

THE EFFECT OF PILI PROTEIN *Streptococcus Agalactiae* ON β -Defensin-2 EXPRESSION IN THE WHITE RAT (*Rattus novergicus*) WISTAR STRAIN FALLOPIAN TUBES

**Nur Rohmah Prihatanti^{1,2}, Hening Ryan Aryani^{1,3}, Istifadatul Ilmiya^{1,4},
Noorhamdani A.S.⁵, Dwi Yuni Nur Hidayati⁵**

¹Program Studi Magister Kebidanan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Lowokwaru, Malang.

²Poltekkes Kemenkes Banjarmasin, Jl. Mistar Cokrokusumo No.1A, Banjarbaru.

³Poltekkes Kemenkes Malang, Jl. Besar Ijen No.77C, Klojen, Malang.

⁴Akademi Kebidanan Jember, Jl. Pangandaran No.42, Sumbersari, Jember.

⁵Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Lowokwaru, Malang.

Corresponding author: Nur Rohmah Prihatanti (nur.rohmahpri@gmail.com)

ARTICLE HISTORY

| Received: 18 October 2020

| Revised: 1 December 2020

| Accepted: 15 December 2020

Abstract

One of the infections of the female genital organs is a fallopian tube infection. Fallopian tube infections can be caused by *Streptococcus agalactiae*. Prevention of infection by *Streptococcus agalactiae* can be done through vaccination. The pili protein *streptococcus agalactiae* is a good vaccine candidate. Pili *Streptococcus agalactiae* plays a role in facilitating the bonding between *Streptococcus agalactiae* and host cells. The pili protein *Streptococcus agalactiae* is obtained from the pili cutting process. The white rats (*Rattus novergicus*) wistar strain were grouped into 5 groups (control and treatment). One week after the last injection of pili protein *Streptococcus agalactiae*, white rats (*Rattus novergicus*) were sacrificed by decapitation technique. The fallopian tube tissues are collected and performed immunohistochemical examination. Immunohistochemical results of β -defensin-2 expression were observed using a 400x magnification microscope and calculated using Image-J software. There is a significant difference in the expression of β -defensin-2 in the fallopian tube of white rat (*Rattus novergicus*) between the control and treatment groups. The higher the dose of pili protein *Streptococcus agalactiae*, the higher the expression of β -defensin-2 in the white rats (*Rattus novergicus*) wistar strain fallopian tubes.

Key words: β -defensin-2, Fallopian Tube, Pili Protein *Streptococcus agalactiae*

PENGARUH PROTEIN PILI *Streptococcus Agalactiae* TERHADAP EKSPRESI β -Defensin-2 PADA TUBA FALLOPI TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*) GALUR WISTAR

Abstrak

Salah satu infeksi pada organ genitalia wanita adalah infeksi tuba fallopi. Infeksi tuba fallopi dapat disebabkan oleh *Streptococcus agalactiae*. Pencegahan infeksi yang disebabkan oleh *Streptococcus agalactiae* dapat dilakukan dengan vaksinasi. Protein pili *Streptococcus agalactiae* merupakan kandidat vaksin yang baik. Pili *Streptococcus agalactiae* berperan penting dalam memfasilitasi ikatan antara *Streptococcus agalactiae* dengan sel inang. Protein pili *Streptococcus agalactiae* didapatkan dari proses pemotongan pili. Tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar dikelompokkan menjadi 5 kelompok (kontrol dan perlakuan). Satu minggu setelah pemberian protein pili *Streptococcus agalactiae* terakhir, tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar dikorbankan menggunakan teknik dekaptasi. Jaringan tuba fallopi diambil dan dilakukan pemeriksaan imunohistokimia. Ekspresi β -defensin-2 hasil imunohistokimia diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x dan dihitung menggunakan software *Image-J*. Terdapat perbedaan ekspresi β -defensin-2 yang signifikan pada tuba fallopi tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar kelompok kontrol dan perlakuan. Semakin tinggi dosis protein pili *Streptococcus agalactiae*, semakin tinggi pula ekspresi β -defensin-2 pada tuba fallopi tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar.

Kata kunci: β -defensin-2, Tuba Fallopi, Protein Pili *Streptococcus agalactiae*

Pendahuluan

Infeksi pada organ genitalia wanita dapat meningkatkan risiko gangguan reproduksi seperti infertilitas dan perkembangan penyakit radang panggul. Salah satu infeksi pada organ genitalia wanita adalah infeksi tuba fallopi dengan prevalensi di dunia mencapai 16,1%.¹ Infeksi tuba fallopi dapat disebabkan mikroorganisme seperti *Streptococcus agalactiae* yang ditularkan secara seksual atau flora endogen yang naik dari organ genitalia bawah (vagina maupun serviks) yang selanjutnya menyebar ke tuba fallopi. Prevalensi infeksi yang disebabkan oleh *Streptococcus agalactiae* secara rektovaginal di dunia adalah 17,9%.²

Pengobatan infeksi yang disebabkan oleh *Streptococcus agalactiae* salah satunya adalah dengan penisilin. Namun, telah dilaporkan terjadi peningkatan kejadian resistensi terhadap penisilin di seluruh dunia yang mengakibatkan pengobatan menjadi tidak efektif dan membutuhkan waktu penyembuhan yang lebih lama. Sehingga diperlukan upaya pencegahan infeksi melalui vaksinasi.⁴

Protein pili *Streptococcus agalactiae* merupakan kandidat vaksin yang baik karena pili *Streptococcus agalactiae* berperan penting dalam memfasilitasi ikatan antara *Streptococcus agalactiae* dengan sel inang dan respons imun yang dibentuk menghasilkan sistem imunitas yang baik.⁵

Pemberian protein pili *Streptococcus agalactiae* dilakukan melalui injeksi subkutan yang dikombinasi dengan *Freund's adjuvant*. *Freund's adjuvant* berperan sebagai imunostimulator yang mampu meningkatkan fungsi dan aktivitas sistem imun. *Freund's adjuvant* dibagi menjadi dua yaitu *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) untuk injeksi pertama dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) untuk injeksi 2 dan 3 sebagai booster.⁶

Complete Freund's Adjuvant (CFA) mengandung mikobakteri kering dan diberikan pada injeksi pertama bertujuan untuk menarik makrofag dan sel lain ke tempat injeksi

yang dapat meningkatkan respons imun sehingga penggunaan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) direkomendasikan pada injeksi awal. *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) mengandung cairan minyak mineral kental berwarna putih yang homogen dan tidak mengandung sel bakteri. *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) akan menyelubungi dan melepaskan antigen secara perlahan dan mentransportasi antigen ke seluruh sistem limfatik sehingga membuat sistem imun lebih kuat karena diperlukan waktu tambahan dalam memproduksi sel B dan T untuk memori imun yang lebih besar. *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) digunakan pada injeksi booster.⁶

Pemberian protein pili *Streptococcus agalactiae* dapat mempengaruhi sistem imun karena protein pili *Streptococcus agalactiae* sebagai antigen yang masuk ke dalam tubuh dikenali oleh Antigen Presenting Cell (APC). Antigen ditangkap sel dendritik kemudian disajikan ke sel T naif dan mengakibatkan terjadinya diferensiasi sel T naif menjadi Th1, Th2, Th17, dan Treg. Th17 menghasilkan sitokin IL-17 yang akan memacu sel untuk mengekspresikan peptida β -defensins. β -defensins dapat menginduksi respons imun adaptif.⁷ Salah satu anggota β -defensins adalah β -defensin-2 yaitu peptida antimikroba yang diproduksi oleh sejumlah sel khususnya sel epitel dan menunjukkan aktivitas antimikroba yang kuat.⁸

Pemberian protein pili *Streptococcus agalactiae* diharapkan mampu meningkatkan ekspresi β -defensin-2 di tuba fallopi sehingga dapat mencegah kolonisasi dan menghambat adhesi mikroba khususnya *Streptococcus agalactiae* di tuba fallopi.

Metode

Alat

Bacterial pili cutter, tabung falcon, tabung eppendorf (Onemed), sentrifus (Becman Coulter Allegra 64R High Speed Centrifuge), mikropipet (Dragon Lab), nanodrop spektrofotometer (Thermo scientific), spuit 1 cc (Onemed), set alat bedah minor (pinset, skalpel, klem, gunting, pemegang jaringan), papan alas pembedahan, toples kaca tertutup tempat organ (berisi larutan formalin 10%), wadah tempat penyimpanan jaringan sementara, *cover glass* dan *object glass* (Gea medical), mikroskop (Olympus BX51).

Bahan

Bakteri *Streptococcus agalactiae*, *Tri Chloroacetic Acid* (TCA), *Phospat Buffer Saline* (PBS), *Aquabidest*, *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) (G-Biosciences), formalin 10%, NaCl 0,9%, xylol, etanol, buffer sitrat pH 6,0, *background snipper*, β -defensin-2 *antibody* (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), *Streptavidin Horseradish Peroxidase* (SA-HRP), *Chromagen Diaminobenzidine* (DAB), *Mayer's Hematoxilen*, entellan (Merck).

Prosedur

Pemotongan Protein pili *Streptococcus agalactiae*

Protein pili *Streptococcus agalactiae* didapat dari proses pemotongan pili. Pili *Streptococcus agalactiae* dipotong dengan *bacterial pili cutter* selama 30 detik pada suhu 4°C dengan kecepatan 6000 rpm. Sampel hasil proses pemotongan disentrifus selama 10 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 12000 rpm dan diulang sebanyak 3 kali guna mengisolasi pemotongan produk protein pili *Streptococcus agalactiae*. Supernatan yang mengandung protein pili *Streptococcus agalactiae* dipisahkan dari endapan dan disuspensi dengan alkohol absolut.

Protein pili *Streptococcus agalactiae* yang telah disuspensi dengan alkohol absolut disentrifus selama 10 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 12000 rpm, endapan yang dihasilkan merupakan bagian dari protein pili *Streptococcus agalactiae*. Protein pili

Streptococcus agalactiae yang telah terisolasi dilakukan pengukuran konsentrasi menggunakan nanodrop spektrofotometer.

Protein pili *Streptococcus agalactiae* sesuai dosis (25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL) disuspensi dengan Phosphat Buffer Saline (PBS) dan dikombinasi dengan *Freund's adjuvant* menggunakan vortex dengan perbandingan volume 1:1 atau 50 µL:50 µL.

Pemberian Protein pili *Streptococcus agalactiae*

Protein Pili *Streptococcus agalactiae* diberikan pada tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar usia 10-12 minggu. Protein Pili *Streptococcus agalactiae* diberikan pada tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar secara injeksi subkutan di bagian abdomen menggunakan spuit 1 cc.

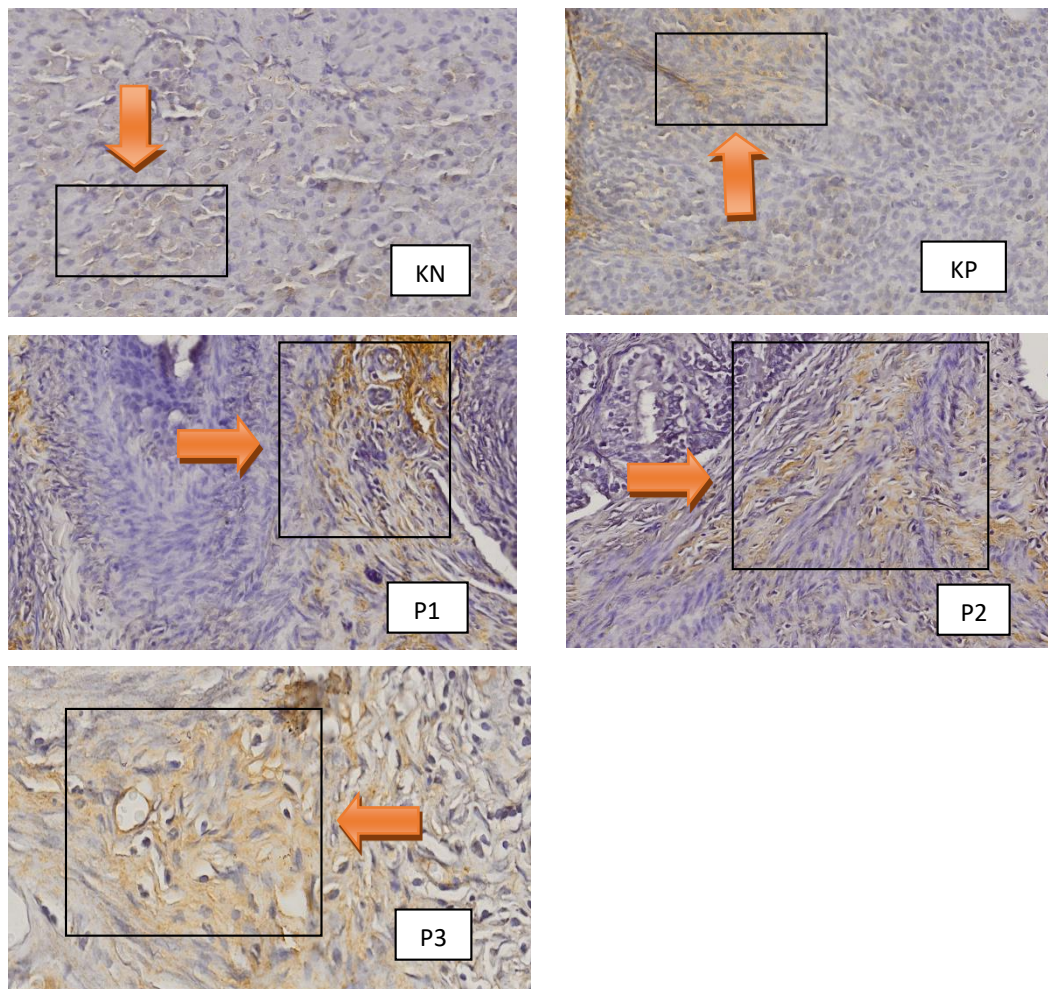
Tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar sejumlah 25 ekor dikelompokkan menjadi 5 kelompok (kontrol dan perlakuan), masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor. Kelompok kontrol negatif (KN) diberi injeksi *aquabidest* 50 µL, kelompok kontrol positif (KP) diberi injeksi *Freund's Adjuvant* 50 µL, kelompok perlakuan 1 (P1) diberi injeksi protein pili *Streptococcus agalactiae* dosis 25 µg/mL dikombinasi dengan *Freund's adjuvant* 50 µL, kelompok perlakuan 2 (P2) diberi injeksi protein pili *Streptococcus agalactiae* dosis 50 µg/mL dikombinasi dengan *Freund's adjuvant* 50 µL, kelompok perlakuan 3 (P3) diberi injeksi protein pili *Streptococcus agalactiae* dosis 75 µg/mL dikombinasi dengan *Freund's adjuvant* 50 µL.

Seluruh tindakan pada tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar dilakukan sebanyak 3 kali yaitu pada hari 1, 7, dan 14. Pada penggunaan *Freund's adjuvant*, hari 1, tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar diberi injeksi protein pili *Streptococcus agalactiae* dikombinasi dengan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA), hari 7 dan 14 sebagai injeksi *booster* 2 dan 3 diberi injeksi protein pili *Streptococcus agalactiae* dikombinasi dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA).⁹

Pemeriksaan Ekspresi β-defensin-2

Satu minggu setelah injeksi terakhir pada kelompok kontrol dan perlakuan, tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar dikorbankan dengan teknik dekapitasi.⁹ Jaringan tuba fallopi diambil dan dilakukan pemeriksaan imunohistokimia. Jaringan tuba fallopi ditanam dalam blok paraffin, dipotong dengan ketebalan 4 µm, selanjutnya diletakkan pada *object glass* dan dilakukan proses pembuatan imunohistokimia. Pembuatan imunohistokimia melalui tahap deparafinisasi dan rehidrasi, *blocking* jaringan tuba fallopi, dan diinkubasi dengan β-defensin-2 *antibody* sehingga ikatan antigen antibodi yang terjadi spesifik untuk β-defensin-2. Tahap akhir, preparat ditetesi satu tetes medium mounting entellan, ditutup dengan *cover glass*, dan diberi label. Hasil imunohistokimia terhadap ekspresi β-defensin-2 diamati dan dianalisa dengan mikroskop tipe Olympus BX51 perbesaran 400x. Ekspresi β-defensin-2 dikuantifikasi menggunakan software *Image-J*.

Hasil

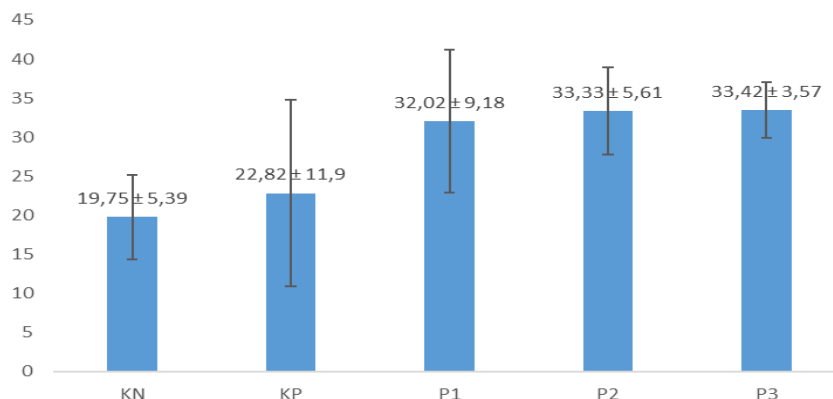


Gambar 1. Hasil pemeriksaan imunohistokimia terhadap ekspresi β -defensin-2 tuba fallopi tikus putih (*Rattus novvergicus*) galur wistar pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan (ditunjukkan dengan warna coklat)

Tabel 1. Ekspresi β -Defensin-2 pada Tuba Fallopi Tikus Putih (*Rattus novvergicus*) galur wistar yang telah dikuantifikasi menggunakan *Image-J*

Perlakuan	Rata \pm SD	<i>p</i> -value
KN	19,75 \pm 5,39	0,013*
KP	22,82 \pm 11,9	
P1	32,02 \pm 9,18	
P2	33,33 \pm 5,61	
P3	33,42 \pm 3,57	

Keterangan:* = Perbedaan rerata signifikan terhadap kontrol negatif pada tingkat 0,05 ($P < 0,05$), Jumlah hewan perkelompok 5 ekor.



Gambar 2. Histogram Pengaruh Pemberian Protein Pili *Streptococcus agalactiae* terhadap Rata-Rata Ekspresi β -Defensin-2 pada Tuba Fallopi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar

Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi β -defensin-2 pada tuba fallopi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar antara kelompok kontrol dan perlakuan. Gambaran pada kelompok kontrol negatif yang diberi *aquabidest* menunjukkan sangat sedikit ekspresi β -defensin-2, kelompok kontrol positif yang diberi *Freund's Adjuvant* menunjukkan ekspresi β -defensin-2 lebih banyak daripada kelompok kontrol negatif, dan pada kelompok perlakuan yang diberi protein pili *Streptococcus agalactiae* dikombinasi dengan *Freund's Adjuvant* menunjukkan ekspresi β -defensin-2 yang semakin meningkat pada dosis yang semakin tinggi. Rerata ekspresi β -defensin-2 paling tinggi ditunjukkan pada tuba fallopi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diberi protein pili *Streptococcus agalactiae* dosis 75 $\mu\text{g/mL}$.

Peningkatan ekspresi β -defensin-2 dibuktikan berdasarkan hasil kuantifikasi menggunakan software *image-j* pada lima lapangan pandang kelompok kontrol dan perlakuan. Ekspresi β -defensin-2 pada kelompok kontrol negatif didapatkan rerata 19,75%, rerata kelompok kontrol positif 22,82%, dan terus meningkat pada kelompok perlakuan, rerata kelompok perlakuan dosis 25 $\mu\text{g/mL}$ adalah 32,02%, rerata kelompok perlakuan dosis 50 $\mu\text{g/mL}$ adalah 33,33%, dan rerata kelompok perlakuan dosis 75 $\mu\text{g/mL}$ adalah 33,42%. Hasil penelitian yang telah dikuantifikasi selanjutnya dianalisa menggunakan uji *anova one way*, didapatkan *p-value* 0,013 (nilai signifikan $<0,05$) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi β -defensin-2 pada tuba fallopi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan.

Peningkatan ekspresi β -defensin-2 pada tuba fallopi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar terjadi karena kehadiran protein pili *Streptococcus agalactiae* sebagai antigen pada lapisan mukosa tuba fallopi ditangkap oleh Antigen Presenting Cell (APC) diperankan oleh sel dendritik yang kemudian dipresentasikan kepada sel T naif menyebabkan diferensiasi sel T naif menjadi sel T *helper* (Th), sel Th berdiferensiasi salah satunya menjadi Th17. Antigen yang masuk mengakibatkan Th17 mengalami peningkatan produksi IL-17 secara signifikan. Peningkatan produksi IL-17 memacu sel epitel pada lapisan mukosa tuba fallopi untuk memproduksi β -defensin-2 yang berperan penting sebagai antimikroba.⁷

Ekspresi β -defensin-2 yang mengalami peningkatan pada penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Clavellina (2012) bahwa terjadi peningkatan ekspresi β -defensin-2 pada membran sel yang dipapar *Streptococcus agalactiae*.¹⁰ Peningkatan ekspresi β -defensin-2 juga ditunjukkan pada hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Mufida (2019) bahwa pemberian protein pili mampu menginduksi

ekspresi β -defensin-2, sedangkan *adjuvant* tidak menginduksi ekspresi β -defensin-2 dan sekaligus menjelaskan bahwa *adjuvant* hanya berfungsi sebagai imunostimulator, sehingga repons imun yang dihasilkan adalah karena dipengaruhi oleh adanya pemberian protein pili.⁸

Kesimpulan

Pemberian protein pili *Streptococcus agalactiae* dapat meningkatkan ekspresi β -defensin-2 pada tuba fallopi tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar. Semakin tinggi dosis pemberian protein pili *Streptococcus agalactiae* semakin tinggi pula ekspresi β -defensin-2. Sehingga protein pili *Streptococcus agalactiae* dapat menjadi kandidat vaksin yang baik dalam mencegah infeksi pada organ genitalia wanita khususnya pada tuba fallopi yang disebabkan oleh *Streptococcus agalactiae*.

Daftar Pustaka

1. Owthor, L.E., Reese, S., and Kölle, S. Salpingitis Impairs Bovine Tubal Function and Sperm-Oviduct Interaction. *Scientific Reports*. 2019;9(1);1-15.
2. Kwatra, G., Cunnington, M.C., Merrall, E., Adrian, P.V., Ip, M., Klugman, K.P., et al. Prevalence of Maternal Colonisation with Group B Streptococcus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016;16(9);1076-1084.
3. Hayati, Z. Infeksi Streptokokus Grup B (SGB) pada Ibu Hamil dan Neonatus: Diagnosis dan Pencegahan. *Jurnal Kedokteran Yarsi*. 2010;18(1);79-85.
4. Banno, H., Kimura, K., Seki, T., Jin, W., Wachino, J., Yamada, K., et al. High Isolation Rate and Multidrug Resistance Tendency of Penicillin-Susceptible Group B Streptococcus with Reduced Ceftibuten Susceptibility in Japan. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2018;37(8);1511-1519.
5. Cozzi, R., Malito, E., Lazzarin, M., Nuccitelli, A., Castagnetti, A., Bottomley, M.J., et al. Structure and Assembly of Group B Streptococcus Pilus 2b Backbone Protein. *PLoS ONE*. 2015;10(5);1-21.
6. Sari, R., Setyawan, A., dan Suparmono. Peningkatan Imunogenitas Vaksin Inaktif *Aeromonas salmonicida* dengan Penambahan Adjuvant pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan [Serial Online]*. 2013;1(2);152-162.
7. Fitrianiingsih, A.A., Rachma, L.N., dan Milliana, A. Protein Adhesi Sub Unit Pili *Shigella flexneri* 18 kDa Meningkatkan Ekspresi Protein Antimikroba β -defensin pada Mencit (Strategi Pengembangan Vaksin Shigellosis Berbasis Protein Adhesi). *Journal of Islamic Medicine*. 2018;2(4);44-53.
8. Mufida, D.C., Agustina, D., Armiyanti, Y., Handono, K., Prawiro, S.R., dan Santoso, S. Intranasal Immunization with The 54 kDa Hemagglutinin Pili Protein of *Streptococcus pneumoniae* That Increase The Expression of β -defensin-2. *Drug Invention Today*. 2019;11(10);2609-2615.
9. Wang, J.L., Bu, R.E., Wu, J.H., Xi, L.G.W., Chen, J.L., Sun, L.J., et al. Immunizing Mice Using Different Combination Antigens of The PI-2a Fimbria Subunit of *Streptococcus agalactiae*. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2019;20(3);199-203.
10. Clavellina, V.Z., Lopez, G.G. and Espinosa, P.F. Evidence of in vitro differential secretion of human beta-defensins-1,-2, and-3 after selective exposure to *Streptococcus agalactiae* in human fetal membranes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2012;25(4);358-363.