

UJI REAKSI SILANG IgG TERINDUKSI PROTEIN ADHESIN PILI 49 kDa

Shigella dysenteriae* DENGAN PILI 49 kDa *Shigella flexneri

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



Oleh:

Y. Rama Kusuma Aji Wijaya

NIM: 0910710133

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG



2013



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

UJI REAKSI SILANG IgG TERINDUKSI PROTEIN ADHESIN PILI 49 kDa *Shigella dysenteriae* DENGAN PILI 49 kDa *Shigella flexneri*

Oleh :

Yannita Rama Kusuma Aji Wijaya
NIM : 0910710133

Telah diuji pada :
Hari : Jumat
Tanggal : 1 Maret 2013
Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

Dr. dr. Sri Poeranto YS, MKes, SpParK
NIP. 19520506 198002 1 002

Penguji II / Pembimbing I

Penguji III / Pembimbing II

Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, SpMK(K)
NIP. 19480706 1982002 1 001

dr. Roekistiningseh, DMM, MS, SpMK(K)
NIP. 19490206 197803 2 001

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kedokteran

Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardiono, DTM&H, MSc, SpParK
NIP. 19520410 198002 1 001

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah, segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT serta Nabi besar Muhammad SAW karena atas karunia dan petunjuk yang diberikan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul Uji Reaksi Silang IgG Terinduksi Protein Adhesin Pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dengan Pili 49 kDa *Shigella flexneri*. Tugas Akhir ini merupakan bagian dari persyaratan memperoleh gelar sarjana kedokteran.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Allah SWT. Atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga pengerjaan tugas ini bisa berjalan lancar.
2. Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Prof. dr. Teguh W.S., SpParK selaku ketua program Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
4. Dr. dr. S. Poeranto, SpParK selaku dosen penguji, atas segala bimbingan, pengarahan dan kesabarannya sehingga TA ini dapat terselesaikan dengan baik.

4. Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM., SpMK(K) selaku dosen pembimbing pertama sekaligus dosen penguji, atas segala bimbingan, pengarahan dan kesabarannya, sehingga TA ini dapat terselesaikan dengan baik.
4. dr Roekistingisih, DMM.,MS.,SpMK(K) selaku dosen pembimbing kedua sekaligus dosen penguji, atas segala bimbingan, pengarahan dan kesabarannya, sehingga TA ini dapat terselesaikan dengan baik.
5. Keluargaku tersayang, Bapak, Ibu, Eyang Putri Kreet, Eyang Putri Solo, Almarhum Eyang Kakung Moerdani, Almarhum Eyang Kakung Priyo, atas cinta, kasih sayang, doa dan dukungan yang luar biasa.
6. Untuk otakku untuk semua dukungan yang telah diberikan.
7. Sahabat-sahabat seperjuanganku, Riski, Bagus, Budi, Limbuk, Harry, Yossa, Nathan, Waropen, Kevin, Surdi dan semua teman-temanku yang tidak dapat kusebutkan satu persatu, atas bantuan bahan-bahan rujukan dan bantuan tenaga waktunya.
8. Mas Ali, serta seluruh staf Laboratorium Biomedik dan Mikrobiologi atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian ini.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Akhirnya, semoga TA ini dapat bermanfaat dan menambah wawasan mengenai Shigella sehingga vaksin untuk Shigella segera dapat direalisasikan.

Akhir kata, Wassalamualaikum Wr. Wb.

Malang, Februari 2013

Penulis

ABSTRAK

Wijaya, Y Rama Kusuma Aji. 2013. *Uji Reaksi Silang IgG Terinduksi Protein Adhesin Pili 49 kDa Shigella dysenteriae dengan Pili 49 kDa Shigella flexneri*. Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Dosen pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM., MS., Sp.MK (K) (2) dr. Roekistiningsih, DMM., MS., Sp.MK (K).

Diare merupakan masalah yang belum terselesaikan untuk negara berkembang, tidak terkecuali Indonesia. Salah satu agen penyebab diare adalah bakteri *Shigella*. Kasus resistensi antibiotik semakin banyak dilaporkan tiap tahunnya, karena itu diperlukan terobosan baru dalam penanganan diare salah satunya adalah dengan menggunakan vaksin. Vaksin yang banyak diteliti akhir-akhir ini adalah vaksin yang bertujuan mencegah perlekatan patogen atau vaksin yang bertujuan mencegah tingkat keparahan penyakit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ada reaksi silang antara IgG terinduksi protein adhesin pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dengan pili 49 kDa *Shigella flexneri*. Metode yang digunakan adalah dengan metode *Dot Blot* dengan pengenceran antibodi 1/1600 dan pengenceran antigen 1/1000, 1/5000, 1/25.000, 1/125.000, 1/625.000, 1/3.125.000, 1/15.625.000, 1/78.125.000, 1/390.625.000, dan 1/1.953.125.000. Gradasi warna pada hasil *Dot Blot* kemudian dihitung menggunakan fasilitas histogram pada program *Adobe Photoshop*. Nilai dari histogram tersebut kemudian dianalisis dengan uji korelasi *Pearson* dan *Independent t-Test* menggunakan program *SPSS 16 for Windows*. Hasil koefisien korelasi *Pearson* adalah sebesar -0,825 untuk pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dan -0,557 untuk *Shigella flexneri* dengan *p value* 0,00 untuk *Shigella dysenteriae* dan *p value* sebesar 0,01 untuk *Shigella flexneri*. Sedangkan hasil uji *Independent t-Test* adalah $t = 0,004$. Karena kesamaan kecenderungan korelasi terhadap pengenceran antigen dan kemiripan interaksi antibodi terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* terhadap pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dan pili 49 kDa *Shigella flexneri*, maka dapat disimpulkan bahwa ada reaksi silang antara antibodi terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dengan pili 49 kDa *Shigella flexneri*.

Kata kunci: IgG, protein adhesin pili, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, reaksi silang

ABSTRACT

Wijaya, Y Rama Kusuma Aji. 2013. *Testing Cross Reactivity between Shigella dysenteriae 49 kDa adhesion protein pilli induced IgG and Shigella flexneri 49 kDa pilli*. Final Assignment. Medical Program, Brawijaya University. Supervisor: (1) Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM., MS., Sp.MK (K) (2) dr. Roekistiningsih, DMM., MS., Sp.MK (K).

Diarrhea is still an unresolved problem in developing country, and Indonesia is no exception. One of the common agent causing diarrhea is Shigella. With more reported antibiotic resistance case each year, a new approach should be invented in management of diarrhea caused by Shigella, such as Shigella vaccine. Most of the vaccine nowadays are either vaccine preventing adhesion of pathogen to host cell or vaccine reducing severity of disease. The purpose of this study was to observe the cross reactivity between *Shigella dysenteriae* 49 kDa adhesion protein pilli induced IgG and *Shigella flexneri* 49 kDa pilli. Dot Blot method was used in this study with antibody titer of 1/1600 and antigen titer of 1/1000, 1/5000, 1/25.000, 1/125.000, 1/625.000, 1/3.125.000, 1/15.625.000, 1/78.125.000, 1/390.625.000, and 1/1.953.125.000 respectively. The color gradation strength from Dot Blot result then was analyzed using histogram from Adobe Photoshop program. Pearson correlation test and Independent t-Test then was performed using SPSS 16 for Windows to the histogram data. Pearson correlation coefficient was -0,825 for pilli 49 kDa *Shigella dysenteriae* and -0,557 for pilli 49 kDa *Shigella flexneri* with p value of 0.00 for *Shigella dysenteriae* and 0.01 for *Shigella flexneri*. The result of Independent t-Test was $t = 0,004$ with df of 18. Since the both the histogram data of pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* and pili 49 kDa *Shigella flexneri* has the same correlation tendency and similarity in interaction pattern, hence it can be concluded that there is a cross reactivity between *Shigella dysenteriae* 49 k Da adhesion protein pilli induced IgG and *Shigella flexneri* 49 kDa pilli.

Keywords: IgG, *pilli adhesion protein*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, cross reactivity.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul	i
Lembar Pengesahan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	v
Daftar Isi	vii
Daftar Gambar	x
Daftar Tabel	xi
Daftar Lampiran	xii
Daftar Singkatan	xiii

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3



1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.4.1 Manfaat akademis	3
1.4.2 Manfaat praktis	4

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Morfologi dan Karakteristik <i>Shigella</i> spp.	5
2.2 Struktur Antigen <i>Shigella</i> spp.	6
2.3 Patogenesis Shigellosis	7
2.4 Manifestasi Klinis, Diagnosis dan Penatalaksanaan Shigellosis	9
2.5 Vaksin <i>Shigella</i>	10
2.6 Reaksi Silang.....	11

BAB 3 KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep Penelitian	13
3.2 Hipotesis Penelitian.....	14

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian	15
4.2 Populasi dan Sampel	16
4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian	16
4.4 Instrumen Penelitian	16



4.5 Definisi Operasional	17
4.6 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data	17
4.6.1 Persiapan Bakteri <i>Shigella flexneri</i>	17
4.6.2 Isolasi Protein Pili <i>Shigella dysenteriae</i> dan <i>Shigella flexneri</i>	18
4.6.3 Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).....	20
4.6.4 Persiapan Elektroelusi dan Dialisis	22
4.6.5 Induksi dan Koleksi IgG pili 49 kDa <i>Shigella dysenteriae</i>	23
4.6.6 Dot Blotting.....	24
4.7 Pengumpulan Data.....	26
4.8 Analisis Data	26
 BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	
5.1 Skema Alur Penelitian	27
5.1 Hasil Penelitian.....	27
5.2 Analisis Data.....	30
5.2.1 Uji Normalitas Data.....	30
5.2.2 Uji Homogenitas Data.....	30
5.2.3 Uji Koralasi <i>Pearson</i>	30
5.2.4 Uji <i>Independent t-Test</i>	31
 BAB 6 PEMBAHASAN.....	33

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan.....	35
7.2 Saran.....	35
DAFTAR PUSTAKA	36
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	40
LAMPIRAN.....	41

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Morfologi Shigella	5
Gambar 2.2 Kultur Shigella	6
Gambar 2.3 Infeksi Shigella	7





DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 4.1 Komposisi Bahan-bahan Pembuatan *Main Gel* dan Stacking Gel SDS-

PAGE

22

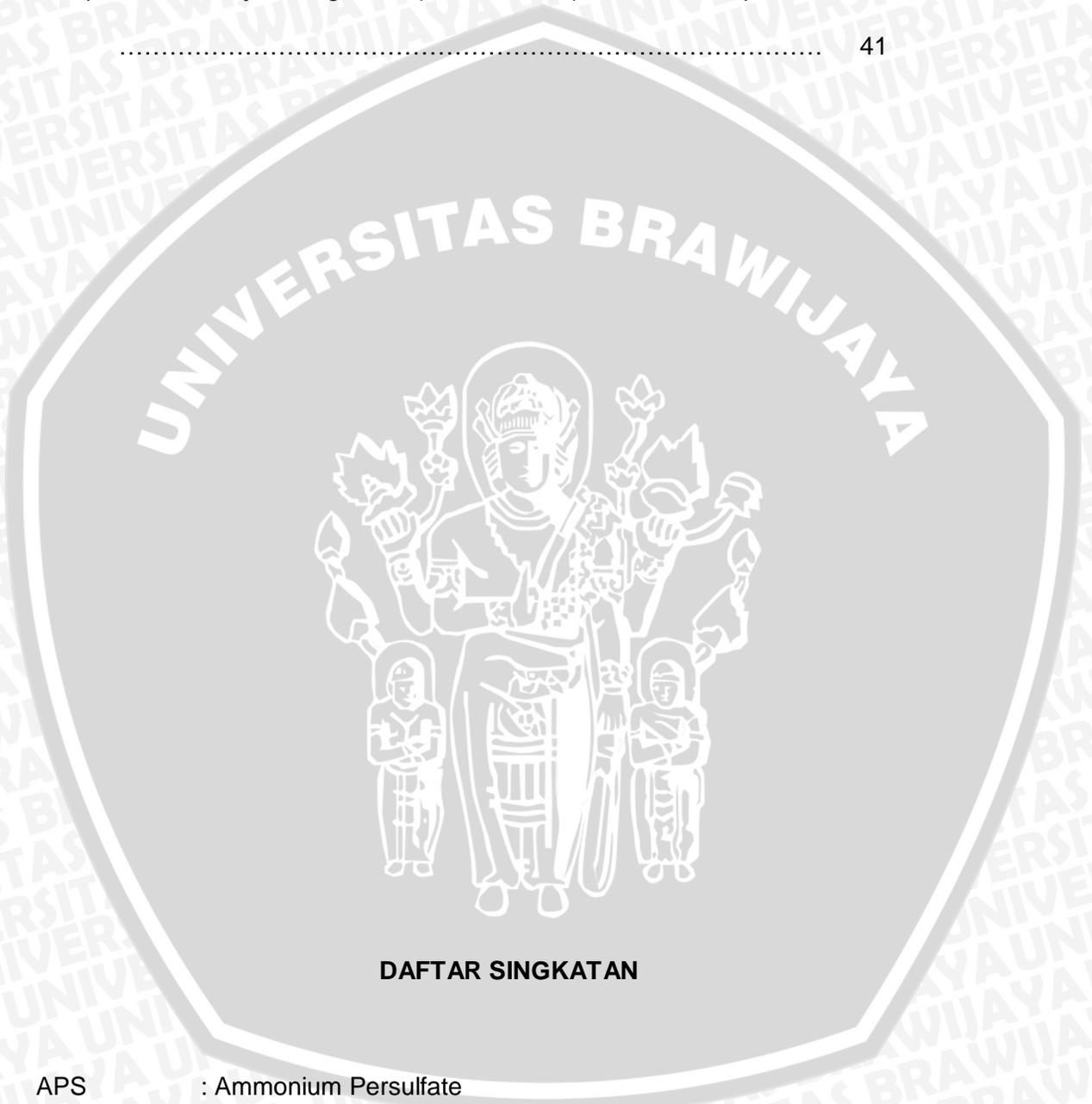


DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Hasil Uji Checkboard	40
Lampiran 2 Hasil Uji Normalitas	40
Lampiran 3 Hasil uji korelasi <i>Pearson</i> pili 49 kDa <i>Shigella dysenteriae</i> dan pili 49 kDa <i>Shigella flexneri</i>	



Lampiran 4 Hasil uji homogenitas (Levene's test) dan hasil *Independent t-Test*



DAFTAR SINGKATAN

- APS : Ammonium Persulfate
- BHI : Brain Heart Infusion
- EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid



HUS	: Hemolytic-uremic syndrome
IgG	: Immunoglobulin-G
ISCOM	: Immunostimulating complex
LPS	: Lipopolysaccharide
NC	: Nitrocellulose
PBS	: Phospat Buffer Solution
SA-HRP	: Streptavidin-horseradish peroxidase
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel
ShET-1	: Shigella enterotoxin 1
ShET-2	: Shigella enterotoxin 2
SSA	: Salmonella Shigella Agar
TBS	: <i>tert</i> -butyldimethylsilyl
TCA	: Trichloroacetic Acid
TCG	: Tris-Citrate-Glucose
TMB	: Tetramethylbenzydine

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diare dapat didefinisikan sebagai penurunan konsistensi feses, disertai peningkatan frekuensi gerak peristaltik usus hingga lebih dari tiga kali per hari. Disebut diare akut, jika terjadi peningkatan jumlah cairan, yang merupakan komponen feses, serta berlangsung selama kurang dari 14 hari, dan jika berlangsung lebih dari 14 hari maka disebut diare persisten atau kronis. Sebagian besar diare disebabkan oleh infeksi pathogen, baik berupa virus maupun bakteri. Salah satu bakteri penyebab diare yang paling banyak diisolasi adalah bakteri *Shigella* (Walker, 2008; Walker *et al.*, 2010).

Shigellosis masih menjadi suatu masalah yang belum terselesaikan di negara berkembang. Sebuah studi yang dilakukan pada tahun 2003, menyebutkan bahwa angka mortalitas diare pada anak usia dibawah 5 tahun di negara berkembang mencapai 4,9 per 1000 per tahunnya. Di Kolkata, India, dan di Lagos, Nigeria, sebagian besar penyebab diare adalah *Shigella flexneri*. Di Indonesia, sebuah studi yang dilakukan pada bulan Februari 2005 sampai September 2007 di Jakarta Selatan yang dilakukan pada 612 anak umur 0-12 tahun dengan diare menunjukkan bahwa *Shigella* menyebabkan 9,3% diare dari seluruh kasus. Sebanyak 63,2% dari *Shigella* yang diisolasi merupakan *Shigella flexneri* (Seidlein *et al.*, 2006; Kosek, 2003; Taneja *et al.*, 2006; Iwalokun *et al.*, 2001; Herwana *et al.*, 2010).

Infeksi *Shigella* terjadi melalui transmisi fekal-oral. Kemudian bakteri *Shigella* tersebut masuk ke usus dan menyebabkan diare berair yang disertai sindrom disentri. Diare berair yang mendahului sindrom disentri disebabkan oleh kombinasi enterotoksin dan inflamasi mukosa. Enterotoksin ini dihasilkan oleh beberapa strain *Shigella dysenteriae* dan *Shigella flexneri*. Sedangkan sindrom disentri sendiri disebabkan oleh invasi mukosa oleh bakteri. Selain diare berair dan sindrom disentri, manifestasi klinis lain yang dapat berupa demam sesaat, rasa lemah dan turunnya nafsu makan. *Shigella* juga dapat menyebabkan manifestasi sistemik berupa *Hemolytic-uremic syndrome* dengan angka mortalitas yang tinggi (Schroeder *et al.*, 2008; Harrison, 2011).

Terapi untuk Shigellosis adalah antibiotika yang harus disesuaikan dengan situasi, karena mayoritas pasien yang rentan adalah anak usia dibawah 5 tahun. Tetapi, menurut data dari WHO yang dihimpun dari enam negara di Asia (Bangladesh, China, Pakistan, Indonesia, Vietnam dan Thailand) pada tahun 2000-2004, menyatakan bahwa penggunaan antibiotik yang kurang terkontrol menyebabkan meningkatnya resiko munculnya strain *Shigella* yang multiresisten. Pada umumnya resistensi tersebut terjadi pada antibiotika golongan *ampicillin*, *chloramphenicol*, *tetracycline* dan *trimethoprim-sulfamethoxazole*. (Harrison, 2011; Nguyen *et al.*, 2005; Chhour *et al.*, 2011; Subekti dkk., 2001)

Salah satu pencegahan terhadap Shigellosis yang dapat dilakukan adalah dengan cara vaksinasi. Vaksin yang banyak dikembangkan sekarang adalah vaksin dengan basis molekul adhesi. Molekul adhesi dipilih sebagai basis karena dengan mencegah perlekatan pathogen pada *host*, maka proses pathogenesis dapat

dicegah sehingga tidak timbul penyakit. Berdasarkan penelitian terbaru pada tahun 2011, protein adhesin pili 49 kDa dari *Shigella dysenteriae* berperan sebagai molekul adhesi *Shigella dysenteriae*. Protein adhesi pili ini sangat berpotensi untuk dijadikan kandidat vaksin. (Savarino *et al.*, 2003; WHO, 2009; Cooper, 2004; Prabowo, 2011).

Induksi protektivitas untuk lebih dari satu spesies pathogen adalah nilai lebih untuk suatu vaksin. Berdasarkan alasan tersebut, maka perlu dilakukan studi terlebih dahulu tentang reaksi silang antara antibodi yang diinduksi oleh protein adhesin pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* terhadap spesies bakteri yang lain. Studi yang dilakukan sebaiknya dilakukan antar spesies *Shigella* karena kedekatan kekerabatan yang paling dekat adalah antara organisme dengan genus yang sama.

Berdasarkan data diatas, maka penulis mengambil judul “Uji Reaksi silang IgG Terinduksi Protein Adhesin Pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dengan Pili 49 kDa *Shigella flexneri*” dan berharap dapat tercipta suatu vaksin yang dapat melingkupi semua spesies *Shigella* sehingga angka morbiditas dan mortalitas akibat Shigellosis dapat ditekan.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ada reaksi silang IgG terinduksi protein adhesin pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dengan pili 49 kDa *Shigella flexneri*?

1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui apakah ada reaksi silang IgG terinduksi protein adhesin pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dengan pili 49 kDa *Shigella flexneri*.

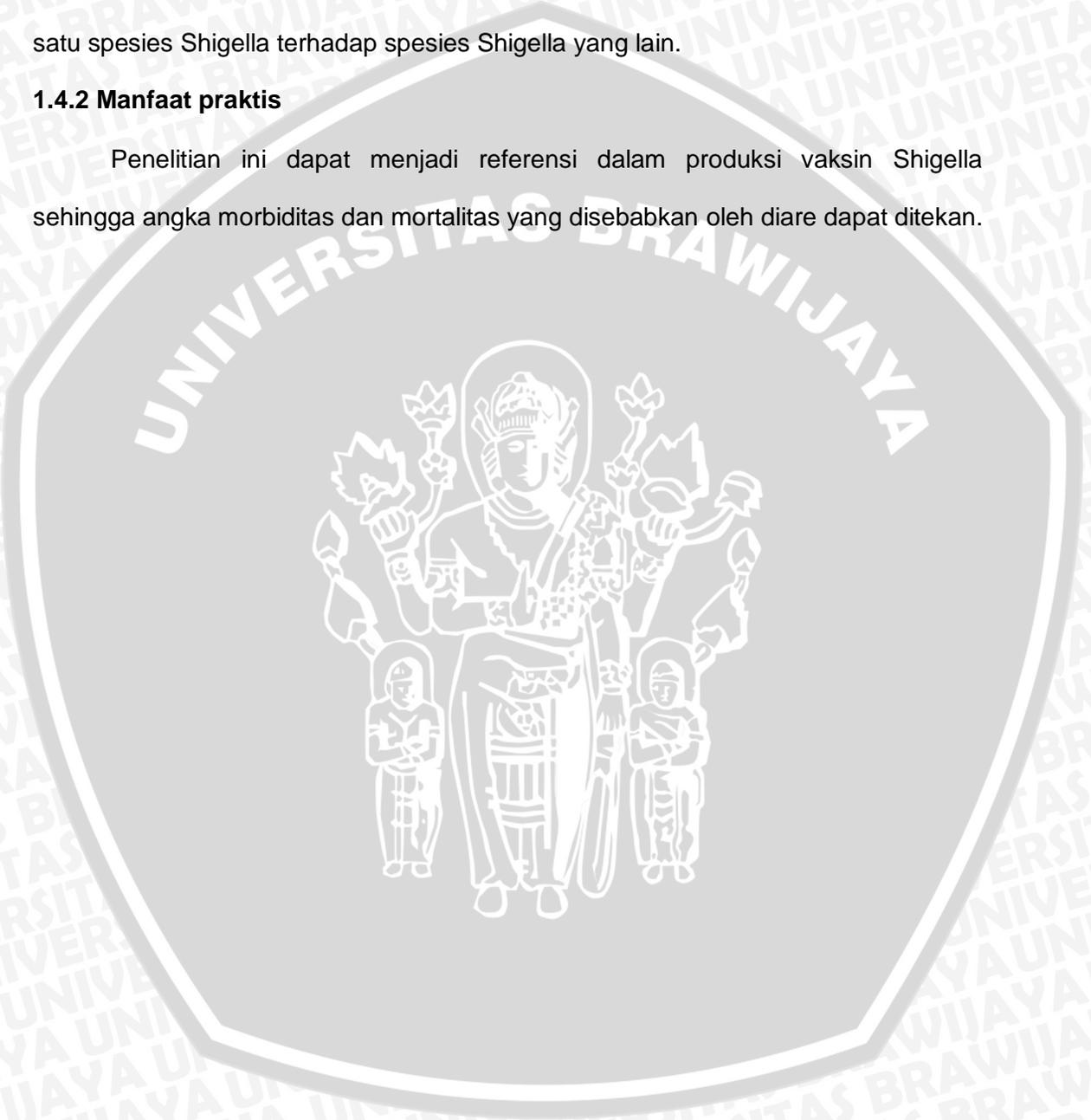
1.4 Manfaat Penelitian

1. 4.1 Manfaat akademis

Menambah pengetahuan tentang Shigella, yang selama ini masih kurang dieksplorasi, terutama mengenai interaksi antibodi yang dihasilkan karena infeksi satu spesies Shigella terhadap spesies Shigella yang lain.

1.4.2 Manfaat praktis

Penelitian ini dapat menjadi referensi dalam produksi vaksin Shigella sehingga angka morbiditas dan mortalitas yang disebabkan oleh diare dapat ditekan.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Morfologi dan Karakteristik *Shigella* spp.

Shigella tergolong ke dalam family Enterobacteriaceae. *Shigella* berbentuk batang ramping gram negatif non-motil, meskipun pada kultur muda *Shigella* dapat ditemui bentuk *cocobacillus*. *Shigella* adalah organisme anaerob fakultatif tetapi tumbuh paling baik dalam kondisi aerob (Brook, *et al.*, 2007).



Gambar 2.1 Morfologi *Shigella* (Science Photo Library, 2011).

Seperti halnya Enterobacteriaceae lainnya, *Shigella* dapat dikultur pada medium sederhana meskipun medium tersebut hanya memiliki sumber energi karbon tunggal. *Shigella* memiliki medium selektif yaitu medium *Hektoen Enteric agar*. Koloninya berbentuk konveks, bulat, warna mendekati merah jambu, transparan, dengan atau tanpa tepi yang rata dan mampu mencapai diameter 2 mm dalam waktu 24 jam. *Shigella* spp. tidak menghasilkan spora. Sebagian besar spesies *Shigella* tidak menghasilkan gas ketika memfermentasikan glukosa. Semua spesies *Shigella* tidak memfermentasikan laktosa kecuali *Shigella sonnei*. Koloni

Shigella juga dapat dibedakan dengan bakteri lainnya karena tidak menunjukkan motilitas, H₂S, produksi gas, dan dekarboksilasi lysine (Brook, *et al.*, 2007; Andrews *et al.*, 2001).



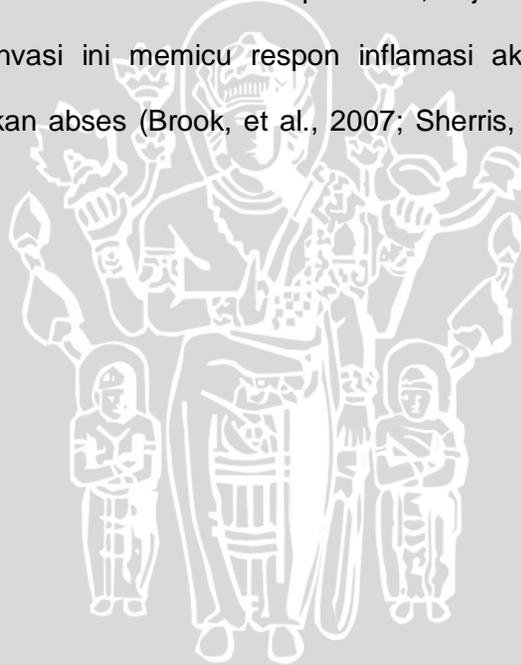
Gambar 2.2 Kultur *Shigella*. (Todar, 2009)

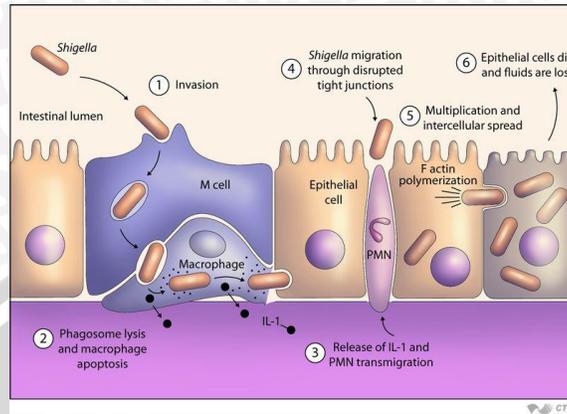
2.2 Struktur Antigen *Shigella spp.*

Tidak seperti family Enterobacteriaceae yang memiliki 3 jenis antigen, yaitu antigen O, antigen K dan antigen H, genus *Shigella* hanya memiliki antigen O. *Shigella* diklasifikasikan menjadi beberapa serotipe menurut variabilitas antigen O karena mereka tidak memiliki antigen K dan antigen H. Berdasarkan variabilitas antigen O dan reaksi biokimia, genus ini dibagi menjadi 4 spesies. Keempat spesies tersebut adalah *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, dan *Shigella sonnei*. Serotipe 1 *Shigella dysenteriae* menjadi perhatian utama karena kemampuannya untuk mengekspresikan *Shiga toxin* dan resistensinya terhadap obat antimikroba (Brook, *et al.*, 2007).

2.3 Patogenesis Shigellosis

Infeksi shigella hampir selalu terbatas pada sistem pencernaan, khususnya traktus gastrointestinal, dan jarang terjadi *bacteremia*. Shigellosis sangat menular, dosis infeksiya adalah 10^3 organisme. Jumlah ini lebih sedikit dibandingkan Salmonella dan Vibrio yaitu 10^5 - 10^8 organisme. Hal ini disebabkan karena Shigella memiliki kelebihan berupa ketahanan terhadap kondisi asam sehingga dapat bertahan hidup ketika melewati lambung dan mencapai kolon tanpa mengalami perubahan jumlah yang berarti. Setelah mencapai kolon, terjadi invasi oleh Shigella pada mukosa kolon. Invasi ini memicu respon inflamasi akut dengan ulserasi mukosa dan pembentukan abses (Brook, et al., 2007; Sherris, 2004; Schroeder et al., 2008).





Gambar 2.3 Infeksi Shigella (Johns Hopkins Bloomberg)

Shigella menginvasi epitel kolon dengan *transcytosis* melalui sel M dan melakukan penetrasi pada membran basolateral lapisan sel epitel, kemudian menyebar secara lateral dari sel ke sel. Shigella menginvasi sel M karena sel tersebut tidak memiliki susunan enterosit absorpsi yang terorganisir dengan baik. Proses invasi ini diperantarai oleh sekelompok antigen plasmid invasi. Antigen plasmid invasi tersebut adalah IpA, IpB, dan IpC. Antigen plasmid invasi tersebut diinjeksikan oleh sistem sekresi kontak ketika terjadi kontak Shigella dengan enterosit. Setiap antigen plasmid invasi tersebut memiliki aksi individu, antara lain adhesi, reorganisasi sitoskeleton, polimerisasi aktin dan induksi apoptosis. Untuk modifikasi sitoskeleton, tidak mengarah pada pembentukan lesi, tapi lebih ke arah endositosis Shigella oleh enterosit (WHO, 2009; Sherris, 2004).

Shigella dapat beradaptasi dengan lingkungan intraseluler dan dapat memanfaatkannya untuk melanjutkan proses infeksi. Di dalam sitoplasma Shigella dapat memanipulasi *cytoskeletal apparatus* sel sehingga Shigella dapat bereplikasi dan bergerak dengan bebas. Pada suatu saat, Shigella akan bergerak mendekati membran sel inangnya, kemudian mendorong membran sel sejauh kira-

kira 20 μm , membuatnya berada di sel tetangga inangnya tetapi masih dibungkus oleh membran ganda. *Shigella* kemudian melisiskan kedua membrane tersebut, berpindah ke sitoplasma sel inang yang baru dan memulai siklus baru. Penyebaran antarsel ini menyebabkan *focal ulcer* yang menyebar secara radial pada mukosa kolon. Ulcer tersebut menyebabkan *Shigella* mampu mencapai lamina propria dimana mereka memicu respons inflamasi akut. Penyebaran lebih jauh dari lamina propria sangat jarang ditemui pada individu yang sehat. Diare yang disebabkan oleh proses ini terdiri atas feses volume kecil yang mengandung sel darah putih, sel darah merah, dan bakteri (WHO, 2009; Sherris, 2004).

Salah satu spesies *Shigella*, yaitu *Shigella dysenteriae* tipe 1 (*Shiga bacillus*) mempunyai kemampuan untuk memproduksi eksotoksin tidak tahan panas yang dapat mempengaruhi traktus gastrointestinal dan sistem syaraf pusat. Eksotoksin ini juga dapat menyebabkan perubahan permeabilitas membrane sel makrofag yang terinfeksi dengan cepat dan menghancurkan fungsi mitokondrialnya. *Shiga toxin* tidak mempunyai kontribusi apapun terhadap Shigellosis, tetapi mempunyai kontribusi terhadap tingkat keparahan penyakit. Beberapa toksin lain adalah *Shigella* enterotoksin 1 (ShET-1) dikodekan oleh gen kromosomal yang terdapat pada *Shigella flexneri* strain 2a, dan *Shigella* enterotoksin 2 (ShET-2) dikodekan oleh plasmid virulensi yang dimiliki oleh sebagian besar *Shigella spp.* *Shiga toxin* masuk ke dalam tubuh dengan cara *macropinocytosis* pada epitel enterosit dilanjutkan dengan *trancytosis* menuju basolateral. *Shiga toxin* memiliki kemampuan untuk menghambat sintesis protein pada sel eukaryotic melalui inaktivasi RNA ribosom, yang dapat menyebabkan kematian sel. *Shiga toxin* juga memiliki karakteristik

sitotoksik, neurotoksik dan enterotoksik. Targetnya adalah sel epitelial glomerulus dan sel endothel mikrovaskuler sistem syaraf pusat, sehingga dapat menyebabkan *haemolytic-uremic syndrome* (HUS) dan kejang (Brook, *et al.*, 2007; Koterski *et al.*, 2005; Cherla *et al.*, 2003; Lukyanenko *et al.*, 2011).

2.4 Manifestasi Klinis, Diagnosis dan Penatalaksanaan Shigellosis

Variasi manifestasi klinis dan tingkat keparahan Shigellosis lebih dipengaruhi oleh umur, kondisi imunologis dan status nutrisi pasien, sedangkan jenis spesies tidak banyak berpengaruh. *Triad of dysentery syndrome* (feses volume rendah mengandung mucus bercampur darah, tenesmus dan *abdominal cramp*) sering digunakan sebagai patokan untuk membedakan disentri karena *Shigella* dengan disentri karena amuba. Manifestasi awal yang sering ditemui adalah demam akut, *watery diarrhea* terbatas, lemah dan *anorexia*. Fase awal ini dapat menjadi satu-satunya manifestasi klinis Shigellosis, terutama pada negara berkembang (Keusch, 2009).

Gold standard untuk penegakan diagnosis Shigellosis adalah isolasi dan identifikasi bakteri patogen dari material feses. Kultur *Shigella spp* dapat dilakukan pada medium *Shigella broth* yang ditambah dengan *novobiocin* untuk membuat lingkungan yang selektif. Hasil kultur kemudian dianalisis untuk menentukan spektrum dan strainnya (Mikoleit, 2010).

Penatalaksanaan Shigellosis adalah dengan terapi antibiotika. Terapi lini pertama adalah *Ciprofloxacin*. Untuk terapi lini kedua dapat diberikan *Pivmecillinam*, *Ceftriaxone* atau *Azithromycin*. Terapi untuk Shigellosis harus disesuaikan dengan kondisi klinis penderita, yang mayoritas adalah anak balita. Selain itu, terapi

antibiotika sebaiknya juga tidak diberikan pada pasien dengan kasus Shigellosis ringan dengan tujuan mencegah resistensi *Shigella* terhadap antibiotika. Selain terapi antibiotika, penggunaan *glucose-electrolyte oral rehydration therapy* dapat mencegah kematian akibat dehidrasi (Harrison, 2011; Todar, 2011; Keusch *et al.*, 2006).

2.5 Vaksin *Shigella*

Banyak studi yang telah dilakukan di dunia untuk mengembangkan vaksin untuk mencegah Shigellosis. Studi volunter dan epidemiologi yang telah dilakukan memberi penjelasan bahwa imunitas protektif untuk *Shigella* ditujukan pada antigen somatik O yang bersifat sangat spesifik. Tiga pendekatan untuk vaksin *Shigella* yang dikembangkan adalah *parenteral O-specific polysaccharide conjugate vaccines*, *nasal proteosomes delivering Shigella LPS* dan *peroral live attenuated invasive Shigella deletion mutants*. Pengembangan vaksin selama ini lebih difokuskan kepada *Shigella flexneri 2a*, *Shigella sonnei*, dan *Shigella dysenteriae* tipe 1. Vaksin yang ada sekarang masih memiliki banyak masalah, di antaranya adalah belum ada vaksin yang dapat melingkupi seluruh spektrum *Shigella spp.* Sedangkan vaksin *live attenuated* memiliki masalah pada penggunaannya pada anak di daerah endemik dengan status imun yang rendah (Todar., 2011; Levine *et al.*, 2007; Jennison *et al.*, 2004; Kweon *et al.*, 2008; Petri *et al.*, 2008; Germani, 2011).

Sebagian besar vaksin paten yang rutin digunakan sampai saat ini adalah vaksin dengan basis *whole cell* dari patogen. Vaksin *whole cell* menggunakan sel patogen secara utuh. Vaksin *whole cell* memiliki kelebihan dalam hal efektifitas. Namun, vaksin *whole cell* mempunyai kekurangan berupa kenaikan suhu tubuh

pasien setelah admininstrasi, reaktivasi, dan tidak dapat digunakan pada pasien *immunocompromised* (Cooper, 2004).

Pada tahun 2011 telah ditemukan molekul adhesin dari *Shigella dysenteriae*. Molekul adhesin ini adalah pili 49 kDa. Molekul adhesi berperan pada proses awal pathogenesis Shigellosis, yaitu pada tahap perlekatan dengan sel *host*. Jika perlekatan pada *host* dapat dicegah, maka proses pathogenesis tidak dapat berlanjut. Selanjutnya jika protein adhesi pili ini berhasil dikembangkan menjadi suatu vaksin, maka dapat diperoleh vaksin untuk *Shigella* (Prabowo, 2011).

2.6 Reaksi Silang

Reaksi silang adalah kemampuan suatu antibodi untuk bereaksi dengan lebih dari satu antigen. Suatu reaksi silang dipengaruhi oleh epitope dan paratope. *Epitope* adalah suatu struktur dari sebuah antigen yang berfungsi menjadi tempat ikatan dengan bagian spesifik dari rantai antibodi. Bagian dari suatu rantai antibodi yang menjadi tempat ikatan dengan *epitope* dinamakan dengan *paratope*. Setiap *paratope* mengenali suatu sisi antigen dengan afinitas yang berbeda-beda, tergantung dari spesifisitas ikatan antigen-antibodi. Jika suatu antigen yang memiliki *epitope* sama dengan antigen yang lain, atau *epitope* dari antigen tersebut memiliki kemiripan struktur dengan *epitope* dari antigen lain maka antibodi yang diinduksi oleh salah satu antigen dapat mengalami reaksi silang dengan antigen yang lain. Semakin mirip struktur *epitope*, maka afinitas antibodi-antigen yang terjadi tidak akan berbeda secara signifikan (Mayer, 2010).

Epitope yang sama ataupun mirip dapat diperoleh dari dua antigen dengan kekerabatan yang dekat. Semakin dekat kekerabatan antara dua antigen, epitope

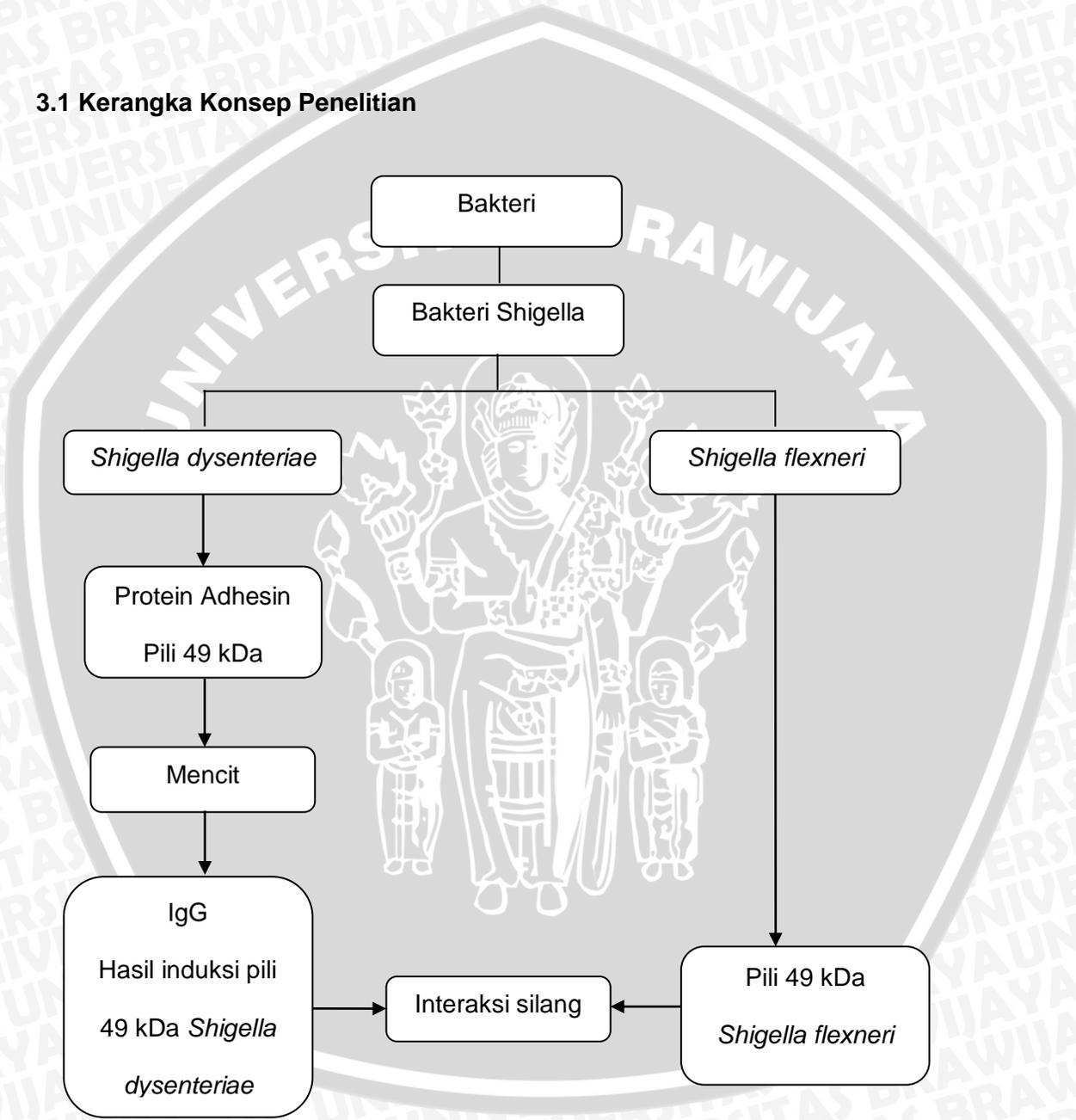
kedua antigen tersebut akan semakin mirip. Sebaliknya, semakin jauh kekerabatan dari kedua antigen tersebut, maka epitope dari kedua antigen tersebut akan semakin berbeda (Frank, 2002).



BAB III

KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan:

Dua spesies dengan kedekatan kekerabatan yang erat memiliki epitope yang sama ataupun memiliki epitope dengan struktur yang mirip. Suatu antibodi yang diinduksi oleh salah satu spesies seharusnya memiliki reaksi silang dengan spesies yang lain. *Shigella dysenteriae* dan *Shigella flexneri* memiliki kekerabatan tingkat genus. Dengan menginduksi mencit menggunakan protein adhesin pili 49 kDa *Shigella dysenteriae*, yang merupakan molekul adhesin dari *Shigella dysenteriae*, akan dihasilkan antibodi. Antibodi yang diperoleh kemudian direaksikan dengan pili 49 kDa *Shigella flexneri* kemudian dianalisis apakah ada reaksi silang diantara keduanya.

3.2 Hipotesis Penelitian

Terdapat reaksi silang antara IgG yang diinduksi oleh pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dengan pili 49 kDa *Shigella flexneri*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional yang dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan metode *Dot Blotting*. Rancangan percobaan yang digunakan adalah *two group, post test only design*. Dalam penelitian ini sebagai perlakuan adalah pemberian *IgG* hasil induksi dengan protein adhesin pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* pada pili 49 kDa *Shigella flexneri* dan pada pili *Shigella dysenteriae*. Merujuk pada hasil pengamatan *check board* penelitian Khoirul Anam (2012) tentang reaksi antara molekul *IgG* terinduksi protein pili 49 kDa dengan Ag pili 49 kDa *Shigella dysenteriae*, pada penelitian ini digunakan titer tetap untuk antibodi *IgG* (1/1600) dan pengenceran Ag pili 49 kDa baik untuk *Shigella dysenteriae* maupun *Shigella flexneri* menggunakan titer awal 1/1000 sampai dengan titer 1/1.953.125.000. Kemudian diamati 1) interaksi protein *IgG* pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dengan Ag pili 49 kDa *Shigella flexneri* 2) tendensi interaksi antara antibodi dan antigen tersebut. Pengamatan interaksi protein antara *IgG* pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dengan Ag pili 49 kDa *Shigella flexneri* dilakukan untuk membuktikan hipotesis pada penelitian ini

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1) antigen pili 49 kDa *Shigella flexneri*, 2) antigen pili 49 kDa *Shigella dysenteriae*, yang diencerkan sebanyak sepuluh kali.

Jumlah pengulangan (p) uji *dot blot* pada penelitian ini mengikuti rumus $p(n-1) \geq 15$ (Solimun, 2001). Karena jumlah sampel antigen pili yang digunakan pada penelitian ini sama dengan jumlah pengenceran -10 pengenceran-, maka jumlah sampel (n) pada penelitian ini besarnya 10 sampel per kelompok antigen ($n=12$). Dengan mengikuti rumus tersebut maka didapatkan:

$$\begin{aligned} p(10-1) &\geq 15 \rightarrow p(10-1) \geq 15 \\ p(9) &\geq 15 \\ p &\geq \frac{15}{9} \\ p &\geq 1,67 \end{aligned}$$

Melihat nilai pengulangan (p) yang didapat dari rumus tersebut bernilai minimal 1,67 maka pada penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dengan waktu penelitian pada bulan Januari-Maret 2012.

4.4 Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *shaker*, alat *pili cutter*, mikropipet, tabung *falcon*, botol kaca ukuran 250 ml, botol kaca ukuran bebas, *nitrocellulose membrane*, spons, SDS-PAGE kit, selofan, *Dot Blotting* kit, kotak plastik kedap udara, bungkus plastik.

Sedangkan bahan yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain medium SSA, Kultur *Shigella flexneri*, Kultur *Shigella dysenteriae*, gel untuk SDS-PAGE, larutan *running buffer*, medium MacConkey, medium TCG, medium BHI, larutan

TBS, ddH₂O, HCL dan NaOH konsentrat, larutan SA-HRP, susu kering tanpa lemak, aquades.

4.5 Definisi Operasional

- *IgG*: *IgG* merupakan singkatan dari *immunoglobulin G*. *IgG* yang digunakan disini merupakan *IgG* yang diambil dari usus mencit berusia 6-8 minggu yang sebelumnya sudah diinduksi dengan protein adhesin pili 49 kD *Shigella dysenteriae* sebanyak 1x per tujuh hari selama 4 minggu untuk memperbanyak penghasilan *IgG*. Menurut penelitian *IgG* hasil induksi antigen pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* terbukti protektif.

(Agustina, 2012; Fitriana, 2012)

- *Shigella dysenteriae*: Merupakan bakteri genus *Shigella* spesies *dysenteriae*, isolat dan kulturnya diambil dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Isolat ini sudah dilakukan pengujian melalui Microbact.

- *Shigella flexneri*: Merupakan bakteri genus *Shigella* spesies *flexneri*, isolat dan kulturnya diambil dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Isolat ini sudah dilakukan pengujian melalui Microbact.

- Ag Pili 49 kDa *Shigella dysenteriae*: merupakan hasil pemrosesan *crude pili Shigella dysenteriae* yang dimurnikan melalui proses SDS-PAGE.

- Ag Pili 49 kDa *Shigella flexneri*: merupakan hasil pemrosesan *crude pili Shigella flexneri* yang dimurnikan melalui proses SDS-PAGE.

- Histogram merupakan program pada *Adobe Photoshop for Windows* yang digunakan untuk menilai kekuatan warna dari tiap dot.

4.6 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

Seluruh prosedur yang dilakukan pada penelitian ini merujuk pada Prabowo (2011) dan Faisal dkk (2010) yang meliputi akan dibahas pada sub-subbab 4.7.1 sampai 4.7.6

4.6.1 Persiapan Bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Shigella flexneri*

Persiapan bakteri dilakukan dengan cara sebagai berikut.

1. Isolat *Shigella flexneri* dan *Shigella dysenteriae* dikultur pada medium SSA pada suhu 37°C selama 24 jam untuk memastikan kemurnian sampel bakteri.
2. Langkah berikutnya adalah pembuatan medium TCG. Medium TCG berguna untuk memperbanyak pertumbuhan bakteri. Medium ini mengandung 0,02% thioproline, 0,3% NaHCO₃, 0,1% mono sodium l-glutamate, 1% baktotrypton, 0,2% yeast extract, 0,5% NaCl, 2% bacto agar dan ethylene glycol tetraatic acid (EGTA). Medium dibuat pada botol berukuran 250 ml dan dibiarkan mengering pada sudut 15°. Persiapan ini dibuat pada 15 botol dan tiap botol diisi dengan medium TCG sebanyak 50 mL.
3. *Shigella flexneri* dan *Shigella dysenteriae* yang dipanen dari kultur SSA secara terpisah kemudian dipindahkan ke cawan petri yang berisi medium MacConkey pada suhu 37 ° C selama 24 jam untuk multiplikasi bakteri.
4. Hasil kultur bakteri dari medium MacConkey kemudian dilarutkan dalam PBS 10ml dengan pH 7,4. Selanjutnya dimasukkan ke dalam botol berisi larutan BHI (Brain Heart Infusion) 1000 ml. Botol tersebut kemudian digoyang-goyang pada *water bath* selama 30 menit pada suhu 37 ° C.
5. Kemudian setelah digoyang, isi medium BHI diambil sebanyak 10 mL dimasukkan ke dalam medium TCG yang telah dibuat sebelumnya. Inkubasi pada medium TCG

dilakukan pada suhu 37⁰ C selama 2 x 24 jam.

4.6.2 Isolasi Protein Pili *Shigella dysenteriae* dan *Shigella flexneri*

Koleksi protein pili *Shigella dysenteriae* dan *Shigella flexneri* mengacu pada metode yang dilakukan oleh Ehara (Ehara *et al.*, 1987) dengan modifikasi (Sumarno, 1991). Isolasi pili yang akan dilakukan berasal dari biakan bakteri yang tumbuh pada setiap botol pada medium TCG yang telah diinkubasi sebelumnya. Isolasi pili dari medium TCG dilakukan melalui langkah sebagai berikut:

1. Hasil koleksi bakteri dikumpulkan dalam satu botol steril yang kemudian ditambahkan tricoleracetic acid (TCA) sampai konsentrasinya 3%. Setelah tercampur rata dengan TCA koleksi bakteri diletakkan pada suhu kamar selama 1 jam dan digoyang secara konstan.

2. Selanjutnya koleksi bakteri yang telah melalui langkah 1 diatas diambil dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan sebesar 6.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4⁰ C. Setelah disentrifugasi akan terbentuk dua fraksi, supernatan dan endapan. Endapan yang terbentuk merupakan whole-cell dari bakteri shigella sedangkan supernatannya adalah produk metabolit dari bakteri tersebut.

3. Endapan hasil sentrifugasi kemudian diencerkan memakai cairan PBS pH 7,4 dengan perbandingan endapan : pengencer = 1 : 10 sehingga terbentuk suspensi baru. Suspensi bakteri kemudian dilakukan pemotongan pili desain Sumarno (2000) rakitan Laboratorium Politeknik UB Malang.

4. Pemotongan pili dilakukan pada suhu 4⁰ C. Pemotongan dilakukan dengan kecepatan 5.000 rpm selama 30 detik. Setelah itu hasil pemotongan dimasukkan

kedalam tabung falcon dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 30 menit.

5. Hasil supernatan sentrifugasi terdapat pili, sedang endapannya diencerkan dengan PBS pH 7,4 dengan perbandingan endapan : PBS = 1 : 1. Setelah diencerkan maka hasil pengenceran endapan dapat disimpan atau dapat dilakukan pemotongan pili selanjutnya jika diperlukan. Sedangkan supernatannya dapat langsung dilakukan persiapan karakterisasi pili menggunakan metode elektroforesis.

Hasil dari koleksi tersebut kemudian dilakukan karakterisasi dengan menggunakan metode SDS-PAGE. Band protein adhesin pili 49 kDa kemudian dipotong dan dilakukan metode elektroelusi selama 90 menit dalam tegangan 120 mV dengan kuat arus yang ter-set secara otomatis. Protein terpilih kemudian dimasukkan ke dalam pita selofan didialisis dengan selama 2 x 24 jam.

4.6.3 Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Persiapan elektroforesis dilakukan dengan empat tahap, yakni tahap pembuatan *running buffer*, tahap persiapan alat, pembuatan gel *sodium dodecyl sulfate – polyacrilamide* (SDS-PA) untuk medium elektroforesis dan tahap pemasukan OMP kedalam gel SDS-PA.

Pembuatan *running buffer* dilakukan dengan mengambil 14,2 g Glisin dan 3,03 g Trisbase. Kedua bahan ini dimasukkan kedalam wadah steril besar dan ditambahkan aquades sebanyak 700mL. Kedua bahan kemudian diaduk dengan mesin *sitrer* hingga bahan larut semua, dan dilakukan penyesuaian pH larutan sehingga dicapai nilai pH 8,8. Setelah pH mencapai nilai 8,8 larutan ditambahkan

aquades steril hingga volumenya mencapai 1000mL. Kemudian, tambahkan SDS seberat 1g dan aduk kembali larutan dengan mesin *stirrer*.

Persiapan alat dilakukan dengan menyajikan mesin elektroforesa, susunan wadah pencetak *gel* (kaca bening dua lembar, penjepit kaca, dan busa khusus sebagai alas dua kaca yang sudah dijepit), sisir pencetak sumuran *gel*, serta wadah untuk tempat menuang *running buffer*. Kemudian, wadah pencetak jel dipastikan tidak bocor dengan menuang aquades, yang kemudian dibuang. Wadah pencetak *gel* siap untuk dituang *gel* SDS-PA.

Gel SDS-PA terdiri dari dua bagian, *main gel* dan *stacking gel*. Kedua bagian ini memiliki unsur bahan racikan yang sama, akan tetapi jumlahnya bahannya berbeda untuk masing-masing *gel*. *Gel* SDS-PA yang digunakan pada penelitian ini memiliki kepadatan sebesar 12,5%, dan pada tabel 4.1 terdapat komposisi dari *main gel* dan *stacking gel* tersebut (kepadatan 12,5%),

Tabel 4.1. Komposisi Bahan – bahan pembuatan *Main gel* dan *Stacking gel* untuk SDS-PAGE.

No	Nama Bahan	Jumlah bahan dalam mikroliter	
		<i>Main gel</i>	<i>Stacking gel</i>
1	Acrylamide 30%	2063	257,5
2	Tris-Cl 1,5 M pH 8,8	1250	312,5
3	ddH ₂ O	1635	602,5
4	SDS 10%	50	12,5

5	APS 10%	50	3,75
6	Temed	10	2,5

Gel yang pertama kali dibuat adalah *main gel*. *Main gel* dibuat dengan mencampur bahan *main gel* secara berurutan dari nomor satu hingga nomor enam. Larutan *main gel* yang sudah siap dimasukkan ke dalam wadah pencetak *gel* dan ditunggu hingga membeku. Begitu pula untuk *stacking gel*, juga dilakukan pencampuran bahan *stacking gel* secara berurutan dari nomor satu hingga nomor enam. Setelah larutan *stacking gel* siap, larutan dituang di atas *main gel* yang sudah membeku di dalam wadah pencetak *gel* SDS-PA. Larutan *stacking gel* yang masih cair kemudian diletakkan di atasnya sisir pencetak sumuran. Sisir pencetak *gel* dibiarkan pada posisinya hingga *stacking gel* membeku. Kemudian, setelah *stacking gel* membeku, sisir pencetak *gel* diangkat dan akan terbentuk sumuran sebanyak delapan sumuran untuk mengisi protein pili yang akan dielektroforesasi.

Persiapan protein pili untuk elektroforesasi kemudian dilakukan dengan mencampur protein pili dengan substrat RSB dengan perbandingan 1 : 1 dan kemudian dipanaskan selama 5 menit dengan suhu 100° C. Hasil pemanasan protein pili + RSB kemudian dimasukkan ke dalam sumuran masing-masing sebanyak 50 mikro liter untuk sumuran 1 – 7, sedang sumuran ke-delapan dimasukkan marker petunjuk berat molekul. Setelah itu, wadah pencetak beserta sumuran yang sudah terisi protein pili kemudian dimasukkan ke dalam wadah elektroforesasi. *Running buffer* yang sudah disiapkan kemudian dituang ke dalam wadah elektroforesasi hingga memenuhi wadah dan menutupi sumuran. Mesin elektroforesasi dinyalakan dengan voltase 240 V sampai protein pili mencapai dasar

gel SDS-PA, pengaturan kuat arus dilakukan secara otomatis saat meng-input voltase. Protein pili dengan berat molekul 49 kDa kemudian dipisahkan dari protein yang lain dengan cara dipotong untuk dilakukan elektroelusi (proses melepaskan protein dari *gel* elektroforesis) dan dialisa (proses melepaskan zat pewarna RSB).

4.6.4 Persiapan Elektroelusi dan Dialisa

Persiapan elektroelusi pertama kali dilakukan dengan memotong protein hasil elektroforesis yang diinginkan. Protein yang terpotong diletakkan dalam cawan petri berisi *running buffer* agar *gel* tidak mengering. Kemudian persiapan dilanjutkan dengan melakukan pemotongan pita selofan sepanjang 7 cm sebanyak 2 potong. Pita yang terpotong kemudian dididihkan secara bertahap dalam:

- a. 5% Na₂CO₃ selama 15 menit (5g Na₂CO₃ dalam 100mL ddH₂O)
- b. 50 µL EDTA pH 8 selama 15 menit (1,86g EDTA dalam 100mL H₂O)
- c. Aquadest steril selama 15 menit. Setelah langkah c ini, selofan siap digunakan.

Selofan yang sudah siap digunakan pertama dibilas dengan *running buffer* dan kemudian di jepit salah satu pangkalnya. Pangkal yang tidak dijepit dibuka untuk memasukkan *running buffer* dan *gel* protein yang sudah dipotong. Setelah itu, selofan di jepit lagi untuk menutup ujung yang terbuka. Kemudian selofan dimasukkan dalam wadah elektroelusi berisi *running buffer* dan mesin dinyalakan dalam waktu 60 menit dengan voltase 120V. Setelah 60 menit selesai, selofan diangkat dan siap untuk didialisa.

Dialisa dilakukan dengan memasukkan selofan terelektroelusi ke dalam beaker glass yang berisi PBS steril yang kemudian di aduk dengan stirrer dalam

suhu 4⁰ C selama 24 jam. Setiap 8 jam sekali, PBS yang ada diganti dengan PBS dingin yang baru. Setelah 24 jam selofan dibuka dan protein yang berada di dalamnya dikoleksi dan ditempatkan dalam tabung *ependorf* yang sudah ditimbang berat kosongnya. Protein ditambahkan dengan etanol absolut dingin dengan perbandingan volume sebesar 1 : 1 dan disimpan pada 4⁰ C selama 24 jam. Setelah 24 jam, tabung *ependorf* disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 menit dalam suhu 4⁰ C. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang, dan endapat dikering-anginkan selama semalam. Setelah kering berat *ependorf* ditimbang, hasil penambahan berat *ependorf* menunjukkan berat pili dalam *ependorf*. Protein kemudian ditambahkan buffer tris-Cl sebanyak 100µL untuk disimpan dalam suhu -40°C.

4.6.5 Induksi dan Koleksi IgG pili 49 kDa *Shigella dysenteriae*

Induksi dan koleksi sIgG dilakukan merujuk pada penelitian yang dibuat oleh Anam (2012) serta Agustina (2012). Induksi IgG dilakukan dengan hasil konjugasi antara Ag pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dengan *adjuvant ISCOM*. Kemudian hasil konjugasi Ag pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* ini di- larutkan dalam PBS dengan perbandingan 100 ug : 100 uL. Penyuntikan dilakukan sebanyak dengan regimen satu kali penyuntikan per satu minggu. Pada minggu ke-lima mencit dimatikan dan dilakukan pengambilan serumnya. Pengambilan serum IgG dilakukan melalui ventrikel kanan jantung mencit. Darah tersebut kemudian dikumpulkan ke dalam tabung steril dan dimasukkan dalam posisi miring selama 30 menit kedalam inkubator bersuhu 37⁰ C. Setelah itu tabung dimasukkan kedalam lemari pendingin bersuhu 4⁰ C selama 10 menit. Hasil pendinginan dilakukan sentrifugasi pada

kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan hasil sentrifugasi diambil dan dimasukkan dalam tabung steril, untuk penyimpanan dilakukan dalam suhu -20°C .

4.6.6 Dot Blotting

Pemeriksaan *dot blotting* merujuk pada metode yang dikerjakan pada *Shigella dysenteriae* Anam, (Anam, 2012) dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Persiapkan larutan TBS yang akan digunakan dalam proses *Dot Blotting* ini dengan mencampur 0,303 g Tris Base dan 0,584 g NaCl ke dalam 35mL Aquades dan adjust pH campuran yang terbentuk agar bernilai 7,4.
2. Rendam kertas Nitrocellulose (NC) di dalam Aquades selama 30 menit. Kemudian rangkai kertas NC pada *Dot Blotting* kit.
3. Masukkan protein Ag pili *Shigella flexneri* dan Ag pili *Shigella dysenteriae* ke dalam sumuran *Dot Blotting* kit dengan volume 50 μL dan degas *Dot Blotting* kit agar protein pili benar-benar terserap ke dalam kertas NC.
4. Lakukan *blocking* pada kertas NC dengan cara menambahkan TBS Skim Milk dengan volume 50 μL pada sumuran *Dot Blotting* kit dan dibiarkan semalaman pada suhu 4°C .
5. Kemudian buang bersihkan larutan yang ada pada sumuran dengan cara membalik sumuran hingga larutan yang berada di dalamnya benar-benar bersih. Lakukan pembilasan sumuran dengan mengisi sumur dengan TBS Tween 0,05 % dan digoyang pelan selama tiga menit. Langkah ini diulang sebanyak tiga kali.
6. Lakukan inkubasi antibodi primer pada sumuran dengan memasukkan Ab protein Pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* selama 60 menit pada suhu ruang. Setelah 60 menit bilas dengan TBS Tween 0,05 % dengan cara seperti langkah ke-lima

- pada langkah ini pembilasan dilakukan sebanyak dua kali, bukan tiga kali.
7. Lakukan inkubasi antibodi sekunder pada sumuran selama 60 menit pada suhu ruang. Kemudian bilas dengan TBS Tween 0,05 % dengan cara seperti langkah ke-lima, pada langkah ini pembilasan juga dilakukan sebanyak dua kali, bukan tiga kali .
 8. Lakukan inkubasi SA-HRP pengenceran 1:1000 selama 40-60 menit pada suhu ruang dan bilas dengan TBS Tween 0,05 % seperti cara pada langkah ke-lima, pada langkah ini pembilasan juga dilakukan sebanyak dua kali, bukan tiga kali.
 9. Kemudian tambahkan substrat TMB Western Blue ke dalam sumuran, penambahan ini dilakukan dalam ruang gelap, dan biarkan sekitar 20 menit. Selama proses inkubasi dengan TMB Western Blue lama kelamaan akan terlihat bentukan *dot* pada kertas NC. Setelah nampak jelas (sekitar 20 menit) proses ini dihentikan dengan menambahkan aquades ke dalam sumuran.
 10. Hasil *Dot blotting* kemudian dapat diamati dan dianalisa.

4.7 Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan oleh peneliti menggunakan software *Adobe Photoshop* untuk kuantisasi data hasil *Dot Blotting*.

4.8 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan mengamati perbandingan reaksi antara antibodi terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* terhadap pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dan pili 49 kDa *Shigella flexneri*.



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

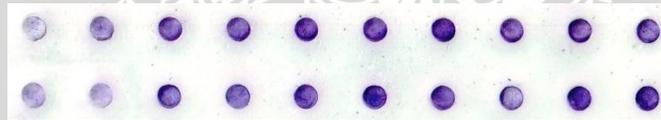
5.1 Skema Alur Penelitian



5.2 Hasil Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian observasional yang dilakukan untuk membandingkan interaksi IgG yang diinduksi oleh pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* terhadap pili 49 kDa *Shigella flexneri* dan pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dengan metode *Dot blotting*. Pada penelitian ini digunakan antigen dari *Shigella flexneri* dan

Shigella dysenteriae dengan pengenceran 1/1000, 1/5000, 1/25.000, 1/125.000, 1/625.000, 1/3.125.000, 1/15.625.000, 1/78.125.000, 1/390.625.000, dan 1/1.953.125.000 dan IgG dengan pengenceran 1/1600. Hasil *Dot blotting* berupa dot-dot warna dengan berbagai gradasi pada *nitrocellulose membrane*. Kekuatan warna dari tiap dot dapat menggambarkan afinitas yang terjadi antara antigen dan antibodi yang diuji. Semakin tinggi afinitas, semakin gelap hasil dot yang didapatkan. Kekuatan warna dari tiap dot kemudian dikuantisasi dengan menggunakan fasilitas histogram pada program *Adobe Photoshop*. Hasil penelitian ini adalah nilai histogram tiap dot yang berkisar antara nilai 0-255 dimana 0 adalah warna putih mutlak dan 255 adalah warna hitam mutlak..



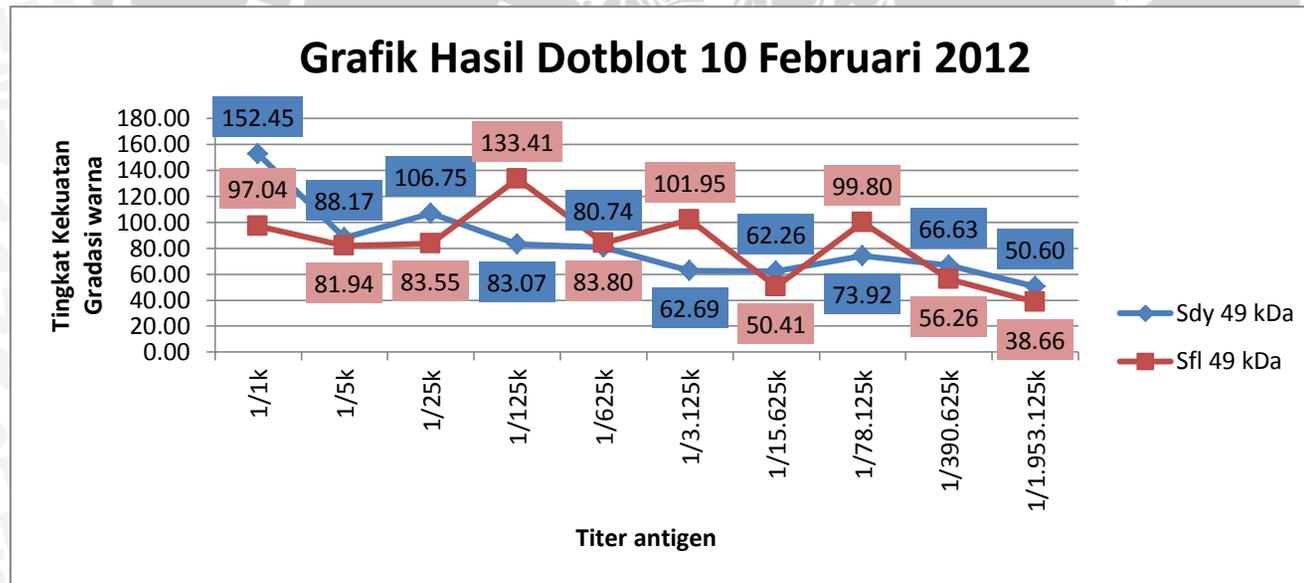
Gambar 5.1

Hasil *Dot Blot* pada *nitrocellulose membrane*

Tabel 5.2

Rerata nilai histogram dari hasil Dot Blot

	1/1000	1/5000	1/25000	1/125000	1/625000	1/3.125.000	1/15.625.000	1/78.125.000	1/390.625.000	1/1.953.125.000
Sdy 49kDa	152.45	88.17	106.75	83.07	80.74	62.69	62.26	73.92	66.63	50.60
Sfl 49kDa	97.04	81.94	83.55	133.41	83.80	101.95	50.41	99.80	56.26	38.66



Gambar 5.2

Grafik mean dari hasil histogram *Dot Blot*

5.3 Analisis Data

Dari grafik mean nilai histogram dapat kita amati bahwa semakin tinggi nilai pengenceran antigen, maka nilai histogram untuk tiap antigen akan semakin turun. Kesimpulan sementara yang dapat kita ambil adalah nilai histogram kedua antigen berbanding terbalik dengan nilai pengenceran. Untuk analisis lebih lanjut, maka dilakukan uji statistik menggunakan uji parametrik *Independent t-Test* dan uji korelasi *Pearson* menggunakan *SPSS 16 for Windows*.

5.3.1 Uji Normalitas Data

Uji normalitas data merupakan suatu syarat sebelum melakukan uji statistika parametrik. Dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* didapatkan bahwa data untuk semua kelompok mempunyai nilai p diatas 0,05 (lihat lampiran 2). Hal ini menunjukkan bahwa semua kelompok memiliki sebaran normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui sebaran varians data.

5.3.2 Uji Homogenitas Data

Pada uji homogenitas menggunakan *Levene's Test*, didapatkan p value sebesar 0,928 (lihat lampiran 4). Nilai ini menunjukkan bahwa data tersebut memiliki varians data yang sama. Selanjutnya dilakukan uji *Independent t-Test* dan uji korelasi *Pearson*.

5.3.3 Uji Korelasi *Pearson*

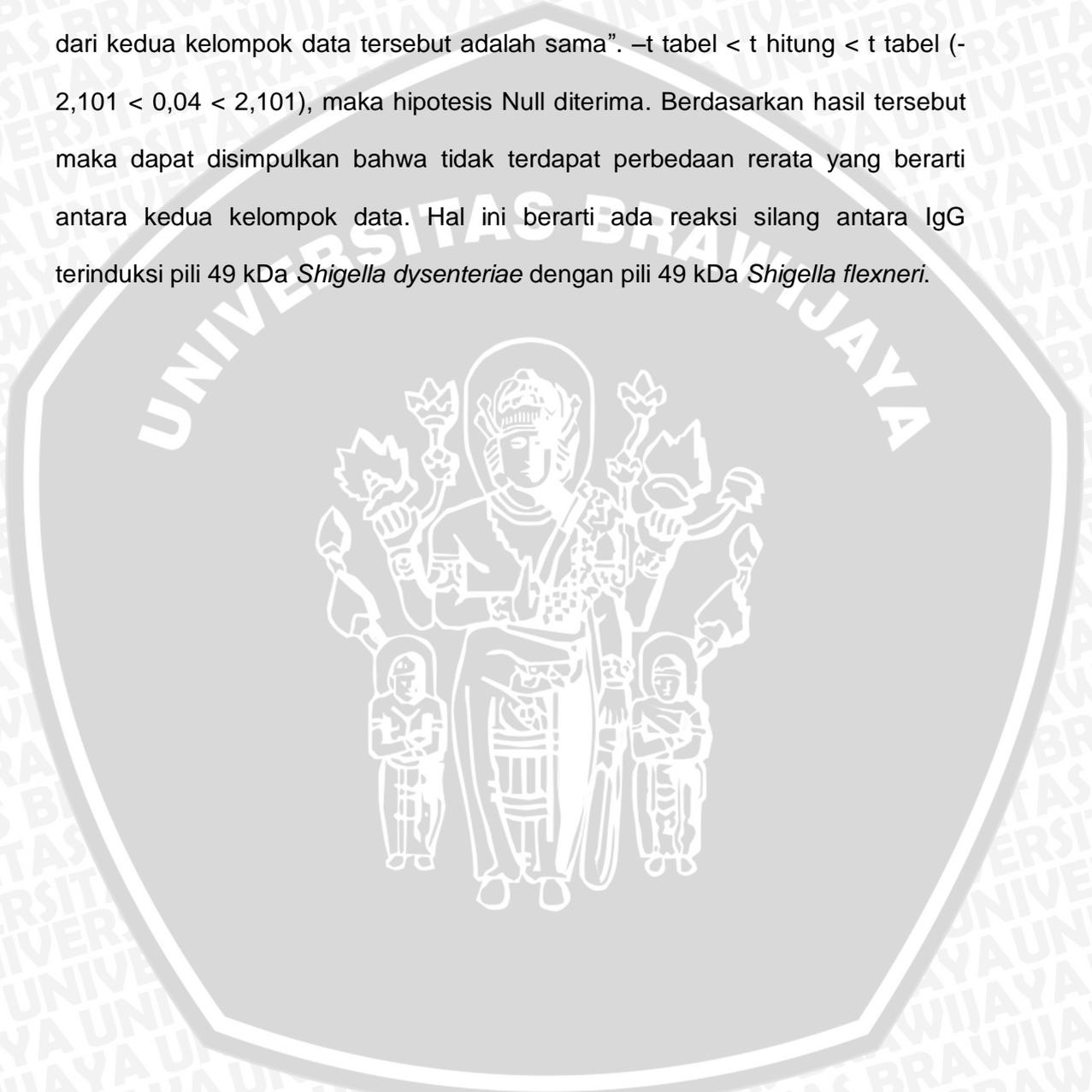
Dengan metode korelasi *Pearson* dapat diketahui korelasi antara pengenceran antigen dan nilai histogram dari interaksi IgG terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* terhadap pili 49 kDa *Shigella dysenterie* dan pili 49 kDa *Shigella flexneri* (lihat lampiran 3). Hasil koefisien korelasi *Pearson* adalah sebesar -0,825 untuk pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dan -0,557 untuk *Shigella flexneri* dengan p value 0,00 untuk *Shigella dysenteriae* dan p value sebesar

0,01 untuk *Shigella flexneri*. Makna dari hasil tersebut adalah nilai histogram interaksi IgG terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* terhadap pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dan pili 49 kDa *Shigella flexneri* berbanding terbalik dengan pengenceran antigen, atau semakin tinggi nilai pengenceran antigen, maka. nilai histogram interaksi IgG terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* terhadap pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dan pili 49 kDa *Shigella flexneri* akan cenderung menurun. Korelasi dikatakan semakin kuat jika nilai korelasi *Pearson* semakin mendekati angka 1 atau -1 dan dikatakan lemah jika semakin mendekati angka 0. Dengan demikian, maka dapat diketahui bahwa nilai korelasi *Pearson* untuk data *Shigella dysenteriae* menunjukkan korelasi yang kuat. Sedangkan nilai korelasi *Pearson* untuk *Shigella flexneri* menunjukkan korelasi yang cukup kuat. Makna dari hasil kekuatan korelasi ini adalah bahwa afinitas IgG terinduksi protein adhesin pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* terhadap pili 49 kDa *Shigella flexneri* tidak sekuat afinitas IgG terinduksi protein adhesin pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* terhadap pili 49 kDa *Shigella dysenteriae*. Hasil ini memiliki nilai kepercayaan karena nilai *p value* masing-masing data besarnya kurang dari 0,01 dimana tingkat kepercayaan minimal untuk uji korelasi *Pearson* adalah sebesar 0,01.

5.3.4 Uji *Independent t-Test*

Dengan menggunakan uji *Independent t-Test* dapat diketahui perbandingan interaksi IgG hasil induksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* terhadap pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dan pili 49 kDa *Shigella flexneri* (lihat lampiran 4). Hasil *Independent t-Test* pada penelitian ini adalah sebesar 0,004. Dengan melihat t tabel pada tabel statistic dengan signifikansi $0,05 : 2 = 0,025$ (uji 2 sisi) dengan derajat kebebasan (df) sebesar 18, diperoleh t tabel adalah

sebesar 2,101. Jika $-t \text{ tabel} < t \text{ hitung} < t \text{ tabel}$, maka hipotesis Null diterima. Dan jika $t \text{ hitung} > t \text{ tabel}$, atau $-t \text{ hitung} < -t \text{ tabel}$ maka hipotesis Null ditolak Hipotesis Null yang diajukan pada uji *Independent T-test* ini adalah “Rerata nilai histogram dari kedua kelompok data tersebut adalah sama”. $-t \text{ tabel} < t \text{ hitung} < t \text{ tabel}$ ($-2,101 < 0,04 < 2,101$), maka hipotesis Null diterima. Berdasarkan hasil tersebut maka dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan rerata yang berarti antara kedua kelompok data. Hal ini berarti ada reaksi silang antara IgG terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dengan pili 49 kDa *Shigella flexneri*.



BAB VI

PEMBAHASAN

Untuk membandingkan interaksi IgG hasil induksi pili 49 kDa *Shigella flexneri* terhadap pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dan pili 49 kDa *Shigella flexneri* pada penelitian ini digunakan metode *Dot Blotting*. Kekuatan warna dari tiap dot kemudian dikuantisasi menggunakan fasilitas histogram pada program *Adobe Photosop*. Pada gambar 5.1 dapat diamati secara kualitatif bahwa pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* maupun pili 49 kDa *Shigella flexneri* direspons oleh IgG terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae*. Analisa lebih lanjut untuk membandingkan interaksi IgG terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* terhadap pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dan pili 49 kDa *Shigella flexneri*, maka dilakukan uji parametrik *Independent t-Test* dan uji korelasi *Pearson* pada data nilai histogram tersebut.

Berdasarkan uji korelasi *Pearson*, kedua data menunjukkan tren yang sama, yaitu nilai histogramnya berbanding terbalik terhadap pengenceran antigen. Kekuatan korelasi *Pearson* untuk pili 49 kDa *Shigella flexneri* lebih rendah daripada kekuatan korelasi *Pearson* untuk pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* namun masih menunjukkan korelasi yang kuat. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan terdapat kemiripan struktur epitope atau terdapat sejumlah epitope sama yang cukup berarti antara pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dan pili 49 kDa *Shigella flexneri*. Kemiripan epitope yang cukup berarti ini berdampak pada pengenalan struktur epitope oleh paratope pada IgG terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dan mengakibatkan ikatan yang cukup kuat. Namun, ikatan

tersebut tidak lebih kuat dari ikatan antara IgG terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* karena timbulnya reaksi silang tersebut hanya bersifat parsial.

Hasil uji parametrik *Independent t-test* menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara rerata interaksi IgG terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dan pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dengan rerata interaksi IgG terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dan dan pili 49 kDa *Shigella flexneri*. Artinya, tidak terdapat perbedaan yang signifikan mengenai respons imun oleh IgG terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* terhadap pili 49 kDa *Shigella flexneri* maupun pili 49 kDa *Shigella flexneri*. Hal ini dapat disebabkan oleh kemiripan karakteristik antigen antara pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dan pili 49 kDa *Shigella flexneri* karena *Shigella dysenteriae* dan *Shigella flexneri* memiliki kekerabatan tingkat genus.

Dengan hasil di atas, karena terdapat kesamaan pada respons imun maupun tren pada interaksi IgG terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* terhadap pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* maupun pili 49 kDa *Shigella flexneri*, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat reaksi silang antara IgG terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dengan pili 49 kDa *Shigella flexneri*. Dengan demikian, jika akan dibuat vaksin dengan basis protein adhesin pili 49 kDa *Shigella dysenteriae*, maka IgG yang dibentuk setelah admininstrasi vaksin tersebut secara teori dapat menghasilkan protektivitas terhadap pili 49 kDa *Shigella flexneri*.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat reaksi silang parsial antara IgG terinduksi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dengan pili 49 kDa *Shigella flexneri*.

7.2 Saran

7.2.1 Perlu dilakukan lebih lanjut tentang reaksi silang yang ditemukan pada penelitian ini mengenai jenis reaksi, kekuatan interaksi, dan efek dari interaksi ini pada pathogenesis Shigellosis.

7.2.2 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang reaksi silang antibodi terinduksi protein adhesi pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* terhadap spesies lain dengan kekerabatan dekat terhadap *Shigella dysenteriae* meliputi jenis reaksi, kekuatan interaksi dan efek interaksi tersebut pada pathogenesis Shigellosis.

7.2.3 Penelitian ini perlu diulang dengan menggunakan metode lain yang lebih baik jika dibandingkan yang digunakan oleh peneliti, misalnya dengan menggunakan metode ELISA.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina W. 2012. *Antibodi Protein Hemagglutinin Sub-unit Pili BM 49,8 kDa Shigella dysenteriae Dapat Menghambat Adhesi Shigella dysenteriae pada Enterosit Mencit*. Thesis. Program Pasca Sarjana Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Anam K, 2012. *Identifikasi Protein Hemagglutinin Sub-unit Pili 49,8 kDa dan Anti Hemagglutinin 7,9 kDa serta Uji Respon Imun Reaksi Silang Shigella spp*. Thesis. Program Pasca Sarjana Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Bin Liu *et al.* 2008. *Structure and Genetics of Shigella O antigens*. *FEMS Microbiology Review*.
- Brooks, Geo F *et al.* 2005. *Jawetz Medical Microbiology*. 27th Ed. The McGraw-Hill Companies. Inc., USA.
- Champoux *et al.* 2004. *Sherris Medical Microbiology*. 4th Ed. The McGraw-Hill Companies. Inc., USA.
- Chhour *et al.* 2011. *Etiology of Diarrhea in Young Children and Patterns of Antibiotic Resistance in Cambodia*. *The Pediatric Infectious Journal*.
- Cooper, Chester R. 2004. *Chapter 33: Medical Immunology*. <http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&ved=0CEQQFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.as.yzu.edu%2F~crgcooper%2F3702Ch33%28S05%29.pdf&ei=qOAKUczdN8n9rAft7YDlCg&usq=AFQjCNFvvhvhnFrc5EJbABwK-VgOIep1p3Q&bvm=bv.42661473,d.bmk>. (Online). Diakses pada tanggal 20 Februari 2013 pukul 21.57.
- Duwi, Priyatno. 2012. *Cara Kilat Belajar Analisis Data dengan SPSS 20*. ANDI., Yogyakarta.
- Ehara, M., M. Ishibashi, Y. Ichinose, M. Iwanaga, S. Shimotori, T. Naito. 1987. *Purification and partial characterization of fimbriae of Vibrio cholera O1*. *Vaccine* 5(4): 283-8.
- Faisal, Sumarno, Handono K. 2010. *Pengaruh Susu Kuda Sumbawa Terfermentasi pada Protein Adhesi 37,8 kDa Vibrio cholerae O1 dikonjugasi CTB terhadap Respon s-IgA dan Sekresi Cairan Usus Mencit*. Tidak diterbitkan, Program Pasca Sarjana Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Fischer Walker CL, Sack D, Black RE. 2010. *Etiology of Diarrhea in Older Children, Adolescents and Adults: A Systematic Review*. *PLoS Negl Trop Dis* 4(8): e768. doi:10.1371/journal.pntd.0000768.

Frank, SA. 2002. *Immunology and Evolution of Infectious Disease*. (Online). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2396/>. Diakses pada tanggal 21 Februari 2013 jam 02.00.

Harrison. 2011. *Principles of Internal Medicine*. 18th Ed. The McGraw-Hill Companies. Inc., USA.

Herwana, E. et al. 2010. *Shigella-associated diarrhea in children in South Jakarta, Indonesia*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. USA. 41(2):418-25.

Iwalokun et al. 2001. *Epidemiology of Shigellosis in Lagos, Nigeria: Trends in Antimicrobial Resistance*. Journal of Health, Population and Nutrition.

Jennison et al. *Shigella flexneri Infection: Pathogenesis and Vaccine Development*. FEMS Microbiol. Rev 2004;28:43-58.

Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health. 2011. *Shigella infection*. Epidemiology of infectious disease. <http://ocw.jhsph.edu>.

Kementerian Kesehatan RI. 2011. *Situasi Diare di Indonesia*. Buletin Jendela dan Informasi Kesehatan. Kemeterian Kesehatan RI, Jakarta. hal. 1.

Keusch, G.T., et al. 2006. *Diarrheal diseases In Disease control priorities in developing countries*. D.T. Jamison, et al., editors. Oxford University Press. New York, New York, USA. 371–388.

Keusch, Gerald T. 2009. *Bacterial Infections of Humans*. Springer US. USA. p. 699-724.

Kweon, MN. 2008. *Shigellosis: the current status of vaccine development*. Curr Opin Infect Dis. 21: 313-8.

Levine et al. 2007. *Clinical trials of Shigella vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road*. Nat Rev Microbiol;5:540-53

Lukyanenko et al. 2011. *Enterohemorrhagic Escherichia coli infection stimulates Shiga toxin 1 macropinocytosis and transcytosis across intestinal epithelial cells*. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 301, C1140–C1149. doi: 10.1152/ajpcell.00036.

Mayer, Gene. 2010. *Immunoglobulins-Antigen-Antibody Reaction and Selected Test*. (Online). <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/ab-ag-rx.htm>. Diakses pada tanggal 21 Februari 2013 pada jam 03.15.

Nguyen et al. 2005. *Antibiotic Resistance in Diarrheagenic Escherichia coli and Shigella Strains Isolated from Children in Hanoi, Vietnam*. American Society for Microbiology.

Departemen Kesehatan RI. 2011. *Pedoman Tatalaksana Diare*. Departemen Kesehatan RI. Jakarta.

Petri WA, Miller M, Binder HJ, Levine MM, Dillingham R, Guerrant RL. 2008 ***Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development.*** *J Clin Invest.* chapter 118:1277–1290

Prabowo, Avanita. 2011. *Partial Characterization of Adhesion Pili on Shigella dysenteriae.* Tugas Akhir. Diterbitkan. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang.

Savarino, S.J., et al. 2003. *Efficacy of an oral inactivated whole-cell enterotoxigenic E. coli/cholera toxin B subunit vaccine in Egyptian infants [abstract].* In The 6th Annual Conference on Vaccine Research. June 22–25. Arlington, Virginia, USA. National Foundation for Infectious Diseases. S11.

Schroeder GN, Hilbi H. 2008. *Molecular patogenesis of Shigella spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion.* *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:134–156.

Science Photo Library. 2011. *TEM of Shigella sp. Rod Shaped Bacterium.* <http://www.sciencephoto.com/media/10827/view>.

Sumarno. 2000. *Karakterisasi Molekuler Protein adhesi Vibrio Cholera 01 dan Protein Reseptornya pada Sel Epitel usus halus Tikus Putih (Wistar).* Studi pathogenesis *Vibrio cholera* 01. Disertasi Program Pasca sarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Sumarno, A. Noorhamdani, I. Samsul, M. Sjoeker, Y. Ichinose. 1991. *Purifikasi Protein Hambatan aglutinasi Vibrio cholera.* *Majalah Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.* hal 11-14.

Taneja et al. 2006. *Changing Epidemiology of Shigellosis and Emergence of Ciprofloxacin-Resistant Shigellae in India.* *American Society for Microbiology.*

Todar, Kenneth. 2009. *Shigella and Shigellosis.* <http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/Shigella.html>.

Todar, Kenneth. 2011. *Shigella and Shigellosis.* <http://www.textbookofbacteriology.net/Shigella.html>.

von Seidlein L, Kim DR, Ali M, Lee H, Wang X, et al. 2006. *A Multicentre Study of Shigella Diarrhoea in Six Asian Countries: Disease Burden, Clinical Manifestations, and Microbiology.* *PLoS Med* 3(9): e353. doi:10.1371/journal.pmed.0030353.

Wallace H. Andrews and Andrew Jacobson. 2001. *Bacteriological Analytical Manual.* FDA. Chapter 6.

Walker, W. Allan. 2008. *Pediatric Gastrointestinal Disease, 5th Ed.,* BC Decker Inc., Ontario. p.253.

World Health Organization. 2009. *Diarrhoeal Disease*. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index6.html.



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yannita Rama Kusuma Aji Wijaya

NIM : 0910710133

Program Studi : Program Studi Pendidikan Dokter

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya aku sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri.

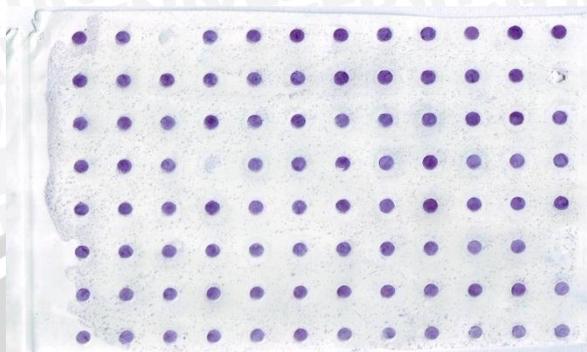
Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 4 Maret 2013

Yang membuat Pernyataan,

Yannita Rama Kusuma Aji Wijaya
NIM. 0910710133

LAMPIRAN



Ab/Ag	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
1/100	9896	11931		12259	10882	8579	9412	10469	10906	11847	7743	8847
1/200	9616	11398	10236	11133	12075	11614	8778	9779	10313	10356	9540	
1/400	11727	11043	13064	9249	12323	9879	12846	11291	11176	9722	9034	11752
1/800	11160	19256	13576		13493	12053	10658	13311	8629	13599	13328	12530
1/1600	10944	10963	12564	10308	13668	12895	10564	12495	8693	11225	11221	9944
1/3200	11140	11711	12838	12124	13719	13448	12172	11757	12196	14572	13254	22982
1/6400	13078	13089	12821	12019	12801	12055	11835	12259	12528	11197	11658	15155
1/2800	13662	14513	14370	13660	14982	13025	14597	15492	13759	15753	15291	15144

Lampiran 1

Hasil uji checkboard

Tests of Normality

Antigen		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Mean	ShiD49kDa	.226	10	.159	.853	10	.062
	ShiF49kDa	.189	10	.200*	.956	10	.736

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Lampiran 2

Hasil uji normalitas

Correlations

		pengenceran	ShiD49kDa
pengenceran	Pearson Correlation	1	-.825**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	30	30
ShiD49kDa	Pearson Correlation	-.825**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	30	30

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations

		pengenceran	ShiF49kDa
pengenceran	Pearson Correlation	1	-.557**
	Sig. (2-tailed)		.001
	N	30	30
ShiF49kDa	Pearson Correlation	-.557**	1
	Sig. (2-tailed)	.001	
	N	30	30

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 3

Hasil uji korelasi *Pearson* pili 49 kDa *Shigella dysenteriae* dan pili 49 kDa *Shigella flexneri*

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Mean	Equal variances assumed	.008	.928	.004	18	.997	.04600	12.81716	-26.88184	26.97384
	Equal variances not assumed			.004	17.976	.997	.04600	12.81716	-26.88439	26.97639

Lampiran 4

Hasil uji homogenitas (Levene's test) dan hasil *Independent t-Test*