



PERAN PROTEIN HEMAGLUTININ PILI STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE 54 kDa SEBAGAI ADHESIN

Adellia Fira Fa'idha¹, Diana Chusna Mufida², Zahrah Febianti³

^{1,2,3}Universitas Jember, Jember, Indonesia

ARTICLE INFORMATION

Received: January, 20, 2020
Revised: May, 6, 2020
Available online: August, 2020

KEYWORDS

Pili, Hemagglutinin Protein 54 kDa, S. Pneumoniae, Adhesion

CORRESPONDENCE

E-mail: chusna.fk@unej.ac.id

A B S T R A C T

Introduction: Pili has an adhesin that plays a role in the adhesion process in order to infect the host cell. Research shown that the 54 kDa S. pneumoniae pili protein is a hemagglutinin. This study was to examine whether the 54 kDa of S. pneumoniae pili protein also act as an adhesin. **Method:** S. pneumoniae was isolated using a pili cutter. The protein molecular weight was analyzed using SDS-PAGE. Protein with a molecular weight of 54 kDa was isolated to produce protein solution. Adhesion test was carried out on a protein solution with multilevel concentrations to determine the adhesion index. **Result:** Pearson correlation test obtained p-value of 0.036 and the correlation coefficient $R = -0.840$, these results indicate that the two variables have a significant negative relationship. Regression analysis showed R^2 0,997, mean that 99.7% of the concentration of protein S. pneumoniae 54 kDa influenced the adhesion index. **Conclusion:** Therefore, it can be concluded that the hemagglutinin protein S. pneumoniae 54 kDa is an adhesin protein.

A B S T R A K

Latar Belakang: Pili memiliki protein adhesin yang berperan dalam proses adhesi untuk menginfeksi sel hospes. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa protein pili S. pneumoniae 54 kDa merupakan protein hemagglutinin. Tujuan penelitian ini adalah menguji peran protein hemagglutinin pili S. pneumoniae 54 kDa sebagai adhesin. **Metode:** Pili S. pneumoniae diisolasi menggunakan alat pili cutter. Hasil potongan pili dilakukan SDS-PAGE untuk mengidentifikasi berat molekul proteinnya. Protein berat molekul 54 kDa diisolasi sehingga menghasilkan larutan protein. Larutan protein diuji adhesi dengan konsentrasi bertingkat untuk mengetahui indeks adhesi. **Hasil:** Uji korelasi Pearson diperoleh nilai p-value 0,036 ($p < 0,05$) dan koefisien korelasi $R = -0,840$. Hasil ini menunjukkan bahwa kedua variabel memiliki hubungan yang signifikan, sangat kuat dengan arah hubungan negatif. Analisis regresi didapatkan R^2 0,997, artinya 99,7 % konsentrasi protein pili 54 kDa S. pneumoniae mempengaruhi indeks adhesi. **Kesimpulan:** protein hemagglutinin pili 54 kDa S. pneumoniae merupakan protein adhesin

PENDAHULUAN

Streptococcus pneumoniae merupakan bakteri kokus Gram positif. Bakteri ini sering ditemukan sebagai flora normal yang menghuni saluran pernapasan manusia khususnya nasopharing dan sebagai bakteri patogen yang dapat menyebabkan berbagai macam penyakit seperti pneumonia, meningitis, sinusitis dan otitis media. Keberadaannya dapat dianggap sebagai faktor risiko untuk berkembangnya penyakit saluran pernapasan dan sebagai sumber penularan pneumokokus ke orang lain (Angelis dkk., 2011). Selain sebagai patogen, S. pneumoniae secara

asimtomatik juga berada di saluran pernapasan bagian atas sebagai karier (Brooks dan Mias, 2018).

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

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

Pili merupakan salah satu faktor virulensi yang dimiliki oleh *S. pneumoniae*. Pili, berupa filamen panjang yang terbukti memiliki hubungan virulensi dan kemampuan untuk melakukan adhesi serta kolonisasi (Angelis dkk, 2011, Brooks dan Mias, 2018, Poll dan Opal, 2009). Terdapat dua jenis pili yaitu pili tipe 1 dan pili tipe 2 (Nelson dkk., 2007; Bagnoli dkk., 2008;

Basset dkk., 2011). Pili sebagai salah satu faktor adhesi mampu menghindari pembersihan mukus dan cairan lain pada permukaan sel inang (Parija, 2012).

Faktor adhesi pada bakteri dipengaruhi oleh kemampuan hemaglutinasinya (Mufida dkk., 2018). Kemampuan hemaglutinasi yang tinggi sangat terkait dengan kemampuan kolonisasi yang tinggi. Penelitian pada *Shigella* spp. menunjukkan bahwa terdapat korelasi antara hemaglutinasi dan kolonisasi (Mitra dkk., 2012). Korelasi ini juga terbukti pada protein hemaglutinin fimbrial dari *Bordetella pertussis* yang memediasi perlekatan bakteri ke saluran pernapasan tikus (Melvin dkk., 2015). Pada penelitian sebelumnya telah diidentifikasi bahwa pili *S. pneumoniae* memiliki 4 berat molekul yang dominan yaitu 67 kDa, 54 kDa, 25 kDa, dan 11 kDa. Uji hemaglutinasi pada protein pili tersebut menunjukkan bahwa protein dengan berat molekul 54 kDa terbukti sebagai protein hemaglutinin (Mufida dkk., 2018). Namun demikian, pada penelitian tersebut tidak dilakukan uji adhesi. Uji adhesi pada protein pili *S. pneumoniae* perlu dilakukan karena penelitian terdahulu menunjukkan bahwa protein hemaglutinin bakteri lain, yaitu *Proteus mirabilis*, juga berperan sebagai protein adhesin (Mufida dan Suswati, 2007). Oleh sebab itu, perlu diteliti untuk membuktikan bahwa protein hemaglutinin pili *S. pneumoniae* 54 kDa merupakan protein adhesin.

METODE

Bakteri *S. pneumoniae* yang digunakan pada penelitian ini merupakan isolat dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan, Surabaya. Metode yang digunakan menurut petunjuk Ehara dkk., (1987), yaitu media TCG yang memperkaya pertumbuhan pili *S. pneumoniae*. Media TCG mengandung 0,02% thioproline, 0,3% NaHCO₃, 0,15 bacto trytonr, ekstrak ragi 0,2%, 0,5% NaCl, agar bacto 2%, dan 1 mM EGTA. Media agar dibuat dalam botol kapasitas 250 ml secara miring sebanyak 50 ml agar. *S. pneumoniae* yang dipilih ditanam pada media Brain Heart Infusion (BHI) yang diinkubasi pada suhu 37 °C selama 4 jam. Kemudian suspensi bakteri sebanyak 10 ml dimasukkan dalam setiap botol yang mengandung media TCG. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 2 x 24 jam. Pili dipanen dari 50 botol biakan bakteri. Hasil koleksi bakteri ditambahkan tri kloroasetat (TCA) sampai konsentrasi 3% kemudian dikocok rata. Suspensi bakteri diletakkan pada suhu kamar selama 1 jam dan dikocok tiap 15 menit. Selanjutnya suspensi bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Pelet diambil dan diresuspendi dengan cairan PBS pH 7,4 dengan perbandingan 1: 10. Bakteri dicukur

dengan menggunakan alat pili cutter milik Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Bakteri dicukur dengan kecepatan penuh selama 1 menit pada suhu 4 °C. Selanjutnya sampel disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 12000 rpm suhu 4 °C. Supernatan dipisahkan pada tabung lain, sedangkan pellet / endapan disuspensi dengan larutan dan cara yang sama seperti di atas dan dikumpulkan dengan cara mencukur ulang sampai beberapa kali, sampai dihasilkan supernatan dengan kekeruhan menyerupai PBS (phosphate buffer saline) (Sumarno dkk., 2012).

Identifikasi berat molekul dikerjakan menggunakan SDS-PAGE (Laemli, 1970 dalam Mufida dkk., 2018). Sampel protein dipanaskan 100 °C selama 5 menit dalam larutan penyangga yang mengandung 5mM Tris HCl pH 6,8, 2- mercapto ethanol 5%, w/v sodium dodecyl sulfate 2,5%, v/v gliserol 10% dengan warna pelacak Bromophenol Blue. Gel SDS-PAGE dipilih mini slab gel 12,5% dengan tracking gel 4% dan voltase 125 mV. Bahan pewarna yang digunakan adalah coomassive brilliant blue.

Selanjutnya protein hasil SDS-PAGE dimurnikan dengan cara memotong gel lurus pada berat molekul yang diinginkan dan potongan pita tersebut dikumpulkan dan dimasukkan dalam membrane dialisa menggunakan cairan penyangga elektroforesis, running buffer. Selanjutnya pada pita dilakukan elektroelusi menggunakan elektroforesis frontal apparatus aliran 125 mV selama 25 menit. Hasil elektroforesis dilakukan dialisa dengan cairan penyangga PBS pH 7,4 selama 2 x 24. Cairan dialisat tersebut merupakan protein yang siap untuk diuji adhesi.

Metode uji adhesi merujuk pada Nagayama (1995). Tahap pertama dilakukan preparasi biakan bakteri yang diperoleh dari kultur *S. pneumoniae*. Pelet yang diperoleh diencerkan dengan PBS. Pengenceran sampel protein pili hasil elektroelusi dengan pengenceran secara bertingkat pada tabung eppendof, dengan larutan pengencer adalah PBS steril pH 7,4. Kelompok kontrol adalah kelompok dengan konsentrasi protein pili 0. Hasil pengenceran protein pili dimasukkan dalam tabung kapasitas 2 mL yang mengandung sel paru mencit dan diinkubasi pada water bath dengan suhu 37 °C. Suspensi pili tersebut kemudian disentrifus dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Pada peletnya ditambahkan bakteri sebanyak 300 µl kemudian diinkubasi pada water bath dengan suhu 37 °C selama 30 menit. Setelah itu, larutan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit dan pelletnya dicuci dengan PBS 2 kali. Pada pelet yang telah dicuci ditambahkan PBS 50 µl. Selanjutnya masing-masing diambil 10 µl untuk dibuat hapusan pada

obyek glass dan dicat Gram. Preparat siap untuk dihitung indeks adhesinya di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 x.

HASIL

Identifikasi berat molekul menggunakan SDS-PAGE didapatkan beberapa berat molekul pili yang dominan yaitu 67 kDa, 54 kDa, 25 kDa, dan 11 kDa (Gambar 1). Penelitian ini menggunakan pili dengan berat molekul 54 kDa karena telah terbukti pada uji hemaglutinasi penelitian sebelumnya bahwa pili dengan berat molekul 54 kDa merupakan protein hemaglutinin.



Keterangan:

Sumur 1 = *Protein marker*

Sumur 2 = Sel utuh *S. pneumoniae*

Sumur 3 = Potongan pili pertama

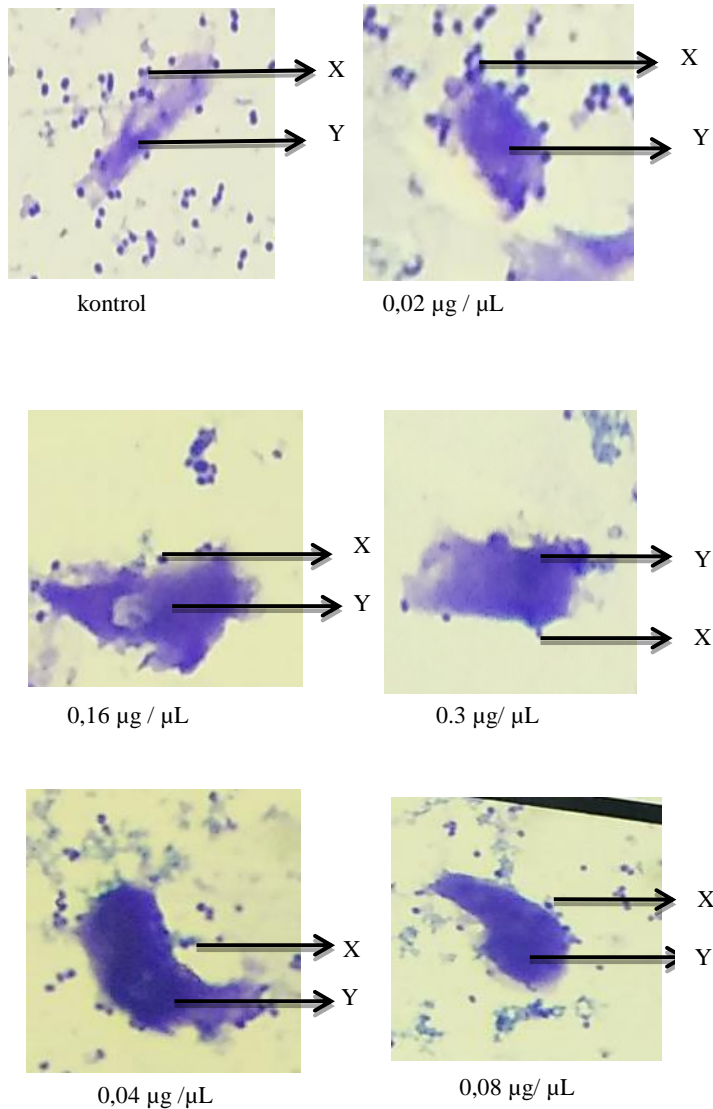
Sumur 4 = Potongan pili kedua

Sumur 5 = Potongan pili ketiga

Sumur 6 = Potongan pili keempat

Gambar 1. Profil protein pili *S. pneumoniae* hasil elektroforesis SDS-PAGE

Uji adhesi dilakukan untuk mengetahui kemampuan protein pili 54 kDa *S. pneumoniae* berperan sebagai protein adhesin. Konsentrasi protein pili yang digunakan dalam uji adhesi yaitu 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, dan 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil uji adhesi protein pili 54 kDa *S. pneumoniae* yang diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 1000x, X = bakteri; Y = sel paru mencit (sel inang).

Berdasarkan pengamatan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x terhadap uji adhesi protein hemaglutinin pili 54 kDa *S. pneumoniae* pada berbagai konsentrasi (Gambar 2) dan berdasarkan hasil penghitungan indeks adhesi (Tabel 1) dapat diketahui bahwa semakin rendah konsentrasi protein pili 54 kDa maka semakin banyak bakteri yang menempel pada sel paru.

Tabel 1. Hasil perhitungan indeks adhesi *S. pneumoniae* pada sel paru mencit.

Ulangan	KONSENTRASI ($\mu\text{g} / \mu\text{L}$)					
	Kontrol	0,02	0,04	0,08	0,16	0,3
1	601	625	526	462	431	413
2	677	538	537	498	403	440
3	653	562	540	483	482	420
Rata-rata	643,6	575,6	543,3	481	438,6	424,3

Analisis statistik menggunakan uji korelasi regresi. Hasil uji korelasi Pearson didapatkan nilai koefisien korelasi $R = -0,840$ yang menunjukkan kekuatan hubungan antar variabel yakni sangat kuat dengan koefisien determinasi $R^2 = 0,997$ yang artinya 99,7 % konsentrasi protein pili 54 kDa *S. pneumoniae* mempengaruhi indeks adhesi.

PEMBAHASAN

Bakteri *S. pneumoniae* merupakan anggota dari famili *Streptococaceae* yang dapat menimbulkan terjadinya penyakit pneumonia dengan cara menginvasi saluran pernapasan atas dengan melakukan adhesi yang diperantarai oleh pili (Paterson dan Baker 2011; Munguia dkk., 2018). Uji adhesi dilakukan untuk membuktikan bahwa protein pili *S. pneumoniae* dengan berat molekul 54 kDa berperan sebagai protein adhesin. Protein adhesin yang terdapat pada pili dianggap sebagai faktor virulensi potensial karena membantu perlekatan bakteri pada sel inang (Moschioni dkk, 2010).

Berdasarkan hasil pengamatan didapatkan hasil indeks adhesi bakteri yang semakin meningkat pada konsentrasi protein pili yang semakin rendah (Gambar 2). Sementara pada kelompok kontrol yang tidak diberi protein pili didapatkan jumlah bakteri yang menempel sangat banyak. Pada Tabel 1 didapatkan hasil rata-rata indeks adhesi yang cenderung mengalami peningkatan pada penurunan konsentrasi bertingkat meliputi 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, dan 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi protein pili yang diberikan maka semakin besar hambatan adhesi sehingga menurunkan indeks adhesi bakteri pada sel paru mencit. Hal ini disebabkan karena reseptor pada sel paru mencit sudah dipenuhi oleh protein pili dengan berat molekul 54 kDa. Semakin banyak reseptor yang ditempati oleh protein pili maka bakteri yang menempel semakin sedikit (Agustina dkk, 2019)

Pada hasil didapatkan: semakin rendah konsentrasi protein pili 54 kDa maka semakin banyak bakteri yang menempel pada sel paru. Bakteri menempel ke sel host diperantarai oleh pili dan reseptor yang ada dipermukaan sel host. Pada saat sel host dipapar oleh protein pili, maka reseptor

akan berikatan dengan protein tersebut, sehingga bakteri tidak bisa menempel. Semakin banyak reseptor sel host yang berikatan dengan protein pili maka semakin sedikit bakteri yang menempel ke sel host.

Protein adhesin adalah molekul bakteri yang melakukan kontak fisik pertama untuk melekat pada sel inang. Interaksi antara protein adhesin dan reseptor sel inang dapat memicu respon inflamasi pejamu (Kline dkk., 2009). Adhesi bakteri pada sel inang diperantarai oleh protein adhesin. Protein adhesin yang terdapat pada pili dianggap sebagai faktor virulensi dan kunci utama dalam proses terjadinya infeksi (Moschioni dkk., 2010). Pili bakteri *S. pneumoniae* mempunyai protein adhesin yaitu RrgA yang merupakan adhesin mayor dari bakteri *S. pneumoniae* serta berperan dalam memediasi adhesi bakteri ke epitel paru-paru (Basset dkk, 2013). Hasil penelitian Mufida dkk., 2018 menunjukkan bahwa protein hemagglutinin 54 kDa mempunyai kemiripan dengan *chain A RrgB of pili S. pneumoniae*. Hasil uji adhesi penelitian ini menunjukkan bahwa protein RrgB juga merupakan protein adhesin.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa protein pili 54 kDa *S. pneumoniae* merupakan protein adhesi yang dapat dikembangkan sebagai kandidat vaksin dalam upaya pencegahan penyakit yang diakibatkan oleh infeksi bakteri *S. pneumoniae*. Penelitian dengan metode ini telah banyak dilakukan pada bakteri, antara lain *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. typhi*, *Porphyromonas gingivalis* (Mufida dan Suswati, 2007; Sumarno dkk, 2012; Agustina dkk 2014; Conolly dkk, 2017). Penelitian sebelumnya terhadap protein hemagglutinin 35,2 kDa pili bakteri *Proteus mirabilis* menyatakan bahwa pili tersebut berperan sebagai protein adhesin (Mufida dan Suswati, 2007). Demikian pula dengan penelitian yang dilakukan oleh Agustina dkk. yang menyimpulkan bahwa protein hemagglutinin 12,8 kDa pili bakteri *Klebsiella pneumoniae* juga berperan sebagai protein adhesin (Agustina dkk., 2014).

KESIMPULAN

Protein hemagglutinin pili *S. pneumoniae* berat molekul 54 kDa merupakan protein adhesin yang berperan pada penempelan bakteri *S. pneumoniae* pada sel paru mencit.

REFERENSI

Agustina, D., S. Retoprawiro, dan N. As. 2014. Inhibition of Bacterial Adhesion on Mice Enterocyte by The Hemagglutinin Pili Protein 12,8 kDa *Klebsiella pneumoniae* Antibody. 4(1):7.

- Agustina, D., Nadyatara, K., Mufida, D.C., Elfiah, U., Shodikin, M.A., Suswati, E. 2019. Faktor Virulensi Outer Membrane Protein 20 kDa *Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin. *eJournal Kedokteran Indonesia*.7(3): 201-204
- Angelis, G., M. Moschioni, A. Muzzi, A. Pezzicoli, S. Censini, I. Delany, 2011. The *Streptococcus Pneumoniae* Pilus-1 Displays A Biphasic Expression Pattern. *PLoS ONE*. 6(6):e21269.
- Bagnoli, F., M. Moschioni, C. Donati, V. Dimitrovska, I. Ferlenghi, C. Facciotti, dkk. 2008. A Second Pilus Type in *Streptococcus Pneumoniae* is Prevalent in Emerging Serotypes and Mediates Adhesion to Host Cells. *Journal of Bacteriology*. 190(15):5480–5492.
- Basset, A., K. H. Turner, E. Boush, S. Sayeed, S. L. Dove, dan R. Malley. 2011. Expression of The Type 1 Pneumococcal Pilus is Bistable and Negatively Regulated by The Structural Component RrgA. *Infection and Immunity*. 79(8):2974–2983.
- Basset, A., F. Zhang, C. Benes, S. Sayeed, M. Herd, C. Thompson, D. T. Golenbock, A. Camilli, dan R. Malley. 2013. Toll-like receptor (TLR) 2 Mediates Inflammatory Responses to Oligomerized RrgA Pneumococcal Pilus Type 1 Protein. *Journal of Biological Chemistry*. 288(4):2665–2675.
- Brooks, L. R. K. dan G. I. Mias. 2018. *Streptococcus Pneumoniae*'s Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Frontiers in Immunology*. 9:1366.
- Connolly, E., Millhouse, E., Doyle, R., Culshaw, C., Ramage, G., Maron, G.P. 2017. *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinins Hag B and Hag C are mayor mediator of adhesion and biofilm formation. *Molecular Oral Microbiology* 32: 35-47
- Danne, C. dan S. Dramsi. 2012. Pili of Gram Positive Bacteria: Roles in Host Colonization. *Research in Microbiology*. 163(9–10):645–65.
- Ehara, M., M. Ishibashi, Y. Ichinose, M. Iwanaga, S. Shimotori, dan T. Naito. 1987. Purification and Partial Characterization of Fimbriae of *Vibrio Cholerae* o1. *Vaccine*. 5(4):283–288.
- Kline, K. A., S. Fälker, S. Dahlberg, S. Normark, dan B. Henriques-Normark. 2009. Bacterial Adhesins in Host Microbe interactions. *Cell Host & Microbe*. 5(6):580–592.
- Liu, L., H. L. Johnson, S. Cousens, J. Perin, S. Scott, J. E. Lawn, dkk. 2012. Global, Regional, and National Causes of Child Mortality: An Updated Systematic Analysis For 2010 With Time Trends Since 2000. *The Lancet*. 379(9832):2151–2161.
- Melvin, J. A., E. V. Scheller, C. R. Noël, dan P. A. Cotter. 2015. New Insight into Filamentous Hemagglutinin Secretion Reveals A Role for Full-length Fhab in *Bordetella* Virulence. *MBio*. 6(4):e01189-15.
- Mitra, S., D. R. Saha, A. Pal, S. K. Niyogi, U. Mitra, dan H. Koley. 2012. Hemagglutinating Activity Is Directly Correlated with Colonization Ability of *Shigellae* in Suckling Mouse Model. *Canadian Journal of Microbiology*. 58(10):1159–1166.
- Moschioni, M., W. Pansegrau, dan M. A. Barocchi. 2010. Adhesion Determinants of the *Streptococcus* Species. *Microbial Biotechnology*. 3(4): 370–388.
- Mufida, D. C. dan E. Suswati. 2007. Protein Hemagglutinin 35,2 kDa Pili *Proteus mirabilis* P355 sebagai Adhesin pada Epitel Vesika Urinaria Kelinci. *Jurnal ILMU DASAR*. 8 (1) : 68-74.

- Mufida, D. C., K. Handono, S. R. Prawiro, dan S. Santoso. 2018. Identification of Hemagglutinin Protein from *Streptococcus Pneumoniae* Pili as A Vaccine Candidate by Proteomic Analysis. *Turkish Journal of Immunology*. 6(1)
- Munguia, J. I., L. Pulzová, K. Bhide, L. Čomor, E. Káňová, Z. Tomečková, I. Širochmanová, dan M. Bhide. 2018. Contribution of pili of *S. pneumoniae* in the onset of meningitis. *Folia Veterinaria*. 62(1):67–72.
- Nagayama, K., T. Oguchi, M. Arita, dan T. Honda. 1995. Purification and Characterization of A Cell Associated Hemagglutinin of *Vibrio Parahaemolyticus*. *INFECT. IMMUN.* 63:6.
- Nelson, A. L., J. Ries, F. Bagnoli, S. Dahlberg, S. Fälker, S. Rounioja, dkk. 2007. RrgA is A Pilus Associated Adhesin in *Streptococcus Pneumoniae*. *Molecular Microbiology*. 66(2):329–340.
- Parija, S. C. 2012. *Microbiology and Immunology*. Edisi 2. Elsevier.
- Paterson, N. G. dan E. N. Baker. 2011. Structure of the full-length major pilin from *streptococcus pneumoniae*: implications for isopeptide bond formation in gram-positive bacterial pili. *PLoS ONE*. 6(7):e22095.
- Poll, T. dan S. M. Opal. 2009. Pathogenesis, Treatment, and Prevention of Pneumococcal Pneumonia. *The Lancet*. 374(9700):1543–1556.
- Simonetti AF, Viasus D, Garcia-Vidal C, Carratalà J. Management of community-acquired pneumonia in older adults. *Ther Adv Infect Dis* (2014) 2(1):3–16.
- Sumarno. 2012. Detection of Molecule Adhesion Sub Unit Pili 48 kDa *Salmonella Typhi* by Immunochemistry Method Using Sera Patients Suffering From Typhoid Fever. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*. 2(9): 8527-8532.
- Thanassi, D. G., J. B. Bliska, dan P. J. Christie. 2012. Surface Organelles Assembled by Secretion Systems of Gram Negative Bacteria: Diversity in Structure and Function. *FEMS Microbiology Reviews*. 36(6):1046–1082.
- United Nations Children's Fund (UNICEF). 2018. Pneumonia. <https://data.unicef.org/topic/child-health/pneumonia/> [Diakses pada 30 Desember 2019].
- World Health Organization. 2017. Pneumonia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia> [Diakses pada 25 Oktober 2019].