang digunakan untuk isolasi Protein Biofilm.

5.3 SDS-PAGE

Untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya di gunakan metode SDS PAGE. Hasil uji SDS PAGE profil Protein Biofilm bakteri *S. aureus* terlihat seperti pada Gambar5.3

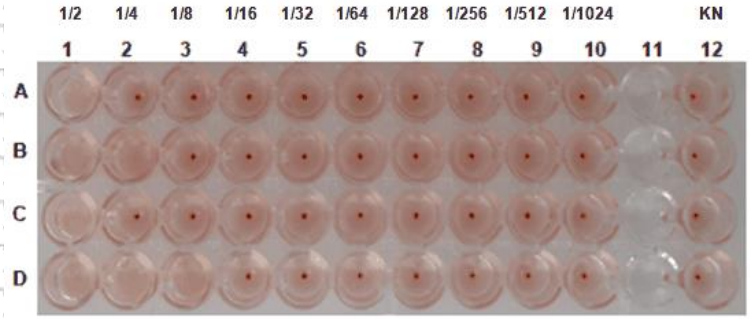


Gambar 5.3 Hasil uji SDS-PAGE.M : Marker, 1 : *Whole cell S. aureus*, 2,3 : Protein Biofilm*S. aureus*.

Profil Protein Biofilm bakteri *S. aureus* terlihat seperti (Gambar 5.3) pada lajur 2 dan 3 berisi Protein Biofilm*S. aureus*menghasilkan 3 pita protein yang di asumsikan sebagai protein yang berasal dari biofilm dengan berat molekul 35 kDa, 22,4 kDa dan 17,2 kDa yang tidak dimiliki oleh *whole cel S. aureus.*Hasil purifikasi elektroelusi dari ke tiga protein tersebut dilakukan uji hemaglutinasi.

5.4 Hasil Uji Hemaglutinasi

Protein Biofilm hasil purifikasi elektroelusi (Protein Biofilm 35 kDa, 22,4 kDa dan 17,2 kDa) di lakukan uji hemaglutinasi untuk melihat kemampuan Protein Biofilm tersebut dalam mengaglutinasi Eritrosit mencit.Adapun hasil uji hemaglutinasi terhadap Protein Biofilm 35 kDa, 22,4 kDa, 17,2 kDa dan *crude*Protein Biofilm seperti Gambar 5.4



Gambar 5. 4 Hasil uji hemaglutinasi.A : Protein Biofilm 29,8 kDa, B : Protein Biofilm 22,4 kDa, C : Protein Biofilm 17,2 kDa, D : *crude*Protein Biofilm, KN : kontrol negatif.

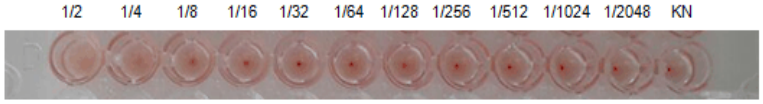
Dari hasil uji hemaglutinasi tersebut ternyata ada perbedaan dalam aglutinasi Eritrosit mencit. Pada Protein Biofilm BM 35 kDaterjadi aglutinasi pada titer ½, pada Protein Biofilm 22,4 kDa nampak aglutinasi pada pada titer 1/4.Protein Biofilm 17,2 kDa dapat mengalami aglutinasi pada titer 1/2. Sedangkan pada *crude*Protein Biofilm terjadi aglutinasi pada titer 1/8. Protein 22,4 kDa di pilih untuk menghasilkan antibodi poliklonal pada mencit karena mempunyai titer tertinggidibandingkan dengan Protein Biofilm yang di purifikasi (35 kDa, 22,4 kDa dan 17,2 kDa).

5.5 Hasil Uji Hambatan Hemaglutinasi

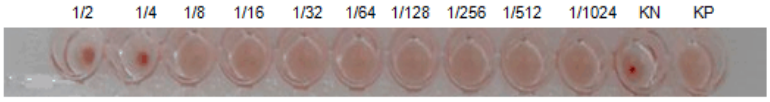
Uji hambat hemaglutinasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan antigen poliklonal*S. aureus* 22,4 kDa dalam menghambat proses hemaglutinasi Eritrosit mencit. Hasil uji hambat hemaglutinasi dinyatakan positif jika terjadi

endapan Eritrosit mencit seperti yang terdapat pada sumur kontrol negatif, sedangkan pada sumur yang tidak menunjukan adanya endapan tetapi terjadi aglutinasi (penggumpalan) di nilai negatif. Sebelum melakukan uji hambatan hemaglutinasi, dilakukan uji hemaglutinasi Protein Biofilm terlebih dahulu untuk menentukan titer Hemaglutinasi dari protein tersebut yang akan di jadikan dasar atau gunakan dalam uji hambatan hemaglutinasi antibodi poliklonal terhadap Protein Biofilm bakteri *S. aureus.*

Adapun hasil uji hemaglutinasi dan uji hambatan hemaglutinasi seperti pada Gambar 5.5 dan Gambar 5.6



Gambar 5. 5 Hasil uji hemaglutinasi Protein Biofilm*S. aureus*.Angka ½ - 1/2048: menunjukan besar titer (pengenceran) sampel pada uji hemaglutinasi. KN = Kontrol Negatif, Sampel berupa crude Protein BiofilmProtein Biofilm*S. aureus* dan hasilnya positif pada titer 1/4Titer antigen tersebut yang di gunakan untuk uji hambat hemaglutinasi.

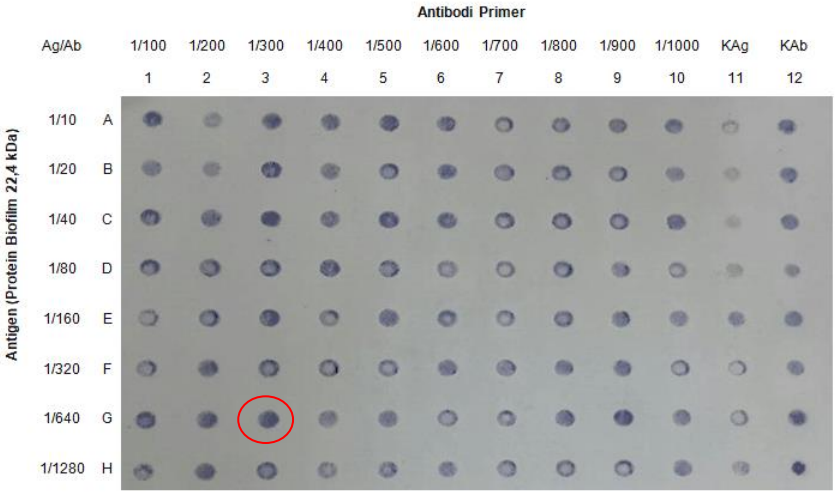


Gambar 5. 6 Hasil Uji hambatan hemaglutinasi. Angka ½ - 1/1024 : menunjukan besar titer (pengenceran) sampel. KN = Kontrol Negatif, KP = Kontrol Positif. Sampel berupa serum (antigen poliklonal*S. aureus* 22,4 kDa) positif pada titer ¼.

5.6 Hasil Uji *Check board*

Uji *check board* digunakan untuk melihat efektifitas terjadinya reaksi antara antigen(Protein Biofilm 22,4kDa) dan antibodi (antibodi poliklonal 22,4 kDa)yang akan diuji. Uji *check board* dilakukan menggunakan metode *dot blot* dengan mereaksikan antigen dan antibodi yang sudah diproduksi. Antigen diencerkan dengan pengenceran 1/10 - 1/640, sedangkan antibodi poliklonal 22,4 kDa dengan pengenceran 1/100 - 1/1000.

Hasil uji *check board* (metode *dot blot*)secara kualitatif terdapat pada Gambar5.7 :



Gambar 5. 7Hasil uji *check board* antara antigen Protein Biofilm 22,4 kDa dan antibodi Protein Biofilm 22,4 kDa*S. aureus*.Kolom 1 – 10 adalah pengenceran antibodi 1/100 – 1/1000, kolom 11 : KAg (kontrol Antigen) kolom 12 : KAb (Kontrol Antibodi), Baris A – H adalah pengenceran antigen (1/10 – 1/1280).

Dari hasil uji *check board (dot blot)* pada (Gambar 5.7)menunjukkan dot reaksi antara antigen Protein Biofilm 22,4 kDadengan antibodi Protein Biofilm 22,4 kDamenunjukkan reaksi positif, yang ditandai dengan timbulnya warnanoda keunguan.Sedangkan pada dot kontrol antigen dan kontrol antibodi menunjukkanintensitas warna yang lemah.Hasil reaksi *check board* dilakukan kuantifikasi dengan mengukurdensitas warna ungu menggunakan program*Adobe Photoshop CS6*, hasilnya seperti pada (Tabel 5.4).

Tabel 5. 4Hasil Uji *Check Board* antara Antigen Protein Biofilm 22,4 KDA dan Antibodi Protein Biofilm 22,4 kDa*S. aureus.*

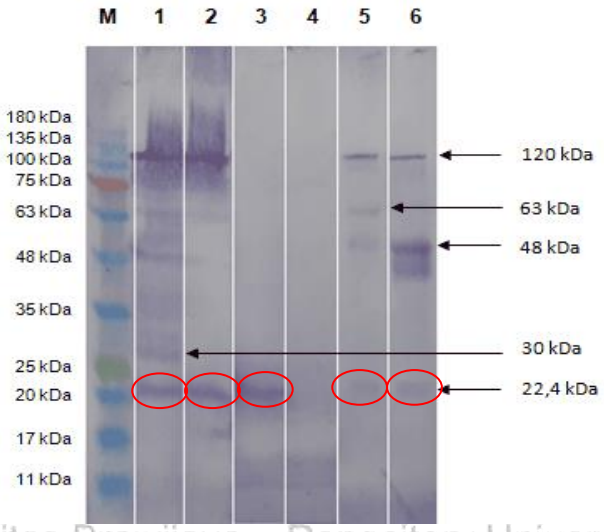
		1/100	1/200	1/300	1/400	1/500	1/600	1/700	1/800	1/900	1/1000	KAg	KAb
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/10	A	129,25	126,01	110,66	117,62	112,58	119,44	123,21	121,63	121,32	122,50	137,80	128,53
1/20	B	117,35	122,13	106,29	120,93	120,18	120,26	121,46	118,89	122,62	127,15	139,72	128,77
1/40	C	107,16	109,54	104,45	119,08	112,92	118,98	121,78	119,49	122,85	122,34	143,59	129,02
1/80	D	108,30	107,20	108,25	111,88	119,72	128,65	130,01	121,96	130,79	135,56	142,34	138,63
1/160	E	116,75	108,53	103,74	119,30	119,74	124,31	133,67	126,58	128,63	136,67	138,11	128,96
1/320	F	112,47	104,71	106,11	114,96	120,05	126,63	131,68	131,92	130,11	138,32	145,32	138,47
1/640	G	102,15	102,02	101,48	121,84	125,97	132,88	135,83	129,88	120,19	137,15	143,41	126,75
1/1280	H	109,11	102,42	107,27	123,88	125,60	134,35	134,97	132,99	134,72	137,34	146,93	133,44

Hasil reaksi *check board* dilakukan pengukuran densitas yang ditunjukkan dengan nilai *mean* dengan menggunakan *Adobe Photoshop CS6*, sesuai (Tabel5.4), dimana semakin kecil nilai mean berarti semakin besar densitasnya. Dari hasil pengukuran densitas menunjukkan bahwa reaksi terkuat terlihat pada pengenceran 1/640 untuk antigen dan 1/300 untuk antibodi (nilai meannya 101,48). Titer pengenceran antibodi tersebut yang digunakan sebagai dasar untuk melakukan uji *western blot.*

5.7 Hasil Uji *Western Blotting*

Metode *western blotting* adalah metode yang mereaksikan antibodi spesifik dengan antigen, dan metode ini telah rutin digunakan untuk analisis protein. *Blotting* berarti memindahkan sampel dari gel elektroforesis ke membran *nitrocellulosa* dan dilakukan dengan antibodi pada permukaan membran (Megayasa*et al.*, 2014).

Hasil reaksi antara antigen Protein Biofilm dengan antibodi poliklonal 22,4 kDa menggunakan *uji western blotting* seperti terdapat pada Gambar 5.8



Gambar 5. 8 Hasil Uji *Western blotting*.M : Marker, 1 : *Whole cel S. aureus*strain 1; 2 : *Whole cel S. aureus*strain 2; 3: Protein Biofilm 22,4 kDa; 4 : Protein Biofilm 35 kDa; 5 : *crude*Protein Biofilm*S. aureus* 1; 6 : *crude*Protein Biofilm 2

Hasil dari uji *western blotting*pada Gambar(5.8) menunjukkan reaksi positif ditandai dengan munculnya pita-pita protein pada lajur 1-6dari Protein Biofilm dengan berat molekul 120 kDa, 63 kDa, 48 kDa, 30 kDa, dan 22,4 kDa.

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Identifikasi Bakteri *S. aureus* dan Uji Pembentukan Biofilm

Identifikasi bakteri *S. aureus* dilakukan menggunakan media BAP, media MSA, pewarnaan Gram, tes katalase, dan tes koagulase. Hasil identifikasi bakteri *S. aureus*terdapat pada (Tabel 5.1). Media BAP digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghemolisa Eritrositdan hemoglobin. Ada 3 jenis hemolisis yaitu hemolisis α (alfa), hemolisis β (beta) dan hemolisis γ (gamma).Pewarnaan Gram digunakan untuk mengamati morfologi, ukuran, warna dan susunan sel. Bakteri*S. aureus* merupakan bakteri Gram positif berbentuk kokus yang menghasilkan warna ungu pada pewarnaan Gram. Warna ungu disebabkan karena bakteri mempertahankan warna pertama yaitu gentian violet. Perbedaan sifat Gram dipengaruhi oleh kandungan pada dinding sel, yaitu bakteri Gram positif kandungan peptidoglikan lebih tebal jika dibanding dengan Gram negatif, (Leboffe and Pierce, 2011).

MediaMSAdigunakan untuk isolasi dan membedakan bakteri *Staphylococcus* patogen, terutama *S. aureus*. Pada media MSA *S. aureus* menunjukkan pertumbuhan koloni berwarna putih kekuningan dikelilingi zona kuning karena kemampuan memfermentasi manitol.Bakteri yang tidak mampu memfermentasi *manitol*tampak zona berwarna merah atau merah muda. Bakteri yang memfermentasi manitolakan menghasilkan asam, menyebabkanperubahan indikator *phenol red* pada agar yang berubah dari warna merah menjadi kuning (Harley and Prescott, 2002).

Uji katalase digunakan untuk membedakan antara *Staphylococcus* dan *Streptococcus*, dimana kelompok *Staphylococcus* bersifat katalase positif.

Katalase merupakan enzim yang mengkatalisa penguraian hidrogen peroksida menjadi H_2O dan O_2. Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel karena bahan ini menginaktifkan enzim dalam sel (Benson, 2001).

Sedangkan uji koagulase digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim koagulase. Tujuan uji koagulase untuk membedakan *S. aureus* dengan spesies *Staphylococcus* yang lain(Harley and Prescott, 2002).Organisme mengeluarkan dua bentuk enzim koagulase, yaitu *Free coagulase* dan *bound coagulase*. *Free coagulase*disekresikan secara ekstraseluler sedangkan *bound coagulase*dikaitkan dengan dinding sel. *Free coagulase* berikatan dengan *coagulase reacting factor (CRF)*dalam plasma hospes dan membentuk kompleks trombin. *Bound coagulase* juga dikenal sebagai *clumping factor*, yang mengikat rantai alfa dan beta fibrinogen dalam plasma dan mengubahnya menjadi fibrin untuk membentuk bekuan darah. Enzim koagulase ini di kode oleh gen *coa* dan digunakan untuk diagnosis berdasarkan DNA *S. aureus*(Babu*et al*., 2014).

Produksi biofilm pada bakteri dikarakterisasimelalui munculnya koloni berwarna hitampada media CRA. Metode CRA menggunakan *congo red* sebagai indikator pH, yang menunjukkan warna hitam pada rentang pH antara 3,0 dan 5,2(Lima *et al*., 2017). Telah terbukti bahwa bakteri *S. aureus* dan *S. epidermidis*mempunyai operonadhesi interselular *(ica)* yang bertanggung jawab untuk produksi slime. Operon ini berisi gen icaADBC. Di antara gen icaADBC, genicaA dan icaD telah dilaporkan berperan pentingdalam pembentukan biofilm. Gen icaA mengkodekan *N-acetylglucosaminyltransferase*, enzim yang terlibat dalam sintesis PIA. Gen icaD telah dilaporkan berperan penting dalam ekspresi maksimal *N-acetylglucosaminyltransferase*, yang mengarah ke ekspresi fenotipik

dari kapsulpolisakarida (Nasr *et al.,* 2012). Gen icaC terlibat dalam eksternalisasi polisakarida yang mulai tumbuh. Sedangkan gen icaB terletak di permukaan sel ekstraseluler mengkode *N-deacetylase*yang bertanggung jawab untuk deasetilasi parsial PIA (Arciola *et al*., 2015).Hal ini sesuai dengan penelitian (Mariana *et al.,* 2009)bahwa terdapat korelasi antara koloni warna hitam pada media CRA dengan keberadaan gen ica A dan icaD.

EPS biofilm *Staphylococcus* mengandung PIA, ekstraseluler-DNA, protein, *amyloid fibrils*dan polisakarida (Boles and Horswill, 2011; Arciola *et al.*, 2015). Pada penelitian ini menggunakan Protein Biofilm karena antigen yang berasal dari protein lebih imunogenik dibandingkan antigen yang berasal dari polisakarida, kecuali antigen dalam bentuk glikoprotein, karena rantai samping gula dapat melindungi ikatan peptida yang rentan dari serangan oleh protease(Adaand Isaacs, 2003). Dan antibodi yang di produksi sebagai respon terhadap protein memiliki afinitas yang tinggi untuk memberikan respon pada antigen protein serta meningkatkan sel plasma yang berumur panjang dibandingkan dengan antigen polisakarida (Abbas *et al*., 2016).

Untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya di gunakan metode SDS PAGE. Hasil SDS PAGE pada (Gambar5.3)didapatkan Protein Biofilm*S. aureus* mempunyai berat molekul 35 kDa, 22,4 kDa dan 17,2 kDa.Dengan metode SDS PAGEProtein terpisah-pisah sesuai dengan ukuran berat molekulnya. Protein dengan berat molekul yang lebih kecil akan lebih cepat bergerak karena mobilitasnya tinggi. Sebaliknya, protein dengan berat molekullebih besar akan bergerak lebih lambat karena mobilitisnyarendah.Berbagai jenis protein pada suatu sampel akan terpisah-

pisahpada gelpoliakrilamida tergantung pada mobilitasnya (Moore, 2009; Fathciyah *et al*., 2011).

Bakteri *S. aureus* adalah bakteri ekstraseluler, sehingga respon imun yang muncul adalah respon imun humoral. Respon imun humoral melawan mikroba ekstraseluler dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu antibodi mengikat mikroba dan mencegah menginfeksi sel, dengan demikian menetralkan mikroba. Antibodi melapisi mikroba dan membuat mereka target untuk fagositosis, karena sel fagosit (netrofil dan makrofag) mengekspresikan reseptor untuk antibodi dan disebut dengan istilah opsonisasi. Selain itu antibodi juga mengaktifkan sistem komplemen, menghasilkan fragmen protein yang merangsang fagositosis dan penghancuran mikroba (Abbas *et al*., 2016).

6.2 Uji Hemaglutinasi dan Uji Hambatan Hemaglutinasi

Uji hemaglutinasi dilakukan pada Protein Biofilm*S. aureus* yang terdiri dari Protein Biofilm 35 kDa, 22,4 kDa, 17,2 kDa dan *crude* Protein Biofilm. Hasil uji hemaglutinasi menunjukkan kemampuan Protein Biofilm*S. aureus* dalam mengaglutinasi sel Eritrosit mencit.Hasil uji hemaglutinasi (Gambar 5.3) terdapat perbedaan hemaglutinasi pada masing-masing berat molekul. Hal ini terkait dengan kemampuan Protein Biofilm yang dapat mengikat sel Eritrosit. Jika protein dapat mengikat sel Eritrosit pada pengenceran lebih tinggi maka protein tersebut dapat melakukan adhesi lebih kuat, karena pada pengenceran tertinggi mampu mengikat sel Eritrosit. Pada penelitian ini diperoleh protein hemaglutinin dengan berat molekul 35 kDa 22,4 kDa dan 17,2 kDa.

Penelitian tentang protein hemaglutinin pada bakteri *S. aureus* pernah dilaporkan oleh Rares, (2011) dan Abrar *et al.,* (2012), masing-masing menemukan protein hemaglutinin yang berbeda yaitu 22,3 kDa dan 46 kDa tetapi

protein hemaglutinin tersebut bukan berasal dari Protein Biofilm*S. aureus*. Beberapa penelitian tentang protein hemaglutinin yang berfungsi sebagai molekul adhesin telah banyak diteliti di antaranya Protein Pili *Vibrio cholerae* 38 kDa dan 76 kDa pada OMP (Sumarno, 2000), Protein Fimbria 16 kDa (AF16) *Acinetobacter baumannii* (Noorhamdani, 2005), Protein Pili *Proteus mirabilis* P355 mempunyai berat molekul 35,2kDa(Mufida*et al.,* 2007), dan Protein Pili 49,8 kDa*Shigella dysenteriae*(Sumarno *et al*., 2015).

Hemaglutinin merupakan salah satu komponen adhesin bakteri yang memperantarai perlekatan sel bakteri pada Eritrosit (Rupp *et al*., 1995). Bakteri *S. aureus* yang memiliki protein hemaglutinin mempunyai kemampuan adhesi lebih tinggi pada sel epitel dibandingkan dengan bakteri *S. aureus* yang tidak memiliki protein hemaglutinin (Abrar *et al.,* 2013). Peran haemaglutinin pada adhesi diprediksi sebagai faktor penting untuk virulensi dari bakteri *S. aureus* (Wahyuni *et al*., 2005).

Hasil uji hambatan hemaglutinasi (Gambar 5.6) menunjukkan bahwa antibodi poliklonal*S. aureus* 22,4 kDa yang terbentuk mampu menghambat hemaglutinasi Eritrosit mencit sampai pengenceran 1/4, sementara pada pengenceran selanjutnya dimana konsentrasi antibodi poliklonal semakin kecil menunjukkan hasil negatif yang berarti bahwa terjadi hemaglutinasi pada Eritrosit. Pada uji hambatan hemaglutinasi, proses terhambatnya hemaglutinasi ini diperantarai oleh antibodi poliklonal yang berperan mengikat protein hemaglutinin sehingga tidak terjadi hemaglutinasi (Ferdiana*et al*., 2014).

6.3 Uji *Cheack Board*dan Uji *Western Blotting*

Uji *Check board* antara antigen dan antibodi dilakukan untuk melihat efektifitas respon antibodi terhadap antigen. Antigen yang digunakan adalah

Protein Biofilm*S. aureus* 22,4 kDa, sedangkan antibodi yang digunakan adalah antibodi poliklonal 22,4 kDa. Hasil uji *cheack board* (Gambar 5.7) dan (Tabel 5.4) reaksi terkuat terlihat pada pengenceran 1/640 untuk antigen dan 1/300 untuk antibodi (nilai meannya 101,48). Hasil uji *check board* iniakan dijadikan sebagai dasar dalam uji reaksi antigen antibodi dengan menggunakan metode w*estern blotting*.

Antibodi poliklonal Protein Biofilm 22,4 kDa*S. aureus* dapat merespon antigen Protein Biofilm bakteri *S. aureus*yang mempunyai berat molekul 120 kDa, 63kDa, 48 kDa, 30 kDa dan 22,4 kDa. Pada lajur 1 yang berisi *whole celS. aureus*strain1, protein yang di respon antibodi poliklonal adalah protein dengan BM 120 kDa, 63 kDa, 48 kDa, 30 kDa dan 22,4 kDa, sedangkan pada lajur 2 berisi *whole celS. aureus*strain 2, protein yang di respon antibodi poliklonal adalah protein dengan BM 120 kDa, 63 kDa dan 22,4 kDa. Perbedaan hasil pada lajur 1 dan lajur 2 disebabkan oleh perbedaan strain bakteri *S. aureus* sehingga kemungkinan protein yang di ekspresikan berbeda.

Pada lajur 3 berisi Protein Biofilm 22,4 kDa, protein tersebut merespon antibodi poliklonal 22,4 kDa. Sehinggadapat dikatakan bahwa antigen tersebut bersifatimunogenik, karena berhasil menginduksi imunitashumoral dari tubuh mencit yang diimunisasi denganantigen tersebut (Mubarokah *et al*., 2009).Pada lajur 4 berisi Protein Biofilm 35 kDa tidak di respon oleh antibodi poliklonal 22,4 kDa, hal ini di sebabkan oleh epitop pada protein tersebut tidak di kenali oleh antibodi poliklonal. Pada lajur 5 berisi *crude*Protein Biofilm 1 merespon protein 120 kDa, 63 kDa, 48 kDa dan 22,4 kDa sedangkan pada lajur 6 berisi antigen *crude*Protein Biofilm2 merespon protein 120 kDa, 48 kDadan 22,4 kDa.

Perbedaan hasil pada lajur 5 dan 6 disebabkan oleh perbedaan waktu isolasi menyebabkan telah terjadi degradasi protein oleh enzim protease (Moore, 2009).

Protein bakteri *S. aureus*dengan berat molekul 120kDa, 63 kDa, 48 kDa, 30 kDadan 22,4kDa kemungkinan memiliki epitop yang dapat dikenali oleh antibodi poliklonal Protein Biofilm 22,4kDa sehingga terjadi reaksi antigen antibodi yang di tandai dengan munculnya pita protein. Protein Biofilm 22,4kDa sebagai protein HA, Protein Biofilm48 kDadiduga sebagai dimer dari protein HA 22,4 kDa, dan Protein Biofilm 63 kDa sebagai trimer dari protein HA 22,4 kDa.Munculnya banyak band protein pada hasil *western blotting*dapat disebabkan karena beberapa hal. Jika yang muncul adalah protein dengan berat molekul yang lebih tinggi penyebabnya kemungkinan adalah proses glikosilasi dan *multimer formation*, sedangkan jika yang muncul adalah protein dengan berat molekul yang lebih rendah mungkin terjadi degradasi protein, proses *cleavage*, atau karena protein tersebut memiliki epitope yang sama. Penyebab lain yang paling mungkin adalah penggunaan antibodi poliklonal sebagai antibodi primer (Moore, 2009; Kalanjati, 2011; Mahmood *et al.*, 2012).

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan karakterisasi Protein Biofilm adalah sebagai berikut ;

1. Profil Protein Biofilm bakteri *S. aureus*mempunyai berat molekul 35 kDa, 22,4 kDa dan 17,2 kDa.
2. Protein Biofilmbakteri *S. aureus*35 kDa, 22,4 kDa dan 17,2 kDa*S.* berperan sebagai protein hemaglutinin.
3. Antibodi poliklonal22,4 kDabakteri *S. aureus* dapat meresponantigen protein biofilm bakteri *S. aureus*yang mempunyai berat molekul 120 kDa, 63kDa, 48 kDa, 30 kDa dan 22,4 kDa.

7.2 Saran

1. Berdasarkan hasil penelitian ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk Protein Biofilm 22,4 kDa*S. aureus* apakah berperansebagai molekul adhesin.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untukmelihat reaksi antibodi poliklonal22,4 kDa terhadap species bakteri lain yang menghasilkan biofilm.
3. Perlu dilakukan penelitian apakah Protein Biofilm 22,4 kDa strain bakteri *S. aureus*ikut berperan terhadap proses patogenesis bakteri *S. aureus*?
4. Perlu dilakukan penelitian apakah protein biofilm 22,4 kDadapat merupakan salah satu komponen dari vaksin terhadap infeksi *S. aureus.*
5. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut apakah Protein Biofilm 35 kDa dan 17,2 kDa juga bersifat imunogenik.

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR PUSTAKA

Abbas, A.K., and Lichtman, A.H., Pillai, S., 2015. *Cellular and Molecular Immunology.* Eighth edition. Saunders. Philadelphia. p.339.

Abbas, A.K., and Lichtman, A.H., Pillai, S., 2016. *Imunologi Dasar Abbas ; Fungsi dan Kelainan Sistem Imun.* Edisi Indonesia kelima. Terjemahan Kalim Handono. Elsevier.

Abrar, M., Wibawan, I.W.T., Priosoeryanto, B.P., Soedarwanto, M., and Pasaribu, F.H., 2012. Isolation and Characterization Haemaglutinin of *Staphylococcus aureus*on Subclinical Mastitis in Dairy Cows. *J. Kedokteran Hewan.* 6 (1): 16-21.

Abrar, M., Wibawan, I.W.T., Priosoeryanto, B.P., Soedarwanto, M., and Pasaribu, F.H., 2013. Role of *Staphylococcus aureus* Haemaglutinin in Adhesion Process onUdder Epithelial Cells.*J. Kedokteran Hewan.* 7 (1): 43-46.

Ada, G and Isaacs, D., 2003. Carbohydrate Protein Conjugate Vaccines. *Clin Microbiol and Infect*. 9 (2): 79–85.

Agustina, W., Fitri L.E., Yudani, T.M.R., Siswanto, B., Sumarno, R.P., 2012. Antibody Protein Hemagglutinin Subunit Pili with MW 49,8 kDa *Shigella dysenteriae*can Inhibit *Shigella dysenteriae*Adhesion on Mice Enterocyte. *IOSRPHR*. 2(5):13-20.

Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E., Shirtliff, M.E., 2011. *Staphylococcus aureus*Bioflms ; Properties, Regulation and Roles in Human Disease. *Virulence*.2(5): 445-459.

Arciola, C.R., Campoccia, D., Ravaioli, S., and Montanaro, L., 2015.Polysaccharide Intercellular Adhesin in Biofilm: Structural and Regulatory Aspects. *Frontiers In Cellular and Infection Microbiology*. 5 (7): 1-10

Babu, N.G.R., Shree, G.B.B., Rekha, L., Karthiga, P., 2014. Molecular Analysis of Coagulase (*Coa*) GenePolymorphism in Clinical Isolates of*Staphylococcus aureus*by PCR-RFLP. *IJIRSET*. 3 (1): 8163-8167.

Baratawidjaja, K.G., dan Rengganis, I., 2009. *Imunologi Dasar*. Edisi ke delapan. Balai penerbit FKUI. Jakarta.

Benson., 2001. *Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology*, Eighth Edition. The McGraw-Hill. New York.

Boles, B.R. and Horswill, A.R., 2011. Staphylococcal Biofilm Disassembly. *Trends in Microbiol*. 19(9): 449–455.

Buyukcangaz, E., Kahya, S., Sen, A., Intas, KS., Eyigor, A., Temelli, S., et al., 2014. MecA Gene Prevalence in *Staphylococcus aureus* Isolates from Dairy Cows in Turkey. *J. Biol. Environ. SCI.*7(21): 183–190.

Chamdit, S., and Siripermpool, P., 2012. Antimicrobial Effect of Clove and Lemongrass Oils Against Planktonic Cells and Bioflms of *Staphylococcus aureus. Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 39 (2): 28-36.

Chessa, D., Ganau, G., Mazzarello, V., 2015. Review: An Overview of *Staphylococcus epidermidis*and *Staphylococcus aureus*with a Focus on Developing Countries. *J Infect Dev Ctries*. 9 (6):547-550.

Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bismo, A.L., Beachery, E.H., 1982. The Adherence of the Slime-Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis*to Smooth Surfaces. *Infect immune.* 37(1): 318-326.

Donlan, R.M., 2002. Biofilms: MicrobialLife on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases.*8 (9): 881-890.

Edward, Y., Dini Novianti, D., 2015. Biofilm pada Otitis Media Supuratif Kronik*JMJ.* 3 (1): 68-78.

Fatchiyah, Aumingtyas, E.L, Widyarti, S., dan Rahayu, S., 2011. *Biologi Molekuler: PrinsipDasar Analisis*. Penerbit Erlangga. Jakarta.

Ferdiana, A.R., Suswati, E., Sofiana, K.D., 2014. Immunogenicity Response of IgY Polyclonal Antibody on 95 kDa Pili Adhesion Protein of *Shigella dysenteriae*. e-*Jurnal Pustaka Kesehatan*. 2 (2): 243-248.

Foster, T.J., 2015. Immune Evasion byStaphylococci. *Nature ReviewsMicrobiology.* 3 : 948-958.

Fournier, B., Klier, A., Rapoport G., 2001. The Two-ComponentSystem Arls-Arlr is a Regulator Of Virulence GeneExpression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 41 (1):247-261.

Freeman D.J., Falkiner, F.R., Keane, C.T., 1989. A New Method for the Detection of the Slime Production by the Coagulase Negative Staphylococci. *J Clin Pathol.* 42: 872-874.

Galli, J., Ardito, F., Calo, L., Mancinelli, L., Imperiali, M., Parrilla, C., et al. 2007. Recurrent Upper Airway Infections andBacterial Biofilms. *The J. of Laryngol. Otol.* 121 (4):341-344.

Gunardi, W.D., 2014. Peranan Biofilm dalam Kaitannya dengan Penyakit Infeksi. *Jurnal Kedokteran Meditek*. 15 (39a).

Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., Tribedi, P.,2015. Biofilm, Pathogenesis and PreventionaJourney to Break the Wall: a Review.

Archives of Microbiology. 198 (1): 1-15.

Harley and Prescott., 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*, Fifth Edition. The McGraw-Hill Companies.

Harlow, E., and Lane, D., 1988. *Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. P. 386.

Herlina, N., Afiati, F., Aditia Dwi Cahyo, A.D., Herdiyani, P.D., Qurotunnada, Tappa, B., 2015. Isolation and Identification of *Staphylococcus aureus* From Subclinical Infection Dairy Cattle in Tasikmalaya, West Java. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon.*1 (3): 413-417.

Howard, G.C.,and Bethell, D.R., 2001. Basic Methods in Antibody Production and Characterization. CRC Press LCC. Boca Raton. p. 218.

Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran M., Nawaz, A.M., Hussain, T., et al., 2018. Bacterial Biofilm and Associated Infections. *Journal of the Chinese Medical Association.* 81 (1): 7-11.

Jawetz, Melnick & Adelberg, 2004. *Mikrobiologi Kedokteran*. 23rd ed. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.

Kakai, R., Wamola, I.A., 2002. Minimising Antibiotic Resistanceto *Staphylococcus aureus* in Developing Countries.*East AfrMed J*. 79 (11): 574-579.

Kalanjati, V.P., 2011. Improving the Quality of Western Blot Result. *Folia Medica Indonesiana*. 47 (2): 108-111.

Kumar, S., 2012.*Textbook ofMicrobiology*. First Edition. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. India.

Laemli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Protein During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-686.

Lakna, P., 2017. Difference Between Monoclonal and Polyclonal Antibodies - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/publication/320707210 [accessed 1 Oct, 2018]

Le, K.Y., Park, M.D and Otto, M., 2018. Immune Evasion Mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Infection. *Infection Front. Microbiol.*9:359.

Leboffe, M. J., and Pierce, B. E., 2011. *A Photographic Atlas For the MicrobiologyLaboratory.* 4th edition. Morton Publishing. Colorado.

Liddell, J.E., and Cryer, A., 1991. *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*.John Wiley and Sons Ltd. United Kingdom.

Lima, J.L.C., Alves, L.R., Paz, J.N.P., Rabelo, M.A., Maciel, M.A.V., Morais,

M.M.C., 2017. Analysis of Bioflm Production by Clinical Isolatesof *Pseudomonas aeruginosa* from Patients withVentilator-Associated Pneumonia. *Rev Bras Ter Intensiva*. 29(3):310-316.

Mahmood, T., and Ping-Chang, Y., 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci*. 4(9):429-434.

Mariana, N.S., Salman, S.A., Neela, V., and Zamberi, S., 2009. Evaluation of Modified Congo Red Agar for Detection ofBiofilm Produced by Clinical Isolates ofMethicillinResistance *Staphylococcus aureus.African Journal of Microbiology Research*. 3(6): 330-338.

Maric, S.,and Vranes, J., 2007. Characteristics and Significance of Microbial Biofilm Formation. *Periodicum Biologorum*. 109(2):115-121.

McGarey, D.J., and Allred, D.R., 1994. Characterization of Hemaglutinating Components on the Anaplasma Marginale. Initial Body Surface and Identification of Possible Adhesins. *Infect Immun*. 62 (10): 4587-4593.

Megayasa, NA., Winarsih, S., Santoso, S., 2014. Cross Reaction between AdhO36 Antibody of *Salmonella typhi* with Outer Membrane Protein of *Vibrio cholerae* Using Western Blotting Method. *Majalah Kesehatan FKUB*. 1 (1): 16-23.

Moore, C., 2009. Introduction to Western Blotting. http://www.spacesrl.com/wp-content/uploads/2011/03/WesternBlottingBrochure.pdf.[accessed 10 Oct, 2018].

Mubarokah, S.N., Sumarno, Muliartha, I.G.K., 2009. 49.5 kDa Outer Membrane Protein of *Porphyromonas gingivalis* is a Hemagglutinin and Adhesin Protein to Netrophil. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*.25 (2):49-59.

Mufida, D.C dan Suswati, E., 2007. The 35,2 kDa Hemaglutinin Protein of Pili's *Proteus mirabilis*P355 as Adhesin on Rabbit's Blader Epitelial. *Jurnal Ilmu Dasar*. 8 (1):68-74.

Nasr, R.A., AbuShady, H.M., Hussein, H.S., 2012. Biofilm Formation and Presence of IcaAD Gene in Clinical Isolates of Staphylococci. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 13 (3): 269-274.

Noorhamdani., 2005. The 16 KDA Fimbriae Protein of *Acinetobacter baumannii* From Urine of Urinary Tract Infection Patient is Hemaglutinin and Adhesion Protein, *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 21 (2): 44-53.

Prakash, B., Veeregowda, B.M., Krishnappa, G., 2003. Biofilms : a Survival Strategy of Bacteria. *Current Science*. 85(9): 1299-1307.

Psaltis, A., 2016. *Staphylococcus aureus* as a Cause of Refractory Chronic Rhinosinusitis. *Ent and Audiology News*.25 (3). www.entandaudiologynews.com. [accessed 10 Oct, 2018].

Rares, F.E.S., 2011. Deteksi Hemaglutinin Protein Permukaan *Staphylococcus aureus*dengan Menggunakan Eritrosit*Rattus novergicus* Strain Wistar. *Jurnal Biomedik*. 3 (3): 156-164.

Rupp, M.E., Han, J., and Gatermann, S., 1995. Hemagglutination by *Staphylococcus aureus*Strains Responsible for Human Bacteremia or Bovine Mastitis. *Med. Microbiol. Immunol*. 184 (1): 33-36.

Rutherford, S.T. & Bassler, B.L., 2012. Bacterial Quorum Sensing: its Role in Virulence and Possibilities for its Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2(11): 1–25.

Santoso, S., 2002. Protein Adhesin *Salmonella typhi* Sebagai Faktor Virulensi Berpotensi Imunogenik terhadap Produksi S-IgA Protektif. [Disertasi]Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.Surabaya.

Satpathy, S., Sen, S.K., Pattanaik, S., Raut, S., 2016. Review on Bacterial Biofilm: an Universal Cause of Contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 7: 56–66.

Soedarto., 2015. *Medical Microbiology*. Penerbit CV Sagung Seto. Jakarta.

Sudiono, J., 2014. *Sistem Kekebalan Tubuh*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.

Sumarno. 2000. Karakterisasi Molekuler Protein Adhesi *Vibrio cholerae* 01 M094V dan Protein Reseptornya pada Sel Epitel Usus Halus Tikus Putih, Studi Patogenitas *V. cholerae* 01 M094V. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.

Sumarno R.P., Avanit., AS., Winarsih, S., Hidayat, S., Nurhidayati, D.Y., 2015. Haemaglutination of *Shigella dysenteriae* Sub Unit Pili Protein with Anti-haemaglutination of *Shigella dysenteriae* Sub Unit Pili Protein as aMolecule Adhesion in Mice Enterocyte. *African journal of Microbiology Research*. 9 (11): 781-787.

Swacita, I.B.N., Damriyasa, I. M., Dharmawan, N.S., Astawa, N.M., Apsari, I.A.P., Tenaya, I.W.M., 2015. Respons Imun Mencit yang Diimunisasi dengan *Cysticercus Cellulosae*. *Jurnal Veteriner*. 16(15): 181–186.

Syamsuri, A., Wardani, A.K., 2013. Study of Polyclonal Antibodies Anti-Porcine Gelatin by Using DotBlot and itsPotency as Detection Kit for Porcine Gelatin. *Jurnal Pangan dan Agroindustri.*1 (1): 36-45.

Todar, K., 2012. Todar's Online Textbook of Bacteriology*Topics: Staphylococcus.*University ofWisconsin Department of Bacteriology,Wisconsin. USA.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., 1979. Electrophoretic Transfer of

Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 76 (9):4350-4354.

Vos, P.D., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A et al., 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes*. Second Edition.Vol three. Springer.New York.

Wahid, S., dan Miskad, U.A., 2016. *Imunologi; Lebih Mudah Dipahami*. Penerbit Brilian Internasional. Surabaya.

Wahyuni, A.E.T.H., Wibawan, I.W.T.,dan Wibowo, M.H., 2005. Karakterisasi Hemaglutinin *Streptococcus agalactiae* dan *Staphylococcus aureus* Penyebab Mastitis Subklinis pada Sapi Perah. *J. Sain Vet*. 23 (2): 79-86.

Warsa, C.U., 1994. *Kokus Gram Positif dalamBuku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Penerbit Binarupa Aksara. Jakarta.

Wessel, D., and Fluegge, U.I., 1984. A Methodfor the Quantitative Recovery of Protein in Dilute Solutionin the Presence of Detergents and Lipids. *Analytical Biochemistry.* 138: 141-143.

Widiyanti, N.L.P.M., Suata, K., Astawa, N.M., Hartaningsih., 2009. Anticapsid Antibody Response of Balb/C Mice Vaccinated with Spleenand Tissue Culture Vaccine of Jembrana Disease Virus. *J. Veteriner*.10 (2): 57-62.

Wilson, J.W., Schurr, M.J., LeBlanc, C.L., Ramamurthy, R., Buchanan, K.L., Nickerson, C.A., 2002. Mechanisms of Bacterial Pathogenicity. *Postgrad Med. J.* 78:216-224.

Yuwono., 2012. *Mikrobiologi Penyakit Infeksi*. Departemen Mikrobiologi FK UNSRI. Palembang.

Yuwono., 2012. *Staphylococcus aureus* dan *Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Departemen Mikrobiologi FK UNSRI. Palembang.

Lampiran 1. Keterangan Kelaikan Etik Penelitian

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 95 / EC / KEPK / 03 / 2017

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL	:	**Efek Ekstrak Etil Asetat Buah Merah *(Pandanus conoideus Lam)* terhadap Pembentukan Biofilm Bakteri *Staphylocomlus aureus***
PENELITI UTAMA	:	**Indra Taufik Sahli, S.Si**
UNIT / LEMBAGA	:	**S2 Biomedik – Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya**
TEMPAT PENELITIAN	:	**Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biomedik FKUB**

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang, 09 MAR 2017
Ketua,
Komisi Etik Penelitian Kesehatan

Prof. Dr.dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS (K), M.Hum
NIP. 19460516 197111 1 001

Catatan :
Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan
Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)

Lampiran 2. Surat Keterangan Bebas Plagiasi

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

SURAT KETERANGAN

Nomor : 530 /UN10.F08.08/PN/2018

Berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal (BPJ) Fakultas Kedokteran menyatakan bahwa Artikel Ilmiah berikut :

Judul	:	Karakterisasi Protein Biofilm Bakteri Staphylococcus Dan Produksi Antibodi Poliklonal Pada Mencit *(Mus Musculus)*
Penulis	:	Indra Taufik Sahli, S.Si
NIM	:	156070100111001
Jumlah Halaman	:	40
Jenis Artikel	:	Tesis (Program Studi Magister Ilmu Biomedik)
Kemiripan	**:**	**0 %**

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

06 NOV 2018

Ketua Badan Penerbitan Jurnal,

Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes
NIP 19751125 200501 2 001

Lampiran 3. Keterangan Submit Jurnal

Tropical Journal of Pharmaceutical Research

ISSN: 1596-5996 (print); 1596-9827 (electronic)

SmartJM v2.1

Authors' Center

Logout

Panel Menu

Journal Home

For Contributors
Author Guidelines
Manuscript Status
Submit Manuscript
Payment Centre
Payment Infromation

For Manuscripts
Aim & Scope
Ethics & Malpractice
Privacy statement
Terms of Use
Contact Us

Manuscripts Submitted

The list of manuscripts displayed below are only for the **email address** you used to to login. If you have not seen a manuscript title you earlier submitted in the list below, it is possible you used another email address for that manuscript.

To view the status and/or submit revised manuscript click on the title of the appropriate manuscript.

Ref no	Manuscript Title	Category	Date submitted	Action
20159949	Characterization Bacterial Biofilm Protein of Staphylococcus aureus *Incomplete submission. It is possible that you have not properly identified the corresponding author. You need to update the authors' information*	Under review	31-10-2018	Modify Delete
20159943	BF protein, Staphylococcus aureus, polyclonal antibodies *Incomplete submission. It is possible that you have not properly identified the corresponding author. You need to update the authors' information*	Under review	31-10-2018	Modify Delete

SmartJM is a journal management software developed by McGillard Publishing

For software request and information, please contact our Software Engineer

Repository Universitas Brawijaya
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
REPOSITORY.UB.AC.ID

Lampiran 4. Manuscript Jurnal

Characterization Bacterial Biofilm Protein of *Staphylococcus aureus*

Indra Taufik Sahli[1], Umi Kalsum[2], and Sumarno Reto Prawiro[3]
1 Student of Magister Biomedical Sciences, Faculty Medicine, University Brawijaya, Malang, Indonesia
2 Department of Pharmacology Faculty Medicine, University Brawijaya, Malang, Indonesia
3 Department of Microbiology Faculty Medicine, University Brawijaya, Malang, Indonesia

Abstract

Bacterial biofilm (BF) is a structural form of a group of microorganisms protected by an extracellular matrix which is called Extracellular Polymeric Substance (EPS). Staphylococcus BF EPS consists of Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA), extracellular-DNA, protein, and amyloid fibrils.

The purpose of this study was to determine the characterization of *S. aureus* bacterial BF protein based on molecular weight, hemagglutinin protein and see the response of BF protein polyclonal antibodies to several antigens from *S. aureus* bacteria.

The results of the study of BF protein profiles using SDS-PAGE have a molecular weight of 35 kDa, 22.4 kDa, and 17 kDa. Protein 22.4 kDa has the highest titer (¼) in the hemagglutination test using mice erythrocytes, so it is continued to make polyclonal antibodies. BF protein antibodies of 22.4 kDa *S. aureus* can respond to several antigens from *S. aureus* bacteria which have a molecular weight of 120 kDa, 63 kDa, 48 kDa, 30 kDa, and 22.4 kDa.

Keyword: Biofilm protein, *Staphylococcus aureus*, polyclonal antibodies
Corresponding author. E-mail: retoprawiros@yahoo.com

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) bacteria is a cause of nosocomial infections that are pathogenic in humans because it has virulence factors such as BFs (BF), Panton-Valentine Leukocidin (PVL) and several enzymes (protease, lipase, and elastase), which make it possible to destroy host tissue and metastases to other places [1].

A (BF) is a structural form of a group of microorganisms protected by an extracellular matrix called Extracellular Polymeric Substance (EPS), where EPS is produced by organisms and can defend from adverse environmental influences [2]. BFs can be single or multilayer, containing a population of either homogeneous or heterogeneous bacteria that remain in the matrix and are secreted by BF-forming bacteria[3]. Staphylococcus BF EPS consists of Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA), extracellular-DNA, protein, and amyloid fibrils. PIA is composed of poly-β (1-6) N-acetylglucosamine (PNAG), partially deacetylated, positively charged, whose synthesis is mediated by the ADBC ica locus [4].

It has proven that the bacteria *S. aureus* and *S. epidermidis* have intercellular adhesion (ica) operons which are responsible for slime production. This operon contains the ADBC ica gene, in addition to the iCa R gene which functions as a regulatory gene as well. Among the ica genes, the ica A and ica D genes have been reported to play an essential role in BF formation. The ica A gene encodes N-acetylglucosaminyltransferase which is the enzyme involved in the synthesis of PIA. The ica D gene has been reported to play an essential role in the maximum expression of N-acetyl-glucosaminyltransferase, whichleads to the phenotypic expression of polysaccharide
Capsules [5].

The pathogenesis of *S. aureus* bacteria is caused by the combined effects of extracellular and toxin factors, along with invasive strains such as attachment, BF formation,

and resistance to phagocytosis [6]. The process of *S. aureus* bacterial BF formation occurs through several stages including reversible initial attachment and will become an irreversible attachment, cell aggregation forms a microcolony then followed by cell growth and maturation and BF cell dispersion into planktonic forms for colonization to new surfaces [7].

Some strategies and mechanisms for BF inhibition are: bacterial anti BF polysaccharides, anti-BF enzymes, chelating agents, antimicrobial peptides and anti-adhesion agents [8].

Hemagglutinin proteins bacteria are identical with moleculeadhesion [9,10]. BF bacteria are adhesion molecules therefore this molecule is a molecule of hemagglutinin.

This research was conducted to determine the characterization of hemagglutinin*S. aureus* BF protein based on the molecular weight of BF protein, molecular weight of BF protein hemagglutinin protein and to examine the polyclonal antibody response of BF proteins to several antigens from *S. aureus*.

RESEARCH METHODS

This research is by doing exploratory laboratory research conducted at the Laboratory of Microbiology, Pharmacology, and Biomedicine of the Medical Faculty at BrawijayaUniversity Malang Indonesia.

Identification of S. aureus Bacteria

A total of 7 samples obtained from the laboratory of Saiful Anwar Malang Hospital identified in the microbiology laboratory of the medical faculty of Brawiya University. The initial stage bacteria was inoculated on blood agar plate (BAP) media and incubated at 37ºC for 24 hours, then continued the selection on the mannitol salt agar (MSA) medium, Gram stain, catalase test, and coagulase test.

BF Formation Test with the Congo Red Agar Method

The Congo red Agar (CRA) method is a qualitative screening method for detecting *S. aureus*bacteria in producing BF. The media used consisted of brain heart infusion broth (BHIB) (37 g / l) was added with sucrose (50 g / l), after that No 1 (10 g / l) and Congo red (0.8 g / l). Positive results are characterized by the formation of black colony pigments, while red colonies are detrimental BF [11].

Quantitative Test for BF Formation with Tube Method

The tube method was carried out according to what was described by Christensen [12]. The test organism was inoculated in 10 ml trypticase soy broth (TSB) with 1% glucose in a reaction of the tube. The bacteria incubated at 37 ºC for 24 hours. After incubation, the bacteria were washed and dissolved with phosphate buffer saline (PBS) pH 7.3 and dried. The tube stained with 0.1% crystal violet for 15 minutes. The remaining dye is removed and washed using distilled water. The tube dried in reverse. BF formation considered positive when the film is seen lined up on the wall and the bottom of the tube. To determine the intensity of the color in the area of the wall and the bottom of the tube than are used the Adobe Photoshop CS6 application program.

Isolation *of S. aureus Bacterial BF Protein*

The highest *S. aureus* bacteria that produced BF were inoculated on TSB + glucose 2.5% at 37 ° C for 48 hours. Protein isolation used Chloroform Methanol Precipitation method according to Wessel, D, and Flugge [13]. Protein isolation results from running used SDS-PAGE.

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Molecular weight monitoring was carried out with the SDS-PAGE method of Laemli [14]. Protein samples are heated to 100ºC for 5 minutes in a buffer solution containing 5 mM Tris pH 6.8; 5% 2-mercaptoethanol; 2.5% w / v sodium dodecyl sulfate, 10% v / v glycerol by using bromophenol blue tracking color.12% Mini slab gel selected with 4% tracking gel. The electricity voltage used is 120 mV. The color material used is coomassie brilliant blue and the standard molecule Gangnam-stain prestained ladder marker protein.

Electroelution and Dialysis

Electroelution of protein is done by cutting the gel from running SDS-PAGE according to the desired molecular weight. Gel with the content protein put in a cellophane bag, then added 0.2 M phosphate buffer. The gel in a cellophane bag inserted into the electroelution chamber containing 0.1 M phosphate buffer, then electroeluted at 250 V, 20 mA for 60 minutes, and then dialyzed. Dialysis was done by inserting electroeluted cellophane into a glass beaker containing sterile PBS which is then stirred at 4ºC for 24 hours. The cellophane bag is opened and the protein in it is collected and placed in an eppendorf tube and added with cold absolute ethanol, stored at 4ºC for 24 hours. The eppendorf tube was centrifuged 12,000 rpm for 15 minutes at 4ºC. The supernatant is discarded, and the sediment is dried, then added with a Tris-Cl buffer with a ratio of 1: 1, then stored at -20ºC. Purification results are used for hemagglutination tests [15].

Hemagglutination Test

The hemagglutination test was carried out by first erythrocytes washed with PBS pH 7.4 in a 3500 rpm centrifuge for 10 minutes (washed 3x) then made a 0.5% suspension in PBS. In the first well until the twelfth well from the microplate V, 50 µl of PBS was inserted. 50 µl of sample was added to the well 1, then serial dilution was made into the next well up to well 10. Well 12 was used as a negative control (without being given a sample). Then into each well was added 50 µl of erythrocyte suspension 0.5%, shake using a rotator plate for 1 minute then room temperature was left (27ºC) until the results were seen. The hemagglutination test results for the sample are read if the negative control well has seen the result, namely the appearance of a red stain [16].

Production of Polyclonal Antibodies

Mice used in this study were female Balb / c mice aged 6-8 weeks. The isolated 22.4 kDa BF protein antigen was measured for its protein content with nanodrop spectrophotometer and then each of them was extracted to 100 µg / ml in ependorf, then stored at -20oC. Before the injection in mice, BF proteins were emulsified with Complete Freund's Adjuvant (CFA). Mice are injected with antigen at a dose of 10 µg intraperitoneally. The second and third weeks were boosted using the antigen that had been emulsified with Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) with the same dose intraperitoneally. Week 4 is carried out a booster with the same Antigen without adjuvants. Serum mice were taken a week after the last mice were immunized by taking the blood of mice as much as 1 ml, then centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes at room temperature. Serum-containing supernatants are taken while precipitates containing blood cells are removed [17,18].

Hemagglutination Inhibition Test

By using microplate V, into each well, a PBS solution of pH 7.4 was inserted as much as 50 µl. Furthermore, in the 1st well, serum was added (22.4 kDa BF protein antibody) of 50 µl, and serial dilution was carried out until the 10th well. After that, each BF protein was added to each well (according to the highest HA test titre) of 50 µl to the 10th well. Then into each well on microplate v, the erythrocyte suspension of 0.5% mice was added by 50 µl, shaken using a rotator plate for 1 minute. Microplate v is left at room temperature until the

results are visible. The 11th well was used as a negative hemagglutination control containing serum and erythrocytes without BF protein, while the 12th well was used as a positive hemagglutination control containing BF and erythrocyte proteins without the addition of serum [10].

Check board Test (Dot Blot Method)

The dot blot method is carried out through a nitrocellulose membrane soaked in sterile H2O for 30 minutes. Then it is placed in a dot blotter apparatus (Biorad). Through the tool hole, the membrane that has been moistened with TBS, is dripped with 50 µl antigen, incubated overnight at 4°C. Then blocking with TBS buffer blocking was incubated overnight at 4°C, the blocking solution was discarded.The primary antibody dripping membrane is 50 µl, incubated for 2 hours at room temperature and placed on top of the shaker. The blocking solution was discarded, then washed 3 times with 0.05% TBS-Tween-20. Secondary antibodies were added with a 1: 1000 dilution in TBS solution, incubated at room temperature for 1 hour, above the shaker. then Washed again 3 times with 0.05% Tween-20 TBS. Then the chromogen substrate was added and incubated at room temperature for 30 minutes. The reaction is stopped by adding H2O. Then a positive result when dot-dot is formed on nitrocellulose membranes. The quality of the results is seen based on the color gradation. At dilution that produces thick color gradation is the most effective dilution of the reaction. The dilution is then used as the basis for the western blot test [19].

Western Blot method

Western blot examination is carried out by removing SDS-PAGE resulting gel sheets containing protein bands transferred on nitrocellulose paper using semi-dry trans blot equipment made by Biorad. The way to move protein bands to nitrocellulose paper is to use an electric current of 300 mA, 20 V for 120 minutes [20].

Ethical statement

All procedures involving experimental animals were in accordance with ethical standards of Faculty of Medicine, Brawijaya University (No.95/EC/KEPK/03/2017).

RESEARCH RESULT

Identification of Bacteria S. aureus.

Table 1. Results of *S. aureus* bacterial identification test

No	Sample Code	Test results					Description
		BAP	Gram	Catalase	Coagulase	MSA	
1	S1	Hemolisa β	+	+	+	Yellow colonies	*S. aureus*
2	S2	Hemolisa β	+	+	+	Yellow colonies	*S. aureus*
3	S3	Hemolisa β	+	+	+	Yellow colonies	*S. aureus*
4	S4	Hemolisa β	+	+	+	Yellow colonies	*S. aureus*
5	S5	Hemolisa β	+	+	+	Yellow colonies	*S. aureus*
6	S6	Hemolisa β	+	+	+	Yellow colonies	*S. aureus*
7	S7	Hemolisa β	+	+	+	Yellow colonies	*S. aureus*

The results of the identification test of*S. aureus*bacteria (Table 1). The sample S1-S7 forms β hemolysis in BAP media, in the form of gram-positive coccus, positive catalase test, positive coagulase test, this shown that the S1-S7 sample is *S. aureus* bacteria.

BF Formation Test with CRA Method and Tube method

Table 2. Test results for the BF formation of the CRA method and the tube method

No	Sample Code	CRA media	Test results	
			CRA method	Tube Method
1	S1	black colony	Positive(+)	82,80
2	S2	black colony	Positive (+)	122,15
3	S3	black colony	Positive (+)	93,09
4	S4	black colony	Positive (+)	87,58
5	S5	black colony	Positive (+)	86,38
6	S6	black colony	Positive(+)	72,49
7	S7	black colony	Positive (+)	83,95

The results of the CRA method test (Table 2). The positive S1-S7 sample formed a BF with the characteristics of a black colony on CRA media and continued with the tube method to determine the highest BF-producing bacteria. In the tube method if the more intense the color of the BF is formed in the research tube, the smaller the value of Mean Gray Value is. Conversely, if the color of the BF gets brighter and thinner, the greater the value of Mean Gray Value is. Test results of the tube method is obtained the lowest value in the S6 sample with a value of 72.49. This means that the S6 sample is the highest BF producing bacteria. So this S6 sample is used for the isolation of BF proteins.

Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrilamide Gel Electroforesis (SDS-PAGE)

To separate protein based on molecular weight, the SDS PAGE method is used. The results of SDS PAGE, obtained protein with various molecular weights as shown in Fig 1.

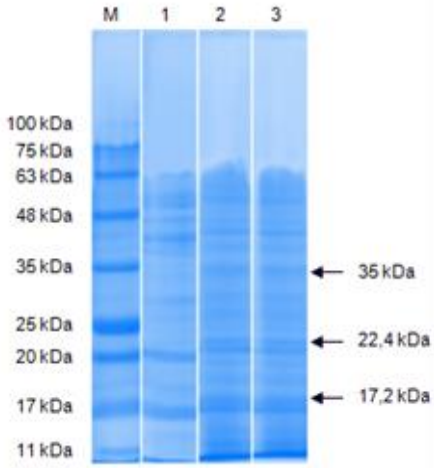


Figure 1. SDS-PAGE test results. M: Marker, 1: Whole cell *S. aureus*, 2,3: Crude *S. aureus* BF protein.

The protein profile of *S. aureus* bacterial BF is seen as in Fig 1, in lanes 2 and 3 containing crude *S. aureus*BF protein obtained 3 protein bands with molecular weight of 35 kDa, 22.4 kDa and 17.2 kDa which are not possessed by whole cel *S. aureus*.

Hemagglutination test

Purification BF proteins (BF proteins 35 kDa, 22.4 kDa and 17.2 kDa) were tested for hemagglutination to see the ability of the BF protein to agglutinate mouse erythrocytes.

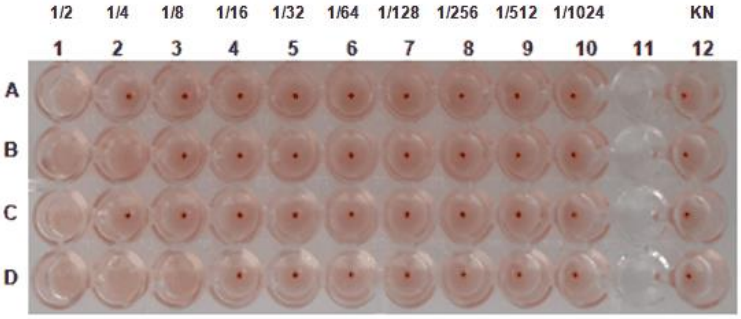


Figure 2. Results of the hemagglutination test. A: 29.8 kDa BF protein, B: 22.4 kDa BFprotein,C: 17.2 kDa BF protein, D: crude BF protein, KN: negative control

From the results of the hemagglutination test in Fig 2, it turns out that there is a difference in the mice agglutination of erythrocytes. In the molecular weight BF protein 35 kDa, 22.4 kDa, 17.2 kDa and the crude, the agglutination titer are ½, ¼, ½ and 1/8 respectivelly. The 22.4 kDa protein was chosen to produce polyclonal antibodies in mice because it has the highest titer compared to purified BF proteins (35 kDa and 17.2 kDa).

Hemagglutination Inhibition Test Results

Hemagglutination inhibition test was conducted to determine the ability of polyclonal antibodies 22.4 kDa in inhibiting the hemagglutination process mouse erythrocytes. The result of the hemagglutination inhibition test was positive if there were deposits of erythrocyte mention as found in negative control wells, whereas in wells that did not show sediment but agglutination occurred it would be considered harmful.

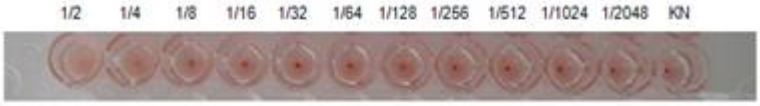


Figure 3. Test results of *S. aureus* BF protein hemagglutination test. Number ½ - 1/2048: shown the sample titer (dilution) in the hemagglutination test. KN = Negative Control, Samples are crude *S. aureus*BF protein and the results were positive on titers ¼. The antigen titers were used for hemagglutination inhibitory tests.

Figure 4. Test results of hemagglutination inhibition. Number ½ - 1/1024: shows the sample titer (dilution). KN = Negative Control, KP = Positive Control. Samples were serum (*S. aureus* 22.4 kDa BF protein polyclonal antibody) positive on titers ¼

Check board test (Dot Blot Method)

Check board test is used to see the effectiveness of the reaction between antigens and antibodies to be tested. Check board tests are carried out using the dot blot method by reacting antigens and antibodies that have been produced. Antigen is diluted with a 1/10 - 1/1280 dilution, while BF antibody is 22.4 kDA with a dilution of 1/100 - 1/1000. The results of the check board test (dot blot method) qualitatively can be seen in Figure 5

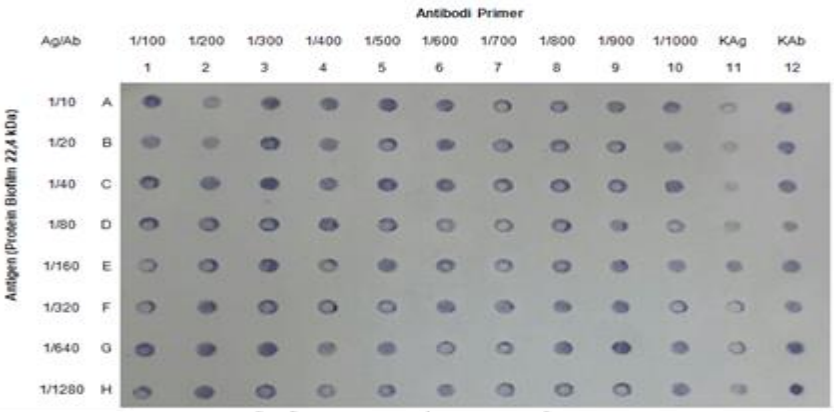


Figure 5. Check board test results between 22.4 kDa BF protein antigen and 22.4 kDa *S. aureus* BF protein antibody. Columns 1 - 10 are antibody dilution 1/100 - 1/1000, column 11: KA (Antigen control) column 12: KAb (Antibody Control), Line A - H is antigen dilution (1/10 - 1/1280).

Table 3. The results of the check board test between BF protein antigen 22.4 kDa and *S. aureus* 22.4 kDa BF protein antibody.

		1/100	1/200	1/300	1/400	1/500	1/600	1/700	1/800	1/900	1/1000	KAg	KAb
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/10	A	129,25	126,01	110,66	117,62	112,58	119,44	123,21	121,63	121,32	122,50	137,80	128,53
1/20	B	117,35	122,13	106,29	120,93	120,18	120,26	121,46	118,89	122,62	127,15	139,72	128,77
1/40	C	107,16	109,54	104,45	119,08	112,92	118,98	121,78	119,49	122,85	122,34	143,59	129,02
1/80	D	108,30	107,20	108,25	111,88	119,72	128,65	130,01	121,96	130,79	135,56	142,34	138,63
1/160	E	116,75	108,53	103,74	119,30	119,74	124,31	133,67	126,58	128,63	136,67	138,11	128,96
1/320	F	112,47	104,71	106,11	114,96	120,05	126,63	131,68	131,92	130,11	138,32	145,32	138,47
1/640	G	102,15	102,02	**101,48**	121,84	125,97	132,88	135,83	129,88	120,19	137,15	143,41	126,75
1/1280	H	109,11	102,42	107,27	123,88	125,60	134,35	134,97	132,99	134,72	137,34	146,93	133,44

The results of the checkboard test in Fig 5, the density measurements using Adobe Photoshop CS6 are shown with the mean value, the results are in table 3.Where the smaller the mean value means the greater density. The results of the density measurements show that the strongest reaction is seen at 1/640 dilution for the antigen, while the antibody is seen at 1/300 dilution (the mean value is 101.48). The antibody dilution titers are used as a basis for conducting western blot tests.

Western Blot Method

Western blotting method is a method that reacts specific antibodies with antigens, and this method has been routinely used for protein analysis. Blotting means transferring samples from gel electrophoresis to nitrocellulose membranes and carried out with antibodies on the membrane surface (Megayasa *et al.*, 2014).

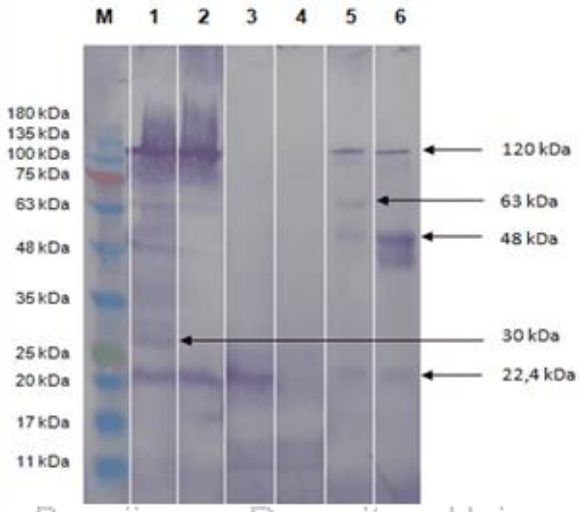


Figure 6. Western blot test results. M : Marker, 1 : Whole cel *S. aureus* strain 1; 2 : Whole cel *S. aureus* strain 2; 3 : Protein 22,4 kDa; 4 : Protein 35kDa; 5 : Crude protein BF*S. aureus* 1; 6 : Crude protein BF*S. aureus* 2

The results of the western blot test in Figure 6 shown a positive reaction of the BF protein subunit with a molecular weight of 120 kDa, 63 kDa, 48 kDa, 30 kDa, and 22.4 kDa which are indicated by the appearance of protein bands in lanes 1-6.

DISCUSSION

Identification of *S. aureus* bacteria was carried out using BAP media, MSA media, Gram staining, catalase test, and coagulase test.BAP media is used to determine the ability of bacteria to halt erythrocytes and hemoglobin. There are 3 types of hemolysis, namely hemolysis α (alpha), hemolysis β (beta) and hemolysis γ (gamma). Gram staining is used to observe the morphology, size, and composition of bacterial cells. *S. aureus* is a Gram-positive bacteria in the form of coccus which produces purple in Gram staining. The color purple caused by the bacteria maintaining the first color, namely gentian violet. The content of the cell wall influences the difference in Gram's character, i.e., Gram-positive bacteria contain which is thicker peptidoglycan compared to Gram-negative [21].

The salt agar mannitol medium (MSA) is used for isolation and distinguishes the pathogenic Staphylococcus bacteria, especially *S. aureus*. *S. aureus* bacteria in MSA media showed yellowish white colony growth surrounded by yellow zone because of the ability to mannitol ferment. Bacteria that ferment mannitol will produce acid, causing changes in the red phenol indicator to change from red to yellow [22].

The results of SDS PAGE in Figure 1 show that the *S. aureus*BF protein has a molecular weight of 35 kDa, 22.4 kDa, and 17.2 kDa.

Hemagglutinin is one of the bacterial components that mediate the attachment of bacterial cells to red blood cells [23]. *S. aureus* bacteria which have hemagglutinin protein have a higher adhesion ability in epithelial cells compared to *S. aureus* which does not have hemagglutinin protein [24]. The role of hemagglutinin in adhesion is predicted as an essential factor for virulence of *S. aureus* [25].

Hemagglutination test was carried out on *S. aureus* BF protein consisting of 35 kDa , 22.4 kDa, 17.2 kDa, and crude protein BF. The titer hemagglutination test results shown: ½, ¼, 1/2, and 1/8 respectively. The hemagglutination test results in each molecular weight are not the same. The result due to the ability of BF proteins that can bind erythrocyte cells. If the protein can bind erythrocyte cells at a higher dilution, the protein can adhere more strongly, because at the highest dilution it can bind erythrocyte cells. In this study, hemagglutinin protein obtained with a molecular weight of 22.4 kDa. Rares found (2011) the possibility of hemagglutinin protein 22.4 kDa is the same as the *S. aureus* hemagglutinin protein with a molecular weight of 22.38 kDa [26]. Several studies on cellular hemagglutinin protein have widely studied including 49.8 kDa pili protein *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae* 38 kDa pili protein and 76 kDa in OMP [10], while Proteus mirabilis P355 has pili hemagglutinin protein with a molecular weight of 35.2 kDa, 27.9 kDa, 24 kDa and 22 kDa [27].

The results of the hemagglutination inhibitory test showed that the polyclonal antibody of *S. aureus*BF protein 22.4 kDa formed was able to inhibit hemagglutination until 1/4 dilution, while the subsequent dilution in which the polyclonal antibody concentration was smaller showed a negative result which mean that hemagglutination occurred in mice erythrocytes. In the hemagglutination inhibition test, the process of inhibiting hemagglutination is mediated by polyclonal antibodies which play a role in binding hemagglutinin proteins so that the hemagglutination process in mouse erythrocytes does not occur [28].

Antigen check board and antibody tests are conducted to see the effectiveness of antibody responses to antigens. The antigen used was *S. aureus* BF protein 22.4 kDa, while

the antibody used was 22.4 kDa BF protein antibody. The checkboard test used as a basis for the antibody-antigen reaction test using the Western Blot method.

BF protein antibodies 22.4 kDa *S. aureus* can respond to several antigens from *S. aureus* which have a molecular weight of 120 kDa, 63 kDa, 48 kDa, 30 kDa, and 22,4 kDa.Several things can cause the appearance of many protein bands on western blot results. A protein hemagglutinin with a high molecular weight, the cause of which is likely to be a process of glycosylation and multimer formation, whereas if its appearance is a protein with a lower molecular weight protein degradation may occur, the cleavage process, or because the protein has the same epitope. Another most likely cause is the use of polyclonal antibodies as primary antibodies [29,30,31,32].

From the results the question arises is protein BFP as molecule adhesion and how is the relationship with cellular adhesion molecule *S. aureus*? The result is essential in designing the vaccine of *S. aureus* base on the molecular adhesion, as like Pertussis Acellular Vaccine [33].

CONCLUSION

Protein 22.4 kDa BFs antibodies can respond to several antigens from *S. aureus* bacteria which have a molecular weight of 120 kDa, 63 kDa, 48 kDa, 30 kDa, and 22.4 kDa.

References

1. Buyukcangaz, E., Kahya, S., Sen, A., Intas, KS., Eyigor, A., Temelli, S., et al., 2014. Mec A Gene Prevalence in *Staphylococcus aureus* Isolates from Dairy Cows in Turkey. *J. Biol. Environ. SCI.* 7 (21): 183-190.
2. Prakash, B., Veeregowda, B.M., Krishnappa, G., 2003. Biofilms : a Survival Strategy of Bacteria. *Current Science*. 85 (9): 1299-1307.
3. Satpathy, S., Sen, S.K., Pattanaik, S., Raut, S., 2016. Review on Bacterial Biofilm: an Universal Cause of Contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 7: 56-66.
4. Arciola, C.R., Campoccia, D., Ravaioli, S., and Montanaro, L., 2015. Polysaccharide Intercellular Adhesin in Biofilm: Structural and Regulatory Aspects. *Frontiers In Cellular and Infection Microbiology*. 5 (7): 1-10.
5. Nasr, R.A., AbuShady, H.M., Hussein, H.S., 2012. Biofilm Formation and Presence of Ica AD Gene in Clinical Isolates of Staphylococci. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 13 (3): 269-274.
6. Chessa, D., Ganau, G., Mazzarello, V., 2015. Review: An Overview of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* with a Focus on Developing Countries. *J Infect Dev Ctries*. 9 (6): 547-550.
7. Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., Tribedi, P.,2015. Biofilm, Pathogenesis and Prevention a Journey to Break the Wall: a Review. *Archives of Microbiology*. 198 (1): 1-15.
8. Shadia, M. Abdel-Aziz, Aeron A., 2014. Bacterial BF: Dispersal and Inhibition Strategies. *SAJ Biotechnol*. 1: 105.
9. Hamong, S., Made, A.H., I Nyoman, M. ,Sumarno, R.P., 2014. Confirmation of

Adherence Protein Hemagglutinin Sub-Unit Pili With MW 49.6 kDa *Helicobacter pylori* on Mice Gastric Epithelial Cell. *IOSR-JPBS*. 9 (2): 59-66.

10. Sumarno, R.P., Avanita, AS., Winarsih, S., Hidayat, S., Nurhidayati, D.Y., 2015. Haemaglutination of *Shigella dysenteriae* sub unit Pili Protein with Anti-Haemaglutination of *Shigella dysenteriae* Sub Unit Pili Protein As a Molecule Adhesion in Mice Enterocyte. *African Journal of Microbiology Research*. 9 (11): 781-787.
11. Freeman, D.J., Falkiner, F.R., Keane, C.T., 1989. A New Method for the Detection of the Slime Production by the Coagulase Negative Staphylococci. *J Clin Pathol*. 42: 872-874.
12. Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bismo, A.L., Beachery, E.H., 1982. The Adherence of the Slime-Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces. *Infect immune*. 37(1): 318-326.
13. Wessel, D., and Fluegge, U.I., 1984. A Method for the Quantitative Recovery of Protein in Dilute Solution in the Presence of Detergents and Lipids. *Analyt. Biochem*. 138: 141-143.
14. Laemli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Protein During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-686.
15. Agustina, W., Fitri L.E., Yudani, T.M.R., Siswanto, B., Sumarno, R.P., 2012. Antibody Protein Hemagglutinin Subunit Pili with MW 49,8 kDa *Shigella dysenteriae*can Inhibit *Shigella dysenteriae*Adhesion on Mice Enterocyte. *IOSRPHR*. 2 (5): 13-20.
16. McGarey, D.J., and Allred, D.R., 1994. Characterization of Hemaglutinating Components on the Anaplasma Marginale. Initial Body Surface and Identification of Possible Adhesins. *Infect Immun*. 62 (10): 4587-4593.
17. Liddell, J.E., and Cryer, A., 1991. *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*. John Wiley and Sons Ltd. United Kingdom.
18. Swacita, I.B.N., Damriyasa, I. M., Dharmawan, N.S., Astawa, N.M., Apsari, I.A.P., Tenaya, I.W.M., 2015. Respons Imun Mencit yang Diimunisasi dengan *Cysticercus Cellulosae*. *Jurnal Veteriner*. 16 (15): 181-186.
19. Harlow, E., and Lane, D., 1988. *Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. P. 386.
20. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., 1979. Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 76 (9): 4350-4354.
21. Leboffe, M. J., and Pierce, B. E., 2011. *A Photographic Atlas For the Microbiology Laboratory*. 4th edition. Morton Publishing. Colorado.
22. Harley and Prescott., 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*, Fifth Edition. The McGraw-Hill Companies.

23. Rupp, M.E., Han, J., and Gatermann, S., 1995. Hemagglutination by *Staphylococcus aureus*Strains Responsible for Human Bacteremia or Bovine Mastitis. *Med. Microbiol. Immunol*. 184 (1): 33-36.

24. Abrar, M., Wibawan, I.W.T., Priosoeryanto, B.P., Soedarwanto, M., and Pasaribu, F.H., 2012. Isolation and Characterization Haemaglutinin of *Staphylococcus aureus* on Sub clinical Mastitis in Dairy Cows. *J. Kedokteran Hewan*. 6 (1): 16-21.

25. Wahyuni, A.E.T.H., Wibawan, I.W.T.,dan Wibowo, M.H., 2005. Karakterisasi Hemaglutinin *Streptococcus agalactiae* dan *Staphylococcus aureus* Penyebab Mastitis Subklinis pada Sapi Perah. *J. Sain Vet*. 23 (2): 79-86.

26. Rares, F.E.S., 2011. Deteksi Hemaglutinin Protein Permukaan *Staphylococcus aureus* dengan Menggunakan Eritrosit *Rattus Novergicus* Strain Wistar. *Jurnal Biomedik*. 3 (3): 156-164.

27. Mufida, D.C., Sumarno,R.P., Santoso, S., 2010. Identifikasi Protein Adhesi Pili *Proteus mirabilis* P355 dan Protein Reseptor pada Vesika Urinaria Kelinci. *J.Exp. Life Sci*. 1 (1): 1-6.

28. Ferdiana, A.R., Suswati, E., Sofiana, K.D., 2014. Immunogenicity Response of IgY Polyclonal Antibody on 95 kDa Pili Adhesion Protein of *Shigella dysenteriae*. e-*Jurnal Pustaka Kesehatan*. 2 (2): 243-248.

29. Moore, C., 2009. Introduction To Western Blotting. http://www.spacesrl.com/wp-content/uploads/2011/03/WesternBlottingBrochure.pdf. [accessed 10 Oct, 2018].

30. Kalanjati, V.P., 2011. Improving the Quality of Western Blot Result. *Folia Medica Indonesiana*. 47 (2): 108-111.

31. Mahmood, T., and Ping-Chang, Y., 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci*. 4 (9): 429-434.

32. Alvi, Mi., Avin, A. Fitr., Noorhamdani, AS., Sumarno, R.P., 2016, Hemagglutinin Adhesin Protein Pili and OMP (Outer Membrane Protein) *Shigella flexneri* can Cross-react with OMP S. dysenteriae. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*.

33. Inatsuka, C.S. Steven, M.J. and Cotter. P.A 2005. *Bordetella Filamentous* Hemagglutinin Plays A Critical Role In Immunomodulation, Suggesting A Mechanism For Host Specificity. *Proc Nat Acad Sci*. 102 (51): 78-83.

Lampiran 5. Daftar Riwayat Hidup

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Indra Taufik Sahli, lahir di Trenggalek 20 Juni 1979. Anak dari Alm. Bapak Sahlan dan Ibu Sri Nurhayati. Lulus dari SD Inpres Margomulyo pada tahun 1992, lulus dari SMP Negeri 01 Oransbari pada tahun 1995, lulus dari Sekolah Menengah Analis Kesehatan (SMAKES) Departemen Kesehatan Jayapura pada tahun 1999. Pada tahun 2000 melanjutkan pendidikan keAkademi Analis Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri dan lulus pada tahun 2003.

Pada tahun 2004/2005 pernah bekerja di RS TNI AL dr. Azhar Zahir Manokwari. Pada tahun 2005 mulai bekerja di Unit Laboratorium Umum Politeknik Kesehatan Kemenkes Jayapura.Pada tahun 2009 mendapatkan beasiswa tugas belajar dari Kementerian Kesehatan ke Universitas Hasanuddin Makassar pada Program Studi Farmasi Peminatan Teknologi Laboratorium Kesehatan lulus tahun 2011. Kemudian pada tahun 2015 kembali mendapatkan beasiswa tugas belajar dari Kementerian Kesehatan ke Universitas Brawijaya Malang pada Program Studi Magister Ilmu Biomedik Peminatan Mikrobiologi, Imunologi dan Parasitologi.