

**KLARIFIKASI PROTEIN HEMAGLUTININ PILI SHIGELLA
SONNEI BM 49,8 KDa SEBAGAI MOLEKUL ADHESI
DENGAN METODE UJI HAMBAT ADHESI PADA
ENTEROSIT MENCIT**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



Oleh:
Laela Fitriana
NIM : 0910711011

**JURUSAN KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

Klarifikasi Protein Hemaglutinin Pili *Shigella sonnei*
sebagai Molekul Adhesi dengan Metode Uji Hambat Adhesi
pada Enterosit Mencit

Oleh:

Laela Fitriana

NIM : 0910711011

Telah diuji pada

Hari : Jumat

Tanggal : 9 November 2012

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

dr. Umi Kalsum, M.Kes

NIP: 19550512 198701 2 001

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/Pembimbing II

Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM., SpMK (K)

NIP: 19480706 198002 1 001

dr. Aulia Abdul Hamid, M.Biomed.Sc, SpM

NIP: 19770601 200312 1005

Mengetahui:
Ketua Jurusan Kedokteran

Prof. Dr. dr. Teguh W. Sardjono, DMT&H, MSc, SpPark

NIP: 19520410 198002 1 001



KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberikan petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Klarifikasi Protein Hemaglutini Pili *Shigella sonnei* sebagai Molekul Adhesi dengan Metode Uji Hambat Adhesi pada Enterosit Mencit”.

Ketertarikan penulis akan topik ini didasari oleh fakta bahwa masih banyaknya angka kejadian diare basiler oleh karena infeksi bakteri *Shigella spp.* baik di negara berkembang maupun negara maju, sehingga diperlukan strategi penanganan yang lebih efektif untuk mengatasinya. Salah satu cara penanganan tersebut adalah melakukan tindakan preventif dengan vaksinasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi protein hemaglutinin (protein yang mampu mengagglutinasi eritrosit) pili *Shigella sonnei* yang diduga berperan dalam adhesi bakteri pada enterosit dan diharapkan dapat membantu proses pembuatan vaksin dari *Shigella spp.*

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

1. Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM., SpMK (K) selaku pembimbing pertama yang selalu sabar, arif dan bijaksana serta senantiasa memberikan ilmu dan motivasi selama proses bimbingan.
3. dr. Aulia Abdul Hamid, M.Biomed.Sc, SpM selaku pembimbing kedua yang selalu sabar, senantiasa memberikan motivasi dan masukan selama proses bimbingan.
4. dr. Umi Kalsum, M.Kes selaku ketua tim penguji Tugas Akhir atas segenap masukan demi tersusunnya Tugas Akhir ini dengan baik.
5. Yang tercinta ibukku Tutut Mujiaty dan Bapakku Purwanto serta adikku M. Nawawi dan M. Riski Romadhon atas semua doa, dukungan dan kasih sayangnya.
6. Segenap anggota tim penelitian *Shigella* yang selalu membantu, berbagi

ilmu dan menyemangati selama penelitian dan penyusunan Tugas Akhir ini.

7. Teman-teman seperjuanganku, saudaraku di GH, Noker, Kepompong, 3Bee serta seluruh kolega Pendidikan Dokter angkatan 2009 atas semua keceriaan dan kehangatan kasih sayang yang selalu menguatkan saya.
8. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB yang senantiasa memberikan pelayanan dengan baik.
9. Para analis di laboratorium biomedik dan mikrobiologi yang telah membantu saya dalam menyelesaikan penelitian ini.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharap saran dan kritik yang membangun agar Tugas Akhir ini menjadi lebih baik dan bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Malang, 10 November 2012

Penulis



ABSTRAK

Fitiana, Laela. 2012. **Klarifikasi Protein Hemaglutinin Pili *Shigella sonnei* sebagai Molekul Adhesi dengan Metode Uji Hambat Adhesi pada Enterosit Mencit.** Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof.Dr.dr. Sumarno, DMM., SpMK (K) (2) dr. Aulia Abdul Hamid, M.Biomed.Sc, SpM

Diare merupakan masalah yang serius baik di negara berkembang maupun negara maju. *Shigella sonnei* merupakan penyebab tersering diare basiler di negara maju, seperti Amerika, dibandingkan dengan jenis *Shigella* lain yang memiliki angka kejadian infeksi lebih tinggi pada negara berkembang. Vaksinasi terhadap bakteri *Shigella spp.* diperlukan untuk mengurangi angka kejadian diare basiler termasuk yang disebabkan oleh *Shigella sonnei*. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi protein hemaglutinin (protein yang mampu mengaglutinasi eritrosit) pili *Shigella sonnei* yang diduga berperan dalam adhesi bakteri pada enterosit dan membuktikannya dengan melakukan uji hambat adhesi bakteri pada enterosit mencit. Penelitian metode uji hambat adhesi dengan melihat *dose respons* protein yang diberikan terhadap indeks adhesi bakteri *Shigella sonnei* pada enterosit mencit. Dosis protein yang diberikan berkisar dari pengenceran protein 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16.000, dan 0 (kontrol) yang ditentukan berdasarkan hasil *chequeboard* yang menunjukkan nilai respon titer antibodi terendah terhadap titer antigen tertinggi berkisar pada pengenceran yang digunakan. Semakin besar perbandingan pengenceran, maka konsentrasi protein akan semakin menurun. Hasil analisa statistik data penelitian menggunakan metode Kruskal-Wallis didapatkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada perlakuan dosis terhadap indeks adhesi ($p<0,000$). Protein hemaglutinin pili yang digunakan dan berperan dalam adhesi ini adalah protein sub-unit pili dengan berat molekul 49,8 kDa, yang diketahui melalui pengujian hemaglutinasi yang dilakukan sebelumnya. Selain itu terdapat hubungan yang erat dan pengaruh yang bermakna dari perlakuan dosis protein terhadap nilai indeks adhesi yang ditunjukkan dengan koefisien korelasi Pearson(r) sebesar -0,871, nilai $p = 0, 000$; R square 0,75; nilai $p = 0, 000$. Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa protein hemaglutinin sub-unit pili BM 49,8 kDa *S. sonnei* adalah molekul adhesin yang ditunjukkan dengan kemampuannya menghambat adhesi bakteri *S. sonnei* dan terbukti dapat menghambat adhesi bakteri melalui uji hambat adhesi.

Kata kunci: *Shigella sonnei*, protein hemaglutinin, pili, indeks adhesi



ABSTRACT

Fitiana, Laela. 2012. **The Clarification of *Shigella sonnei* Pili Hemagglutinin Protein as Adhesion Molecule with the Adhesion Inhibition Test Method on Mice Enterocyte.** Thesis, Study Program of Medicine Education, Medicine Faculty, Brawijaya University. Advisors: (1) Prof.Dr.dr. Sumarno, DMM., SpMK (K) (2) dr. Aulia Abdul Hamid, M.Biomed.Sc, SpM

Diarrhea is a serious problem both in developing countries and developed countries. *Shigella sonnei* is considered as a common cause of bacillary diarrhea in the developed countries, such as United States of America, compared to other types of *Shigella* that shows higher rate of infectious case in developing countries. Vaccination against *Shigella spp* bacterium is required to reduce the case rate of bacillary diarrhea caused by *Shigella sonnei*. The study aims to explore hemagglutinin protein (protein that has capacity to agglutinate erythrocyte) *Shigella sonnei* pili that is expected to have role in bacterial adhesion on enterocyte and prove the expectation by carrying out bacterial adhesion inhibition test on mice enterocyte. The study with adhesion inhibition method is carried out through the examination of the given response dose of protein on the index of bacterial adhesion of *Shigella sonnei* on mice enterocyte. The given protein dose ranges based on protein dilution from 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16.000 to 0 (control) determined based on *chequeboard* result that shows the lowest response value of antibody titer toward the highest antigen titter ranging based on the applied dilution. The higher the dilution ratio is, the lower the protein concentration is. Using Kruskal-Wallis method, the result of statistical data analysis gained in the study shows significant difference in dose treatment toward adhesion index ($p < 0,000$). The used pili hemagglutinin protein that plays role in the adhesion is sub-unit pili protein with molecular weight of 49.8 kDa that can be determined after hemagglutinin test that was carried out before. Furthermore, strong correlation and significant effect are found in the treatment of protein dose toward the adhesion index value that can be seen from the Pearson (r) correlation coefficient of -0.871, p value of 0.000; R square of 0.75; p value of 0.000. Based on the study findings it can be concluded that *S. sonnei* sub-unit pili hemagglutinin protein with molecular weight of 49.8 kDa is adhesion molecule and evidence shows that it can inhibit bacteria adhesion through adhesion inhibition test.

Keywords: *Shigella sonnei*, hemagglutinin protein, pili, adhesion index



DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	v
Abstract	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Tabel	ix
Daftar Gambar	x
Daftar Lampiran	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Shigella	5
2.2 Epitel Saluran Pencernaan	8
2.3 Patogenesis <i>Shigellosis</i>	9
2.4 Manifestasi Klinis	11
2.5 Diagnosa	11
2.6 Pengobatan	12
2.7 Pencegahan	13
2.8 Vaksin <i>Shigella</i>	14



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep	16
3.2 Hipotesis Penelitian	17

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian	18
4.2 Sampel Penelitian	18
4.3 Variabel Penelitian	18
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	18
4.5 Alat dan Bahan Penelitian	19
4.6 Definisi Operasional	19
4.7 Prosedur Penelitian	20
4.8 Analisis Data	25
4.9 Skema Operasional Penelitian	26

BAB 5 HASIL DAN ANALISIS

5.1 Uji Hemagglutinin	28
5.2 Uji Hambat Adhesi	28

BAB 6 PEMBAHASAN	32
------------------------	----

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan	35
7.2 Saran	35

DAFTAR PUSTAKA	36
----------------------	----

LAMPIRAN	39
----------------	----

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	61
-----------------------------------	----

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Hasil Penghitungan Jumlah Bakteri *Shigella sonnei*

30





DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Patogenesis Infeksi <i>Shigella</i>	5
Gambar 5.1 Hasil Uji Hemagglutinin	28
Gambar 5.2 Hasil Uji Hambat Adhesi	29
Gambar 5.3 Diagram Indeks Adhesi.....	30



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 <i>Chequeboard</i>	39
Lampiran 2 Uji Biokimia	40
Lampiran 3 Hasil Analisis Statistik	41
Lampiran 4 Dokumentasi Penelitian	55
Lampiran 5 Surat Keterangan Kelaikan Etik	60



1.1 Latar Belakang

Diare akut merupakan masalah yang serius baik di negara berkembang maupun negara maju. Di negara berkembang, diare karena infeksi menyebabkan kematian sekitar 3 juta penduduk setiap tahun (Zein *et al.*, 2004). Diare karena infeksi bisa disebabkan oleh virus, bakteri, parasit, protozoa dan jamur. Salah satu bakteri penyebab diare adalah bakteri *Shigella spp.* Terdapat empat jenis bakteri *Shigella* yaitu *S. dysentiae*, *S. sonnei*, *S. flexneri*, dan *S. boydii*. Keempat jenis ini dibedakan berdasarkan antigen O dari lipopolisakarida bakteri dan beberapa reaksi biokimia, seperti produksi indol atau fermentasi mannitol.

Dari data studi epidemiologi yang dilakukan kepada pelancong Jepang yang memiliki gejala diare setelah kepergian mereka ke luar negeri di *Kansai Airport Quarantine Station* antara tahun 2001-2005 didapatkan bahwa sekitar 80% dari sampel yang terisolasi, positif *Shigella sonnei* dan negara tersering yang menjadi negara asal kepergian penderita adalah India, sedangkan Indonesia dan Kamboja ditempat kedua, serta Thailand menduduki tempat ketiga. (Arai *et al.*, 2007). *Shigella spp.*, menyebabkan setidaknya 100.000 kasus infeksi berat pada saluran pencernaan tiap tahunnya. Di negara maju, seperti Amerika, sebagian besar kasus Shigellosis disebabkan oleh infeksi *S. sonnei*. Sisanya sebagian terutama disebabkan oleh *S. flexneri* yang biasanya berasal dari luar negeri (Mandal *et al.*, 2004).

Bakteri *Shigella* menginviasi dan membuat koloni pada epitel usus manusia, yang kemudian menyebabkan teraktivasinya respon inflamasi akut.

Respon inflamasi akut terjadi karena bakteri yang menembus mukosa usus manusia melalui sel M kemudian menginvasi jaringan epitel usus dengan mensekresi faktor-faktor virulensi dan menyebabkan diproduksinya mediator-mediator proinflamasi sebagai akibat dari kerusakan jaringan, seperti interleukin 8, yang memiliki peranan penting dalam menginduksi terjadinya proses inflamasi akut yang berat (Torres, 2004).

Terapi antimikroba untuk pasien dengan diare basiler meliputi pemberian fluoroquinolon seperti ciprofloxacin. Selain itu juga ada ceftriaxone, azithromycin, dan pivmecillinam (Fauci *et al.*, 2009). Namun disebutkan bahwa di negara-negara Asia Tenggara terdapat bakteri dari jenis *Shigella sonnei* yang resisten terhadap beberapa antimikroba, diantaranya tetracycline, sulfamethoxazole-trimethropim, dan asam nalidixic (Arai *et al.*, 2007). Oleh karena itu diperlukan strategi lain dalam penanggulangan infeksi bakteri *Shigella sonnei*, salah satunya dengan pembuatan vaksin sebagai upaya pencegahan infeksi.

Bakteri gram negatif memiliki pili pada permukaan tubuhnya yang berperan dalam perlekatan bakteri simbiotik atau patogen ke sel penjamu (Brooks *et al.*, 2007). Telah dilakukan beberapa penelitian tentang protein pili bakteri gram negatif, diantaranya menyebutkan bahwa pada bakteri *Shigella dysentrie* terdapat protein hemagglutinin pili dengan berat molekul 48,9 kDa yang berperan sebagai molekul adhesin (Prabowo, 2011). Protein hemagglutinin merupakan protein yang melekat dengan properti aglutinasi dan adhesi, memiliki peranan penting dalam inisiasi dan perkembangan gejala klinis serta komplikasi dalam *Shigellosis* (Gbarah *et al.*, 1993; Snellings *et al.*, 1997). Pada penelitian ini akan dilakukan klarifikasi protein hemagglutinin pili pada spesies bakteri *Shigella* lain yaitu *Shigella sonnei* yang diduga sebagai molekul adhesin sehingga dapat

menjadi kandidat vaksin yang diharapkan dapat menstimulasi respon imun namun memiliki efek samping yang minimal.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah protein hemaglutinin pili *Shigella sonnei* merupakan molekul adhesi bakteri?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan molekul hemaglutinin pili bakteri *S.sonniei* berperan sebagai molekul adhesi melalui uji hambat adhesi.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mencari berat molekul protein hemaglutinin pili *Shigella sonnei* yang diduga sebagai molekul adhesin bakteri.
2. Membuktikan bahwa protein hemaglutinin pili *S. sonnei* dapat menghambat adhesi bakteri ke enterosit.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Memberi informasi ilmiah mengenai protein hemaglutinin pili *Shigella sonnei* sebagai molekul adhesi yang kemudian dapat digunakan sebagai acuan penelitian-penelitian selanjutnya.



1.4.2 Manfaat Praktis

Hasil dari penelitian ini dapat digunakan sebagai referensi dalam pembuatan vaksin *Shigella sonnei* yang akan mengurangi insiden diare yang disebabkan infeksi bakteri *Shigella*.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Shigella

Shigella merupakan bakteri batang gram negatif, fakultatif anaerob, non motil dan tidak membentuk spora. Merupakan anggota dari famili Enterobacteriaceae. Enterobacteriaceae mempunyai struktur antigenik yang kompleks. Mereka diklasifikasikan oleh lebih dari 150 antigen somatik O (lipopolisakarida) yang berbeda, lebih dari 100 antigen K (kapsular), dan lebih dari 50 antigen H (flagellar). Kuman *Shigella* memiliki kekerabatan biokimia dan antigenik yang sangat dekat dengan *Escherichia coli*. Sebagian besar memfermentasi glukosa namun tidak bisa memfermentasi laktosa, kecuali *S. sonnei* yang memfermentasi laktosa dengan lambat, dan tidak dapat mengakibatkan reaksi dekarboksilasi lysin. Selain itu, saat fermentasi glukosa, tidak memproduksi gas (H_2S) tetapi menghasilkan asam, sehingga membuat ujung asam yang khas dan basa akhir dalam triplet agar besi gula (TSI).

Kultur *Shigella* berbentuk cembung, bundar, transparan dengan diameter sampai kira-kira 2 mm dalam 24 jam. *Shigella* mempunyai bentuk antigenik yang kompleks. Bagian tubuh antigen O *Shigellae* adalah polisakarida. Kekhususan serologik mereka tergantung pada polisakarida. Klasifikasi *Shigellae* tergantung pada karakteristik dalam reaksi biokimia dan antigenik. Terdapat empat spesies *Shigella* yaitu *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, dan *S. sonnei*, yang dibedakan berdasarkan antigen O somatik permukaan dan pola fermentasi karbohidrat (Torres, 2004; Brooks *et al.*, 2007; Fauci *et al.*, 2009).



Struktur permukaan dinding bakteri gram negatif tersusun atas membran luar berupa lapisan pospolipid, protein dan polisakarida yang biasa disebut sebagai lapisan lipopolisakarida (LPS). Pada lapisan LPS juga terdapat lipid A yang berperan dalam produksi endotoxic bakteri gram negatif. Selain itu juga terdapat porin yang berfungsi sebagai kanal untuk keluar masuknya substansi dengan berat molekul rendah yang bersifat hidrofilik, sehingga membran luar bakteri bersifat permeabel terhadap protein dengan berat molekul rendah. Untuk menghambat permeabilitas enzim dan molekul besar lainnya terdapat lapisan periplasma yang terletak diantara membran luar dan membran sitoplasma (Madigan *et al.*, 2009).

Bakteri gram negatif juga mempunyai pili pada permukaan tubuhnya. Pili tersusun atas subunit protein struktural yang disebut pilin. Protein minor, yang terletak pada ujung pili, menyebabkan bakteri dapat melekat pada sel lain. Pili dibagi menjadi dua kelas yaitu, pili biasa yang berperan dalam perlekatan bakteri simbiotik atau patogen ke sel penjamu, dan pili seksual yang berperan dalam perlekatan sel donor ke resipien pada proses konjugasi bakteri (Brooks *et al.*, 2007).

Enam dari duapuluhan isolat klinis, mencakup 4 galur *S. flexneri*, 1 galur *S. boydii* dan 1 galur *S. dysentrie* memproduksi pili tipe 1 ketika dideteksi dengan *mannose-sensitive hemagglutination (MSHA)* dan mikroskop elektron (Snelling *et al.*, 1997). Aglutinasi merupakan penampakan gumpalan antigen khusus saat dicampur dengan antibodi spesifik untuk antigen spesifik. Sedangkan hemaglutinin, protein yang melekat dengan properti aglutinasi dan adhesi, memiliki peranan penting dalam inisiasi dan perkembangan gejala klinis serta komplikasi dalam *Shigellosis* (Gbarah *et al.*, 1993; Snellings *et al.*, 1997).

Perlekatan dan kolonisasi bakteri pada hospes diperantara oleh protein adhesin, yang bertanggung jawab untuk mengenali reseptor khusus pada sel hospes. Reseptor ini biasanya berupa karbohidrat spesifik atau residu peptida pada permukaan sel eukariotik, sedangkan adhesin bakteri merupakan komponen makromolekul yang terdapat pada permukaan sel bakteri. Sejumlah besar adhesin merupakan spesifik glikoprotein atau glikolipid dan dikenal sebagai lektin. Lektin akan mengikatkan bakteri ke *carbohydrate moiety* dari glikoprotein atau glikolipid yang terdapat pada sel epitel atau sel lain dari hospes. Lektin ini biasanya berbentuk struktur fimbriae, kapsul atau komponen aoter membrane dari bakteri gram negatif (Wu et al., 1996)

Adhesi bakteri gram negatif diperankan oleh suatu protein yang mampu mengaglutinasi eritrosit mamalia. Protein ini disebut dengan protein hemaglutinin, salah satu contoh adalah protein adhesin *Klebsiella pneumoniae* yang dilakukan oleh protein hemaglutinin 29 kDa. Uji hemagglutinasi berguna sebagai identifikasi protein adhesin pada beberapa bakteri. Beberapa metode imunologi juga dapat digunakan untuk membuktikan adanya protein adhesin yaitu dengan metode western blot, dot blot dan imunositokimia (Anam, 2012). *Shigella dysenteriae* mengandung protein hemaglutinin dengan berat molekul 49,8 kDa yang merupakan protein adhesin (Prabowo, 2011).

Siklus pertumbuhan bakteri *S. sonnei* dilihat pada kurva pertumbuhan kuman yang dilakukan dengan pengamatan pada pembiakan dari biakan jenuh ke dalam media perbenihan baru, umumnya digambarkan sebagai grafik jumlah logaritmik kuman terhadap satuan waktu, pertumbuhan kuman ini terdiri dari empat fase yaitu, fase lag (saat sel yang kekurangan gizi beradaptasi terhadap lingkungan baru), fase log (biomassa sel disintesis dalam kecepatan yang sama),

fase seimbang (se-sel kekurangan zat gizi yang esensial atau bertumpuknya produk-produk beracun yang menyebabkan pertumbuhan sama sekali berhenti), dan fase kematian atau kemunduran (sel-sel mati akibat produk-produk beracun). Kurva pertumbuhan ini khas untuk tiap-tiap nutrisi (Johnson *et al.*, 1994).

2.2 Epitel Saluran Pencernaan

Saluran cerna berupa tabung berongga yang terdiri atas lumen dengan diameter yang bervariasi, dan dikelilingi oleh dinding yang terdiri atas empat lapisan utama yaitu, mukosa, submukosa, muskularis, dan serosa. Lapisan mukosa, merupakan lapisan terluar yang terdiri atas epitel pelapis, sebuah lamina propria jaringan ikat yang kaya akan pembuluh darah, pembuluh limfe, dan sel-sel otot polos, kadang-kadang juga mengandung kelenjar dan jaringan limfoid. Mukosa sering disebut membran mukosa. Fungsi utama epitel pelapis saluran cerna adalah sebagai sawar yang secara selektif bersifat permeabel diantara isi saluran cerna dan jaringan tubuh, untuk memudahkan transpor dan pencernaan makanan, membantu absorpsi produk pencernaan, dan menghasilkan hormon yang mempengaruhi aktivitas sistem pencernaan. Sel-sel lapisan ini menghasilkan mucus sebagai pelumas dan pelindung (Junqueira *et al.*, 2004).

Pada usus halus membran mukosa berupa lipatan-lipatan permanen, yaitu plika sirkularis (katup Kerckring). Terdapat vili intestinalis yang merupakan penonjolan atau pertumbuhan mukosa. Diantara vili terdapat muara kecil dari kelenjar tubular simpleks yang disebut kelenjar intestinal atau kelenjar Lieberkuhn. Epitel vili menyatu dengan epitel kelenjar. Kelenjar intestinal mengandung sel induk, sedikit sel absorptif, sel goblet, sel Paneth, dan sel enteroendokrin. Sel absorptif adalah sel silindris tinggi, masing-masing dengan

inti lonjong di bagian basal sel. Di apeks sel terdapat lapisan homogen yang disebut brish border. Dengan mikroskop elektron, brush border ini terlihat sebagai lapisan mikrovili padat (Junqueira *et al.*, 2004).

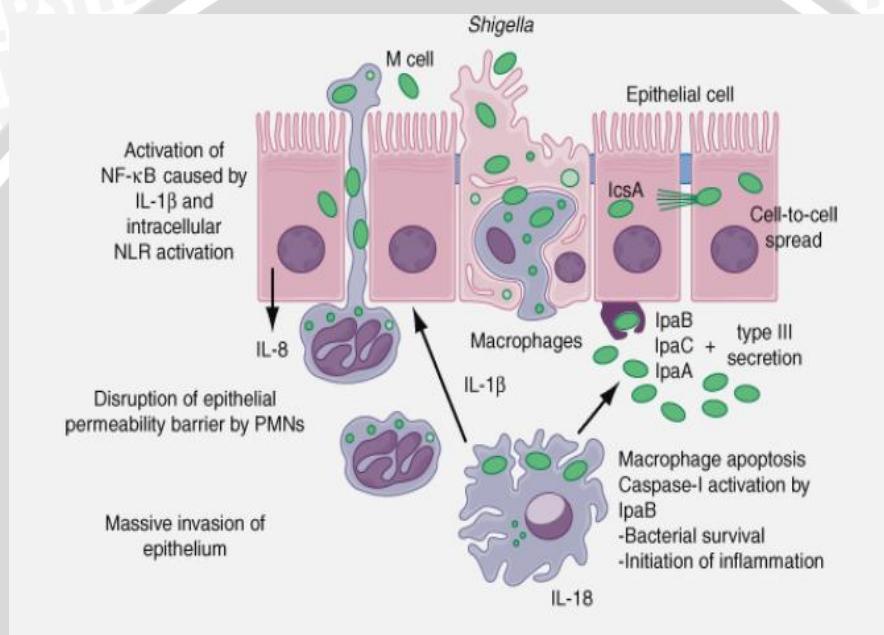
Sel M (*microfold*) adalah sel epitel khusus yang menutupi folikel limfoid di plak peyer. Sel ini ditandai dengan banyaknya invaginasi membran basal yang membentuk sumur-sumur yang mengandung banyak limfosit intraepitel dan sel penyaji-antigen (makrofag). Sel M dapat mengendositosis antigen dan mentranspornya kepada makrofag dan limfosit di bawahnya, yang kemudian bermigrasi ke kompartemen lain di sistem limfoid (nodus), yaitu tempat dimulainya respons imun terhadap antigen asing. Sel M merupakan penghubung penting dalam sistem imunologi usus. Membran basal di bawah sel M tidak bersifat kontinu, yang memudahkan perpindahan zat antara lamina propria dan sel M (Junqueira *et al.*, 2004).

2.3 Patogenesis *Shigellosis*

Shigellosis adalah penyakit yang ditularkan melalui makanan atau air yang terkontaminasi oleh bakteri *Shigella*. Penyebarannya secara fekal oral dari satu penderita ke orang lain. Organisme *Shigella* menyebabkan disentri basiler (*Shigellosis*) dan menghasilkan respons inflamasi pada intestinal melalui enterotoksin dan invasi bakteri pada epitel (Zein *et al.*, 2004).

Hanya diperlukan sekitar 10-100 organisme untuk menginfeksi manusia. Proses patologik yang penting adalah invasi ke sel epitel mukosa (misalnya sel M) yang diinduksi oleh fagositosis, keluar dari vakuola fagositik, pelipatgandaan dan pengembangan dalam sitoplasma sel epitel, dan menyebar ke sel yang ada didekatnya (Brooks *et al.*, 2007).

Shigella memproduksi plasmid virulen yang mengkode gen untuk memproduksi plasmid invasi antigen (*Ipas*), sistesis T3SS (*type III secretion apparatus*), menginduksi percepatan endositik bakteri dan merusak endositik vakuola, menyebarkan fenotip bakteri secara intra dan interselular, mengatur gen virulen yang dikode plasmid (Torres, 2004).



Gambar 2.1 Patogenesis Infeksi *Shigella*
(Sumber: Fauci et al., 2008)

Pada sigelosis, permukaan epitel kolon manusia memperlihatkan ulserasi yang luas, dengan eksudat yang terdiri dari deskuamasi sel kolon, leukosit polimorfonuklear dan eritrosit; ulserasi dapat mirip pseudomembran pada daerah yang terinfeksi hebat. Pengurangan mukus yang jelas dan peningkatan aktivitas mitotik terlihat pada permukaan sel kolon. Lamina propria menjadi edematos, berdarah dan diinfiltrasi oleh neutrofil dan sel plasma. Ada juga pembengkakan dan sel endotel kapiler venula, dengan batas pinggir neutrofil. Tropisme toksin pada sel endotel dapat menjelaskan patologi ini, yang dapat mengakibatkan kehilangan cairan dan merupakan dasar komplikasi sistemik dari infeksi S.

dysenteriae tipe I seperti kerusakan glomeruler dan hemolisis mekroangiopati (sindroma uremik-hemolitik). Pada tingkat ultrastruktural, bakteri dapat dilihat dalam vesikel seperti juga dalam keadaan bebas dalam sitoplasma (Isselbacher et al., 1995).

2.4 Manifestasi Klinis

Pasien Shigellosis dapat tidak menunjukkan gejala apapun pada awal infeksi, kemudian akan muncul demam disertai atau tanpa diare yang cair dengan periode pendek, menyebabkan malaise, segera setelah itu diikuti oleh pengeluaran darah yang progresif setelah 3-5 hari, lendir yang sering kali mukopurulen dan dapat terjadi kram perut dan *tenesmus* yang berat (WHO, 2009).

Perkembangan penyakit *Shigellosis* meliputi empat fase yaitu fase inkubasi, diare cair, disentri dan fase pasca infeksi. Masa inkubasi biasanya antara 1-4 hari namun bisa sampai 8 hari. Manifestasi awal adalah demam dengan suhu sedang, diare cair ringan, malaise dan anorexia. Tanda dan gejalanya bisa meliputi rasa tidak nyaman pada perut yang ringan sampai terjadi kram perut yang berat, diare, demam, muntah dan tenesmus. Pada penderita anak-anak, bisa terjadi eksaserbasi dengan temperatur $40^0\text{-}41^0\text{C}$ serta anorexia dan diare cair yang lebih berat (Fauci et al., 2009).

2.5 Diagnosa

Diagnosa untuk penyakit Shigellosis meliputi anamnesis kepada pasien, pemeriksaan fisik serta pemeriksaan penunjang, diantaranya adalah pengecatan gram dan kultur bakteri. Spesimen sebagai bahan untuk diperiksa bisa berupa feses segar, lendir, dan usapan rektum. Pada pemeriksaan mikroskopik akan

ditemukan banyak sel PMN dan kadang-kadang juga ditemukan beberapa sel darah merah. Gold standar untuk diagnosa infeksi Shigella adalah ditemukannya bakteri patogen Shigella pada pemeriksaan feses.

Pada pemeriksaan diferensial dengan kultur bakteri, maka dilakukan apusan bahan pada medium diferensial (misalnya, agar MacConkey atau EMB) dan pada medium selektif (agar enterik Hektoen atau agar salmonela-shigella), yang menekan pertumbuhan Enterobacteriaceae lain dan organisme gram positif. Hasil dari kultur pada medium diferensial setelah inkubasi selama 12-18 jam akan didapatkan koloni yang tidak berwarna (laktosa-negatif), diinokulasi pada agar triplet gula besi, yang diameternya antara 0,5-1 mm dan berbentuk konvek, transparan, permukaannya halus. Organisme yang tidak menghasilkan H_2S , yang menghasilkan asam tetapi tidak menghasilkan gas pada pangkal dan bagian miring yang basa di medium agar triplet gula besi, dan tidak motil sebaiknya dilakukan pemeriksaan aglutinasi slide dengan antiserum spesifik shigella. (Brooks *et al.*, 2007; Fauci *et al.*, 2009)

2.6 Pengobatan

Rehidrasi merupakan langkah pertama yang dilakukan untuk menangani dehidrasi pasien diare cair akut dengan berbagai etiologi dan dapat menurunkan angka kematian yang disebabkan oleh diare secara bermakna. Walaupun begitu dehidrasi berat jarang ditemukan pada kasus Shigellosis (Niyogi, 2005)

Terapi antimikroba empirik yang dapat diberikan pada pasien dengan diare yang disebabkan oleh Shigella sebagai obat lini pertama adalah antimikroba golongan fluorokuinolon. Generasi kedua kuinolon seperti norfolaxin, ciprofloxacin dan ofloxacin memiliki efektivitas tinggi pada pengobatan shigellosis. Obat lain yang dapat digunakan diantaranya adalah ceftriaxone,



azithromycin, pivmecillinam, dan beberapa obat generasi lima golongan kuinolon. Selain itu trimetoprim-sulfametazol (TMZ-SMZ) dan ampicilin oral juga dapat dijadikan sebagai obat alternatif untuk mengatasi shigellosis. TMZ-SMZ merupakan suatu campuran 1 bagian trimetropim ditambah 5 bagian sulfametoksazol (Katzung, 1998; Fauci *et al.*, 2009).

Resistensi terhadap obat dapat disebar oleh plasmida, dan infeksi akan menyebar. Penggunaan opiods seharusnya dihindari dalam disentri shigella. Pemberian beberapa obat antidiare lain yang menghasilkan penghambatan pelepasan asetilkolin melalui reseptor opioid presinaptik dalam sistem saraf enterik seperti, difenoksilat, loperamid, dan difenoksin, dapat memperpanjang masa diare pada penderita dengan infeksi *Shigella* dan *Salmonella* (Katzung, 1998; Brooks *et al.*, 2007)

2.7 Pencegahan

Hal terpenting yang dilakukan untuk mencegah penyebaran infeksi *Shigella* adalah dengan menjaga higiene pribadi yang baik. Mencuci tangan setelah dari toilet dan sebelum menyentuh makanan merupakan salah satu cara efektif untuk mencegah penyebaran secara fekal-oral. Tempat pembuangan feses hendaknya jauh dari pemukiman. Penyediaan makanan dan air bersih juga sangat penting mengingat makanan dan air yang terkontaminasi bakteri *Shigella* merupakan sarana penularan yang utama.

Strategi yang dapat dilakukan untuk mengurangi angka kematian dan kesakitan diantaranya adalah dengan edukasi kepada masyarakat untuk menjaga kebersihan makanan dan air yang dikonsumsi dan selalu mencuci tangan setelah buang air besar, menganjurkan kepada ibu untuk memberikan ASI bagi bayinya untuk meningkatkan kekebalan tubuh bayinya, mempromosikan

penggunaan terapi rehidrasi oral untuk menghilangkan efek dari diare akut, menganjurkan kepada ibu untuk menyediakan nutrisi yang cukup bagi anak yang baru sembuh dari diare akut (Niyogi, 2005).

2.8 Vaksin

Peranan utama dari vaksin *Shigella* diharapkan dapat mencegah dan menghindarkan timbulnya gejala klinis *Shigellosis* pada orang yang terpajan bakteri *Shigella*. Sebagai tambahannya adalah kemampuannya dalam mencegah proses invasi dan kolonisasi bakteri. Strain *Shigella* yang menjadi perhatian dalam pembuatan vaksin adalah *S. flexneri 2a*, *S. dysenteriae tipe 1* dan *S. sonnei*. Saat ini upaya yang dilakukan dalam pembuatan vaksin *Shigella* adalah dengan pemberian bakteri yang dilemahkan dan pemakaian bagian lipopolisakarida atau polisakarida bakteri. Vaksin dari pelemahan bakteri hidup ini masih memiliki kemampuan untuk menginvasi sel epitel walaupun tidak bekerja efektif dalam persebaran interseluler, tidak memproduksi enterotoksin dan memiliki kemampuan proliferasi yang minimal dalam percobaan secara *in vivo* menggunakan turunan bakteri *Shigella flexneri 2a*. Sedangkan konyugat protein polisakarida *Shigella* merupakan vaksin yang terdiri dari protein yang diharapkan dapat menghasilkan respon antibodi untuk melawan polisakarida imunodenik yang lemah (Torres, 2004).

Perlekatan bakteri biasanya meliputi interaksi antara protein permukaan bakteri yang disebut adhesin dengan reseptor sel host. Studi preklinis menggunakan adhesin FimH, turunan dari *E. coli* uropatogenik, menyebutkan bahwa antibodi yang didapat dalam melawan adhesin memiliki kemampuan menghalangi kolonisasi, memblok infeksi, dan mencegah timbulnya penyakit. FimH adhesin berada pada pili bakteri, sehingga adhesin pili juga merupakan



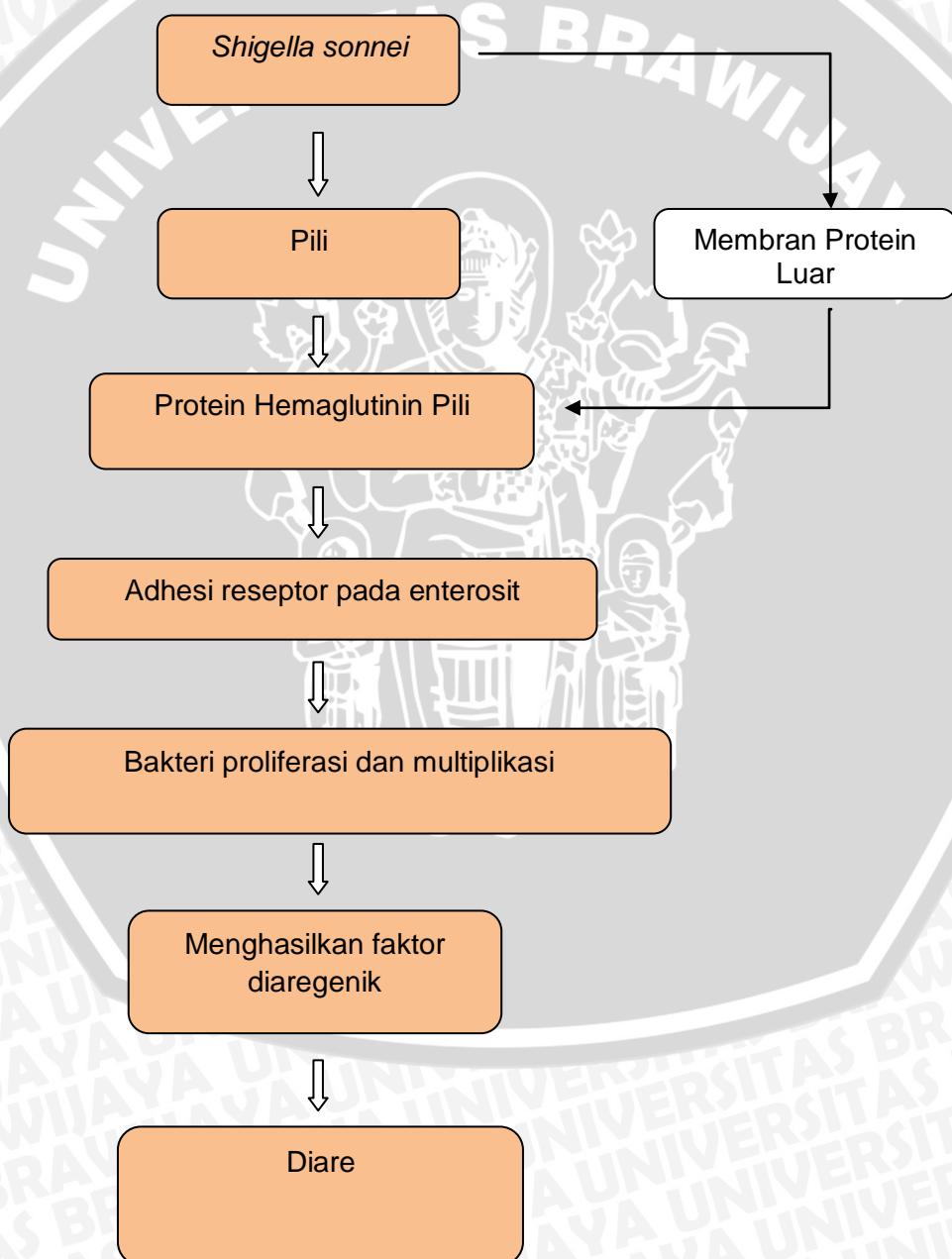
target penting dalam pembuatan vaksin. Saat ini penelitian mengenai pembuatan vaksin Shigella dari adhesin pili masih terbatas (Prabowo, 2011).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Bakteri *S. sonnei* termasuk kedalam kelompok bakteri gram negatif. Ini berarti, pada dinding luar bakteri terdapat pili yang dapat berperan sebagai alat menempel pada enterosit. Peranan pili ini, disebabkan karena pada pili bakteri *S. sonnei* terdapat molekul protein hemaglutinin yang diduga sebagai molekul adhesin dari bakteri *S. sonnei*.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan latar belakang, tinjauan pustaka dan kerangka konsep, maka dapat dirumuskan hipotesis penelitian sebagai berikut :

Molekul hemaglutinin pili *Shigella sonnei* merupakan molekul yang berfungsi untuk adhesi bakteri pada enterosit.



BAB 4

Metode Penelitian

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental untuk mengetahui struktur protein dasar dari pili *Shigella sonnei*, dan mengkonfirmasi bahwa protein hemaglutinin yang telah ditemukan pada pili bakteri merupakan protein adhesin. Penelitian menggunakan metode uji adhesi dengan mencampurkan suspensi bakteri dan suspensi enterosit. Hasilnya dievaluasi dengan mikroskop dengan melihat gambaran morfologi bakteri yang menempel pada enterosit.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah bakteri *Shigella sonnei* yang diambil dari laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Protein pili bakteri *Shigella sonnei*

4.3.2 Variabel Tergantung

Jumlah perlekatan bakteri *S. sonnei* pada enterosit

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang antara bulan November 2011 - Mei 2012.



4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

Ependorf, Micropipet, Sentrifugasi, Water bath, Kaca slide, Mikroskop, Yellow tip, Blue tip, Hand gloves.

4.5.2 Bahan Penelitian

Bakteri *Shigella sonnei*, enterosit mencit, Media DDT (dithiothreitol), Brain Heart Insufusion (BHI) broth.

4.6 Definisi Operasional

Klarifikasi protein hemaglutinin *Shigella sonnei* sebagai molekul adhesi dilakukan dengan metode uji hambat adhesi bakteri *Shigella sonnei* pada enterosit mencit. Molekul adhesi adalah komponen pada permukaan sel bakteri yang memfasilitasi adhesi (perlekatan) ke sel lain, contohnya pili atau fimbriae. Pada penelitian ini dilakukan klarifikasi dengan menggunakan protein hemaglutinin sub-unit pili BM 49,8 kDa *S.sonnei*.

Metode uji hambat adhesi dose respon adalah protein HA sub-unit pili BM 49,8 kDa *S. sonnei* yang disalutkan ke enterosit dengan konsentrasi semakin menurun dengan perbesaran pengenceran mulai dari konsentrasi 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000 dan 0 atau kontrol. Semakin rendah konsentrasi protein semakin tinggi indeks adhesi.

Indeks adhesi pada metode dose respon adalah banyaknya bakteri yang melekat pada enterosit dihitung sampai seratus enterosit dan dibuat reratanya.



4.7 Prosedur Penelitian

Seluruh prosedur yang dilakukan pada penelitian ini merujuk pada tesis dari Avanita S Prabowo yang berjudul "*Partial Characterization of Adhesins Pili on Shigella Dysenteriae*" dan Faisal dkk. yang berjudul "*Pengaruh Susu Kuda Sumbawa Terfermentasi pada Protein Adhesi 37,8 kDa Vibrio cholerae O1 di konjugasi CTB terhadap Respon s-IgA dan Sekresi Cairan Usus Mencit*", yang meliputi :

4.7.1 Kultur *Shigella sonnei*

Bakteri yang digunakan merupakan hasil kultur dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sediaan bakteri cair dikultur pada media agar Salmonella-Shigella (SSA), untuk memastikan kemurnian dari sampel bakteri, pada 37⁰C selama 24 jam. Kemudian bakteri dipindahkan ke medium TCG yang bertujuan untuk memperbanyak pertumbuhan pili *Shigella sonnei*. Medium TCG tersusun atas 0,02% *thioproline*: 0,3% N_aHCO₃, 0,1% mono sodium L-glutamate, 1% *baktotrypton*: 0,2% ekstrak ragi, 0,5% N_aCL: 2% agar bacto dan *ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)*. Medium dibuat dengan botol yang masing-masing berukuran 250 ml, bahan dituangkan kedalam 15 botol dan dibiarkan dengan kemiringan botol sebesar 15⁰. Masing-masing botol kemudian diisi dengan medium TCG sebanyak 50 ml. Setelah itu, bakteri yang telah dipanen dikultur pada cawan petri yang mengandung media MacConkey untuk multiplikasi dan diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam. Hasil dari kultur pada medium SSA kemudian dipanen dengan cara dikerok (*scraping*) yang mana sebelumnya telah diisi PBS steril dengan pH 7,4 sebanyak 10 ml. Suspensi bakteri dari hasil kerokan kemudian dimasukkan kedalam botol yang mengandung 1000 ml larutan *BHI (brain heart infusion)*. Kemudian botol

dikocok kuat selama 30 menit di *water bath* pada suhu 37⁰ C. Selanjutnya dari botol tersebut suspensi bakteri sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam masing-masing botol yang telah mengandung medium TCG dan kemudian dilakukan pengeraman pada suhu 37⁰ C selama 2 x 24 jam.

4.7.2 Isolasi Pili *Shigella sonnei*

Isolasi pili merujuk pada penelitian Ehara (Ehara *et al.*, 1987 dalam Avanita, 2011) dengan modifikasi menggunakan metode pencukuran pili (Sumarno, 2000 dalam Avanita, 2011). Pili yang dipanen dan dikoleksi berasal dari biakan bakteri yang tumbuh pada setiap botol pada medium TCG yang telah diinkubasi. Hasil koleksi bakteri dikumpulkan dalam satu botol steril yang kemudian ditambahkan *tricoleracetic acid* (TCA) sampai konsentrasinya 3%. Setelah dikocok rata maka koleksi bakteri diletakkan pada suhu kamar selama 1 jam dengan dikocok secara konstan. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan menggunakan kecepatan sebesar 6.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4⁰ C. Pelet hasil sentrifugasi diambil dan disuspensikan memakai cairan PBS pH 7,4. Suspensi bakteri tersebut dicukur dengan menggunakan *pili cutter* yang dibuat oleh Laboratorium Politeknik UB Malang. Pencukuran pili bakteri akan dilakukan menggunakan modifikasi *omni mixer* pada suhu 4⁰ C. Spesifikasi kecepatan pada 6 putaran masing-masing adalah 5.000 rpm selama 30 detik, 5.000 rpm selama 1 menit, 5.000 rpm selama 2 menit, 10.000 rpm selama 1 menit, 10.000 rpm selama 2 menit dan terakhir 10.000 rpm selama 2 menit. Selanjutnya sampel hasil pencukuran disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 30 menit pada temperatur 4⁰ C. Supernatan hasil sentrifugasi yang mengandung bagian pili bakteri dimasukkan kedalam ependorf dan disimpan pada suhu 4⁰ C. Pada bagian endapannya ditambahkan cairan PBS pH 7,4 dan akan digunakan pada



tahap pencukuran pili selanjutnya. Pada akhir tahap ini, semua supernatan yang mengandung protein pili disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C . Supernatan yang mengandung fraksi pili dipindahkan kedalam ependorf dan disimpan pada suhu -20°C . Endapan yang tersisa ditambahi PBS pH 7,4 yang mengandung NOG 0,05%. Kemudian sampel divortex selama 1 menit dan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C . Supernatan dipindahkan ke dalam ependorf dan disimpan pada suhu -20°C . Tahap perlakuan yang sama dilakukan pada endapan sampai lebih dari 3 kali dan supernatan hasil sentrifugasi dipindahkan kedalam ependorf yang berbeda pada tiap putaran dan disimpan pada suhu -20°C .

4.7.3 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophorosis (SDS-PAGE)

Monitoring berat molekul-molekul dikerjakan dengan metode SDS-PAGE (Laemli, 1970 dalam Avanita, 2011). Sampel protein dipanaskan dengan suhu 100°C selama 5 menit dalam larutan penyangga yang mengandung 5 mM Tris pH 6,8: 5% 2-mercpto ethanol, 2,5 w/v sodium dosecyl sulfat, 10% v/v glycerol tarcking gel 4%. Voltase aliran listrik yang digunakan adalah 120 mV. Sebagai bahan warna yang digunakan adalah coomassie brilant blue dan molekul standar fermentas low range marker. Setelah dilakukan perhitungan berat molekul maka dilakukan perbanyakkan protein yang dibutuhkan dari hasil SDS-PAGE.

4.7.4 Isolasi Pili Protein *Shigella sonnei*

Pemurnian protein menggunakan metode Ehara (Ehara *et al.*, 1987 dalam Avanita, 2011) dengan modifikasi (Sumarno, 1991 dalam Avanita, 2011). Protein yang tergambar dengan pita-pita pada gel hasil elektroforesis menggunakan SDS-PAGE dapat menunjukkan karakteristik protein pili dengan berat molekul tertentu pada pita. Pita gel yang dipilih kemudian dipotong tegak lurus sehingga tiap potongnya akan mengandung satu pita protein. Hasil potongan pita tersebut dikumpulkan dan dimasukkan ke dalam tabung membran, kemudian dianalisis menggunakan cairan penyanga elektroforesis *running buffer*. Selanjutnya dilakukan elektroelusi menggunakan elektroforesis horizontal apparatus aliran listrik 120 mV selama 90 menit. Hasil dari elektroelusi kemudian didialisis dengan cairan penyanga PBS pH 7,4 sebanyak 2 liter selama 2 x 24 jam dan cairan PBS diganti secara berkala sebanyak 4 kali.

4.7.5 Uji Hemaglutinin (HA)

Uji HA menggunakan metode dari Hanne (Hanne *et al.*, 1982 dalam Avanita, 2011). Pengenceran sampel dibuat konsentrasi pada microplate bentuk sumuran V yang masing-masing sumuran memiliki volume 50 ml. Setiap sumuran ditambahkan suspensi darah merah tikus pada konsentrasi 0,5% volume dan dikocok menggunakan piringan rotator selama 1 menit. Selanjutnya piringan ditempatkan pada suhu kamar selama 1 jam. Jumlah titer ditentukan dengan mengamati aglutinasi darah merah pada pengenceran terendah. Sampel yang diuji adalah *Shigella sonnei* seluruh sel, dan protein pili pilihan yang telah diekstrak melalui siklus pertama hingga keenam dari pemotongan pili dan dimurnikan. Darah merah tikus diambil dari tikus BALB/C sehat.



4.7.6 Preparasi enterosit mencit

Enterosit mencit dipreparasi dengan metode dari Weiser (Weiser, 1973 dalam Avanita, 2011). Usus halus dikeluarkan dari tikus. Kemudian dibuka dan dibersihkan dari mukus dan kotoran menggunakan PBS yang mengandung 1.0 mM dithiothreitol (DTT) pada suhu 4°C . Jaringan intestinal diletakkan pada larutan dengan pH 7,4 yang mengandung 1.5 mM KCL, 9.6 mM NaCL, 27.0 mM sodium citrate, 8.0 mM KH_2PO_4 , dan 5.6 mM Na_2HPO_4 yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit sambil dikocok ringan. Setelah itu supernatan dibuang, dan jaringan dipindahkan pada cairan PBS mengandung 1.5 mM EDTA dan 0,5 mM DTT dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C sambil dikocok lebih kencang. Supernatan dibuang dan sel dicuci dengan PBS dengan tiga atau lebih sentrifugasi pada 1.500 rpm selama 15 menit. Enterosit yang terisolasi dikumpulkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 1.500 rpm selama 5 menit dan disuspensi dengan PBS mengandung 1% bovine serum albumin (BSA) sampai konsentrasi kira-kira $10^6/\text{ml}$. Jumlah enterosit dihitung dengan hemocytometer. Enterosit disimpan pada suhu 4°C sampai uji adhesi dilakukan.

4.7.7 Uji hambat adhesi pada enterosit mencit

Strain *Shigella sonnei* yang ditumbuhkan pada brot BHI selama 24 jam pada suhu 37°C kemudian dipanen dan disuspensi pada PBS yang mengandung 1% BSA sampai konsentrasi kira-kira $10^8/\text{ml}$. 100 μl suspensi bakteri dicampur dengan 100 ml suspensi 10^6 enterosit mencit per ml dan 100 μl protein yang telah dipurifikasi pada PBS mengandung 1% BSA. Campuran itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit sambil dikocok ringan, dan kemudian bakteri yang tidak menempel dibuang dengan cara mengulang

pencucian menggunakan PBS yang mengandung 1% BSA. Enterosit dikumpulkan dengan disentrifugasi dengan kecepatan 1.500 rpm selama 2 menit dan disuspensi dalam 300 μ l PBS. Sebanyak 20 μ l suspensi diekstrak dan diletakkan pada kaca slide untuk dicat dengan metode pengecatan gram. Index adhesi dihitung dengan observasi mikroskopik (Kobayashi *et al.*, 1993 dalam Avanita, 2011).

4.7.8 Pengecatan Gram

Pengecatan dilakukan untuk melihat gambaran dan mendeskripsikan morfologi enterosit serta bakteri *Shigella sonnei* yang menempel pada enterosit. Kaca slide diberi cairan kristal violet dan didiamkan selama 20 detik kemudian dibilas dengan air. Setelah itu diberikan garam iodine dan didiamkan selama 1 menit, kemudian diikuti dengan pembilasan slide menggunakan 95% Ethyl alkohol yang didiamkan terlebih dahulu selama 5 detik yang selanjutnya dibilas dengan air. Selanjutnya diberi safranin dan didiamkan 20 detik setelah itu dibilas dengan air lagi. Slide dikeringkan dan diobservasi menggunakan mikroskop dengan pembesaran total 1000 kali.

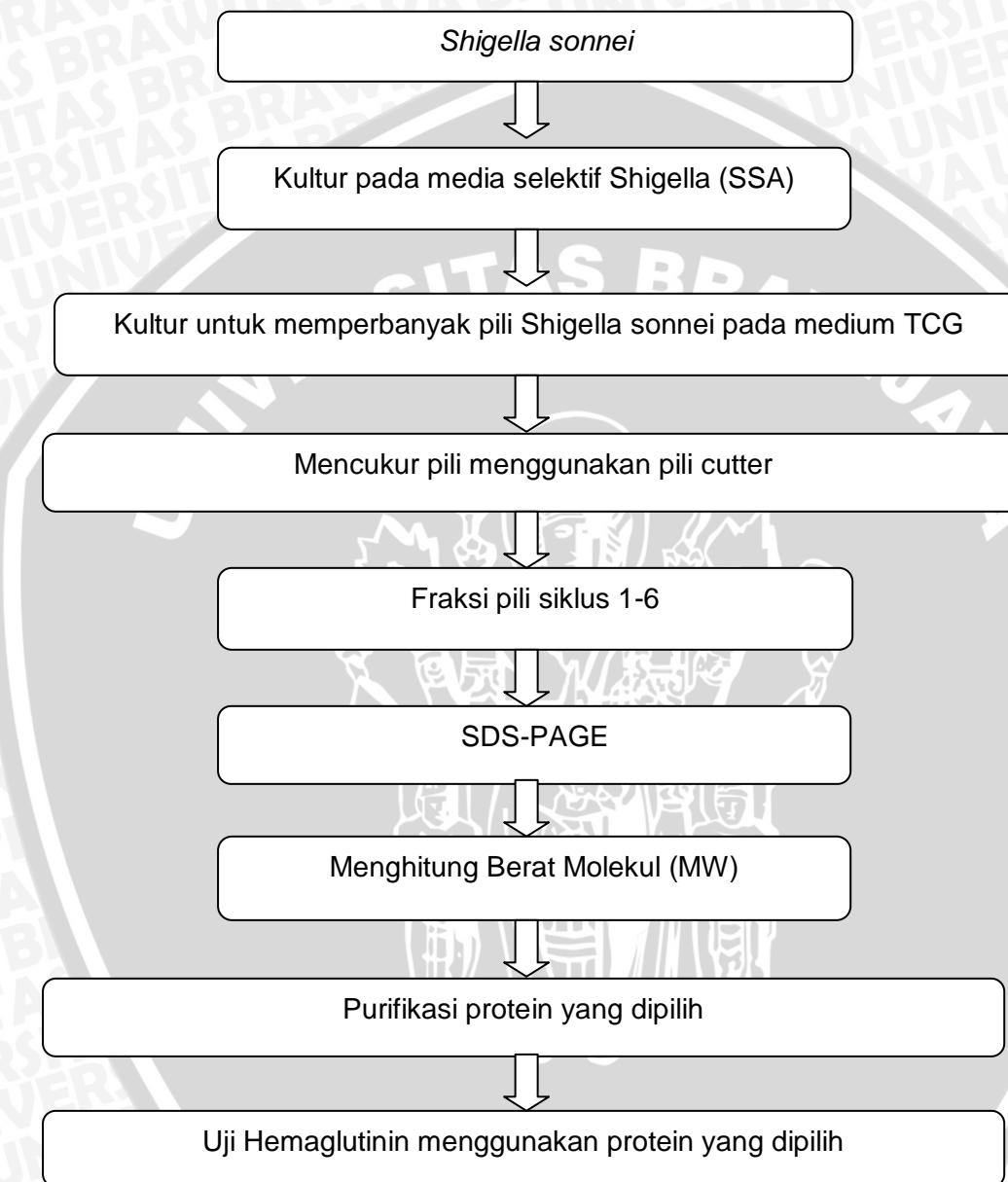
4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh untuk uji statistik adalah data indeks adhesi bakteri *Shigella sonnei* pada enterosit mencit. Dari data pengamatan dan pengukuran dianalisa dengan analisis statistik korelasi dan regresi.



4.9 Skema Operasional Penelitian

4.9.1 Skema Penelitian Eksploratif



4.9.2 Skema Penelitian Eksperimental

Produksi protein yang dipilih dengan SDS-PAGE



Isolasi protein pili *Shigella sonnei*



Preparasi enterosit mencit



Uji hambat adhesi pada enterosit



Pengecatan Gram



Menghitung laju index Adhesi

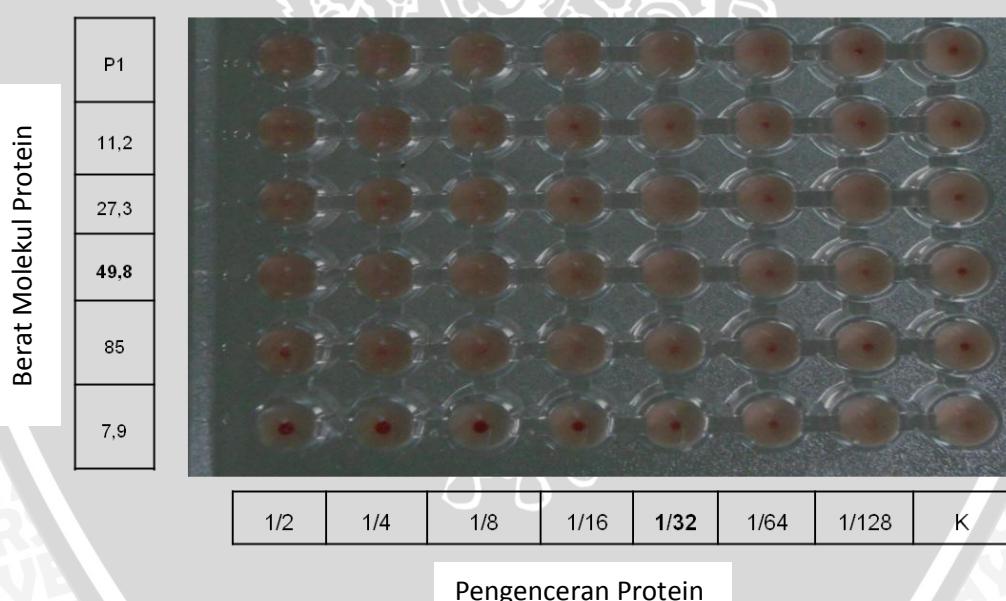


BAB 5

Hasil dan Analisis

5.1 Uji Hemaglutinin

Berdasarkan hasil hemaglutinasi pada protein dengan BM 7,9 kDa, 11,2 kDa, 27,3 kDa, 49,8 kDa dan 85 kDa didapatkan hasil bahwa empat dari lima protein pili *S. sonnei* yang diujikan merupakan protein hemagluninin dengan aglutinasi terbaik oleh protein dengan BM 49,8 kDa, dimana aglutinat terbentuk dengan titer 1/32, dengan demikian protein pili *S. sonnei* 49,8 kDa disebut sebagai protein hemaglutinin.

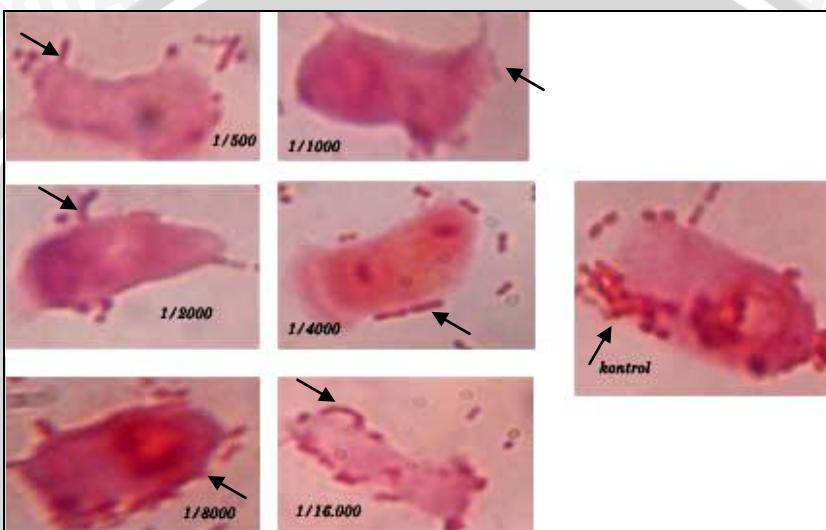


Gambar 5.1 Hasil Uji Hemaglutinin Protein Sub-Unit Pili *S. sonnei*

5.2 Uji Hambat Adhesi dengan Dose Respons

Uji hambat adhesi ini menunjukkan bahwa protein sub-unit pili BM 49,8 kDa *S. sonnei* dapat menghambat perlekatan bakteri ke enterosit sehingga dapat membuktikan bahwa protein hemaglutinin sub-unit pili BM 49,8 kDa *S. sonnei*

yang digunakan adalah molekul adhesin. Metode uji hambat adhesi menggunakan berbagai dosis pengenceran protein sub-unit pili BM 49,8 kDa mulai 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000 dan 0 (kontrol) menunjukkan konsentrasi protein yang semakin menurun dengan semakin besar pengenceran.



Gambar 5.2 Hasil Uji Hambat Adhesi Protein Sub-Unit Pili BM 49,8 kDa *Shigella sonnei*. Tanda panah menunjukkan bakteri yang menempel pada enterosit.

Indeks adhesi ditentukan dengan cara menghitung jumlah bakteri yang melekat pada 100 enterosit. Berdasarkan pengamatan terhadap uji hambatan adhesi *S. sonnei* yang disalut dengan protein hemagglutinin sub-unit pili BM 49,8 kDa *S. sonnei* terlihat bahwa pada pengenceran 1/500, protein hemagglutinin sub-unit pili BM 49,8 kDa, bakteri yang menempel pada enterosit sangat sedikit dibandingkan dengan pengenceran yang lain. Semakin besar perbandingan pengenceran, bakteri yang menempel terlihat semakin banyak. Pada kontrol negatif, tampak banyak bakteri yang menempel pada enterosit. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian protein berpengaruh pada jumlah bakteri yang menempel pada enterosit. Semakin rendah dosis protein hemagglutinin sub-unit

pili BM 49,8 kDa *S. sonnei* yang diberikan maka akan meningkatkan jumlah bakteri yang menempel sehingga nilai indeks adhesi juga akan meningkat.

Tabel 5.1 Jumlah Bakteri *Shigella sonnei* yang Melekat pada Enterosit Setelah Dipapar dengan Protein Hemagglutinin Sub-Unit Pili BM 49,8 kDa *S. sonnei*

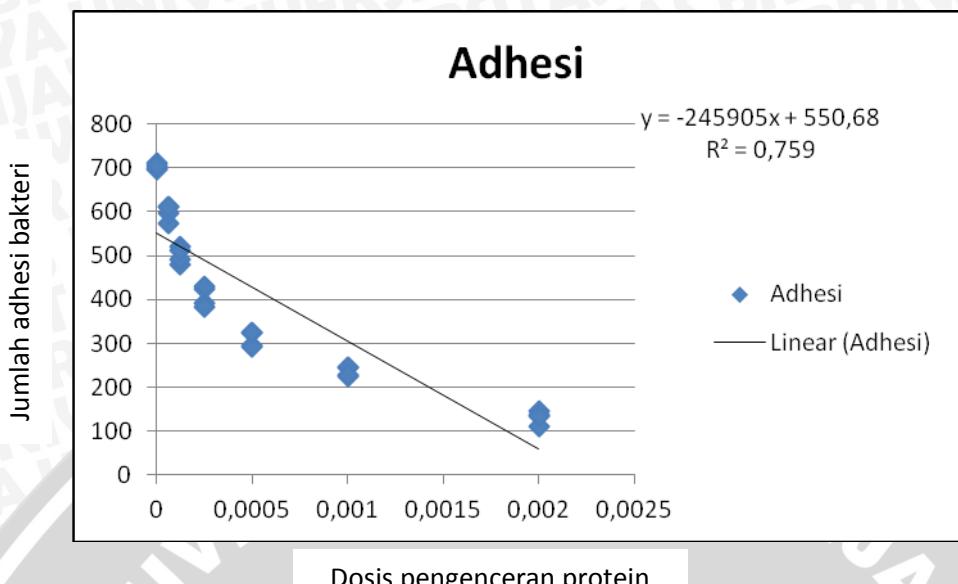
Kelompok Pengenceran protein	Jumlah Pengulangan (n)	Total	Rerata/100 enterosit	Nilai p
1/500	4	530	132,5 ^a	
1/1000	4	943	235,75 ^b	
1/2000	4	1237	309,25 ^c	
1/4000	4	1627	406,75 ^d	0,000
1/8000	4	2005	501,25 ^e	
1/16000	4	2394	598,5 ^f	
Kontrol (0)	4	2810	702,5 ^g	

Keterangan tabel: nilai p > 0,05 tidak ada perbedaan yang bermakna, nilai p < 0,05 ada perbedaan bermakna pada tiap kelompok perlakuan (analisis *post hoc Mann-Whitney*). Pada setiap kelompok jika pada kolom rerata memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna dan bila memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna. Nilai p menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) pada perlakuan dosis terhadap jumlah perlekatan bakteri pada enterosit.

Hasil analisis *Kruskal-Wallis* (lampiran) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada tiap perlakuan dosis terhadap indeks adhesi ($p = 0,000$; tingkat kepercayaan 95%). Oleh karena hasil *Kruskal-Wallis* menunjukkan ada perbedaan yang bermakna maka analisis dilanjutkan dengan uji *post hoc* dengan menggunakan *Mann-Whitney*.

Hasil analisis perbandingan masing-masing perlakuan melalui uji *post hoc* menggunakan metode *Mann-Whitney*, menunjukkan bahwa semua dosis pengenceran memberikan hasil yang berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan tingkat kepercayaan 95%.





Gambar 5.3 Diagram Indeks Adhesi

Secara umum pemberian protein hemagglutinin sub-unit pili BM 49,8 kDa *S.sonnei* menurunkan indeks adhesi. Terdapat hubungan yang erat dan pengaruh yang bermakna dari perlakuan dosis protein hemagglutinin sub-unit pili 49,8 kDa *S. sonnei* terhadap nilai indeks adhesi yang ditunjukkan dengan koefisien korelasi Pearson (r) sebesar -0,871, nilai $p = 0, 000$; R square 0,759; nilai $p = 0, 000$.

BAB 6

Pembahasan

Bakteri *Shigella* menginvasi dan membuat koloni pada epitel usus manusia, yang kemudian menyebabkan teraktivasinya respon inflamasi akut. Respon inflamasi akut terjadi karena bakteri yang menembus mukosa usus manusia melalui sel M kemudian menginvasi jaringan epitel usus dan menyebabkan diproduksinya mediator-mediator proinflamasi sebagai akibat dari kerusakan jaringan, seperti interleukin 8, yang memiliki peranan penting dalam menginduksi terjadinya proses inflamasi akut yang berat (Torres, 2004).

Bakteri gram negatif mempunyai pili pada permukaan tubuhnya. Pili tersusun atas subunit protein struktural yang disebut pilin. Protein minor, yang terletak pada ujung pili, menyebabkan bakteri dapat melekat pada sel lain (Brooks *et al.*, 2007). Invasi bakteri *Shigella* pada epitel usus bisa jadi diperantara oleh pili yang ada pada permukaan dinding bakteri, mengingat bahwa bakteri *Shigella sonnei* termasuk kedalam kelompok bakteri gram negatif, sehingga bakteri dapat menempel dan membuat koloni pada epitel usus yang akhirnya akan menimbulkan manifestasi klinis pada penderita. Untuk mengkonfirmasi hal tersebut diperlukan adanya pembuktian bahwa protein sub-unit pili bakteri *Shigella sonnei* merupakan molekul adhesin dari bakteri.

Langkah awal penelitian dilakukan identifikasi protein sub-unit pili yang dicurigai sebagai molekul adhesin tersebut, dengan melakukan pemotongan pili dan melakukan profiling dengan SDS-PAGE, selanjutnya untuk menentukan berat molekul protein yang bersifat adhesin maka dilakukan uji hemaglutinin pada beberapa protein yang dicurigai sebagai molekul adhesin tersebut, yaitu



protein dengan BM 7,9 kDa, 11,2 kDa, 27,3 kDa, 49,8 kDa dan 85 kDa. Uji hemaglutinin bertujuan untuk mendapatkan protein hemaglutinin, dan protein hemaglutinin pada umumnya adalah protein adhesin. Seperti penelitian lain dinyatakan bahwa kandidat vaksin *Vibrio cholerae* dari molekul adhesin protein sub-unit pili 37,8 kDa *V. Cholerae* bersifat hemaglutinin (Sumarno dkk., 2011). Selain itu, menurut Nakasone dan Iwagana (1990) protein hemaglutinin sub unit pili yang merupakan faktor kolonisasi ditemukan pada *B. Pertussis* (200 kDa), *V. Parahaemolyticus* (17 kDa), dan *E. Coli* (15, 16, dan 16,8 kDa).

Dari uji hemaglutinin pada beberapa protein pili *S. sonnei* dengan eritrosit mencit didapatkan hasil protein pili *S. sonnei* dengan aglutinasi terbaik oleh protein dengan BM 49 kDa, dimana aglutinat terbentuk hingga titer 1/32, dengan demikian protein pili *S. sonnei* 49 kDa disebut sebagai protein hemaglutinin.

Berdasarkan uji hemaglutinin tersebut dipilih protein dengan BM 49,8 kDa yang kemudian dilakukan uji hambat adhesi untuk membuktikan apakah protein hemaglutinin sub-unit pili BM 49,8 kDa *S. sonnei* adalah molekul adhesin dan membuktikan kemampuannya dalam menghambat adhesi *S. sonnei* ke enterosit mencit. Metode uji hambat adhesi ini menggunakan beberapa dosis pengenceran protein hemaglutinin sub-unit pili 49,8 kDa.

Hasil analisis uji hambat adhesi menggunakan metode *Kruskal Wallis* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada perlakuan dosis terhadap indeks adhesi ($p=0,000$), yang tampak dengan semakin besar dosis protein hemaglutinin sub-unit pili BM 49,8 kDa *S. sonnei* maka semakin menurun indeks adhesi. Selain itu terdapat hubungan yang erat dan pengaruh yang bermakna dari perlakuan dosis protein terhadap nilai indeks adhesi yang ditunjukkan dengan koefisien korelasi Pearson(r) sebesar -0,871, nilai $p = 0,000$;



R square 0,75; nilai p = 0, 000. Hasil menunjukkan bahwa protein hemaglutinin sub-unit pili BM 49,8 kDa *S. sonnei* dapat menghambat adhesi bakteri *S. sonnei* pada enterosit mencit. Hal ini sesuai dengan temuan Hahn *et al.* (2002) dengan menggunakan mikroskop elektron dapat menunjukkan bahwa pili bakteri merupakan organela adhesin. Selain itu juga dikemukakan bahwa protein hemaglutinin berperan penting dalam inisiasi dan perlembangan gejala klinis serta komplikasi dalam *Shigellosis* (Gbarah *et al.*, 1993; Snelling *et al.*, 1997). Sehingga penghambatan perlekatan bakteri dapat terjadi karena protein hemaglutinin sub- unit pili BM 49,8 kDa telah tersalut pada reseptor yang sesuai dienterosit, sehingga bakteri yang membutuhkan reseptor yang sama untuk melekat tidak dapat melekat jika reseptor tersebut sudah ditempati oleh protein adhesin tersebut.

BAB 7

Kesimpulan dan Saran

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil dan pembahasan penelitian dapat disimpulkan bahwa:

Protein hemaglutinin sub-unit pili BM 49,8 kDa *S. sonnei* adalah molekul adhesin yang ditunjukkan dengan kemampuannya menghambat adhesi bakteri *S. sonnei* dan dibuktikan melalui uji hambat adhesi bakteri *Shigella sonnei* pada enterosit mencit.

7.2 Saran

Diperlukan penelitian lanjutan mengenai:

- 1) Korelasi antara protein sub-unit pili 49,8 kDa *S. sonnei* dengan *Shigella spp.* yang lain
- 2) Respon imun terhadap protein sub-unit pili 49,8 kDa *S. sonnei* dengan menggunakan metode monoklonal protein 49,8 kDa *S. sonnei*



Daftar Pustaka

- Anam, Khoirul. 2012. *Identifikasi Protein Hemaglutinin Sub Unit Pili 49,8 kDa dan Anti Hemaglutinin 7,9 kDa serta Uji Respon Imun Reaksi Silang Shigella spp.* Tesis. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang
- Arai, A., Nakano, T., Katayama, Y., Aoki, H., Hirayama, T., Ooi, Y., Eda, J., Imura, S., Kashigawi, E., Sano, K. *Epidemiological Evidence of Multidrug-Resistant Shigella sonnei Colonization in India by Sentinel Surveillance in a Japannese Quarantine Station.* J.J.A. Infection D, 2008, 82: 3222-327
- Brooks, G F., Janet, S B. dan Stephen, A . 2004. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz Melnick dan Adelberg, Edisi 2.* Hartanto H, Rachman C, Dimanti A, Diani A (penterjemah). 2007. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Faisal, Sumarno dan Kusworini, H. *Pengaruh Susu Kuda Sumbawa Terfermentasi pada Potensi Protein Adhesi 37,8 kDa Vibrio cholerae O1 di konjugasi CTB terhadap Respon s-IgA dan Sekresi Cairan Usus Mencit.* Tesis. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang
- Fauci, A. S., Kasper, D. L., Longo, D. L., Braunwald, E., Hauser, S. L., Jameson, J. L., Loscalzo, J. 2008. *Harrison's Principles of Internal Medicine 17th Ed.* America: McGraw-Hill
- Fauci, A. S., Kasper, D. L., Longo, D. L., Braunwald, E., Hauser, S. L., Jameson, J. L., Loscalzo, J. 2009. *Harrison's Manual of Medicine 17th Ed.* America: McGraw-Hill
- Gbarah, A., Mirelman, D., Sansonetti, P. J., Verdon, R., Bernhard, W., Sharon, N. 1993. *Shigella flexneri Transformants Expressing Type 1 (mannose-specific) Fimbriae Bind to, Activate, and are Killed by Phagocytic Cells.* Infect Immun 61 (5): 1687-93
- Hahn, E., Wild, P., Hermanns, U., Sebbel, P., Glockshuber, R., Haner, M., Tashcher, N., Burkhard, P., Aebi, U., Muller, S. A. *Exploring 3D Molecular Architecture of Eschericia coli type 1 Pili.* J. Mol. Biol, 2002, 323: 845-857
- Isselbacher, K. J., Braunwald, E., Wilson, J. D., Martin, J. B., Fausi, A. S., Kasper, D. L. 1995. *Harrison Prinsip-prinsip Ilmu Penyakit Dalam, Edisi 1.* Asdie A H (penterjemah). 1999. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC



- Junqueira, L C., Carneiro, J. 2002. *Histologi Dasar Teks dan Atlas, Edisi 10.* Tambayong, Jan(penterjemah). 2007. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Katzung, B G. 1995. *Farmakologi Dasar dan Klinik. Edisi VI.* Agoes, Azwar dkk. (penterjemah). 1997. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Lindquist, BO L, Lebenthal, E, Lee, P C, Stinson, M W, Merrick, J M. *Adherence of Salmonella typhimurium to Small-Intestinal Enterocytes of the Rat. Infection and Immunity*, 1987, 55(12): 3044-3050
- Madigan, M T, Martinko, J M, Dunlap, P V, Clark, D P. 2009. *Biology of Microorganisms, 12th Ed.* San Fransisco: Pearson Benjamin Cummings
- Niyogi, S K. *Shigellosis.* The Journal of Microbiology, 2005, 43(2): 133-143
- Oyofo, B. A., Subekti, D., Tjaniadi, P., Corwin, A. L., Larasati, W., Maidy, P., Simanjuntak, A. H., Punjabi, N. H., Taslim, J., Setiawan, B., Djalantik, A. G. S., Sriwati, L., Sumardiati, A., Putra, E., Campbell, A. R., Lesmana, M. *Shigella spp. Surveillance in Indonesia: the Emergence or Reemergence of S. dysenteriae.* Emerging Infectious Diseases, 2001, 7(1): 137-140
- Prabowo, Avanita. 2011. *Partial Characterization of Adhesins Pili on Shigella Dysenteriae.* Tesis. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang
- Seidlein, L. Kim, D. R., Ali, M., Lee, H., Wang, X. Y., Thiem, V. D., Canh, D. G., Chaicumpa, W., Agtini, M. D., Hossain, A., Bhutta, Z. A., Mason, C., Sethabutr, O., Talukder, K., Nair, G. B., Deen, J. L., Kotloff, K., Clemens, J. *A Multicentre Study of Shigella Diarrhoea in Six Asian Countries: Disease Burden, Clinical Manifestations, and Microbiology.* Plos Medicine, 2006, 3(9): 1556-1569
- Snelling, N.J., Tall, B. D., Venkatesan, M. M. 1997. Characterization of Shigella Type 1 Fimbriae: Expression, FimA Sequence, and Phase Variation. *Infection and Immunity*, p. 2462-2467
- Sumarno, Susanto, Ismanoe, Winarsih dan Yudani. 2011. *Combination of Protein Sub-Unit PILI 37,8 kDa V. Cholerae with Cholerae Toxin Sub-Unit B V. Cholerae Can Protect Come Out of The Solution in The Intestinal Mice.* J. Pharm. Biomed. Sci.
- Torres, A G. *Current Aspects of Shigella Pathogenesis.* Revista Latinoamericana de Microbiologia, 2005, 46(3-4): 89-97



Umar, Z., Sagala, K H., Ginting, J. 2004. *Diare Akut Disebabkan Bakteri.* (online), <http://library.usu.ac.id/download/fk/penyadlam-umar4.pdf>, diakses 1 Desember 2011

WHO. 2009. *Diarrhoeal Diseases(Updated Februari 2009).* www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index6.html

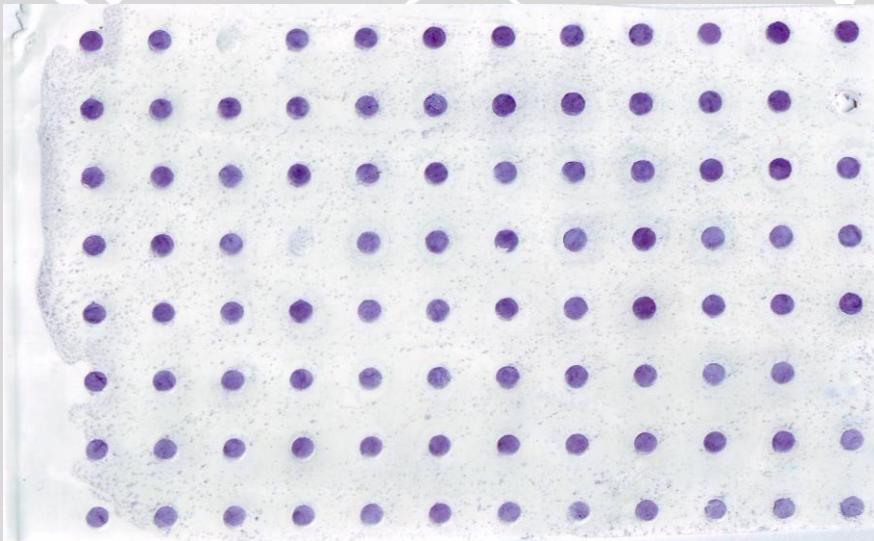
Wu, X. R., Sun, T. T., Medina, J. J. 1996. In Vitro Binding of Type 1 Fimbriated E. Coli to Uroplakin Ia and Ib: Relation to Urinary Trac Infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:685-692



Lampiran 1

Chequeboard dengan Metode Dot Blot

		ANTIGEN (PROTEIN 49 kDa)											
		1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
A N T I B O D I	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
	1/12800	13662	14513	14370	13660	14982	13025	14597	15492	13759	15753	15291	15144





Lampiran 2

Uji Biokimia dari Labkesda Jawa Timur

FROM : BALAI BESAR LABKES SBY FAX NO. : 0315020388 Oct. 13 2011 10:15 P1

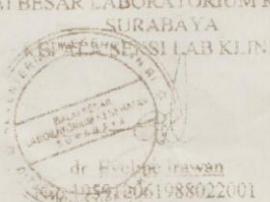
KEMENTERIAN KESEHATAN
DIREKTORAT JENDERAL BINA PELAYANAN MEDIK
BALAI BESAR LABORATORIUM Kesehatan SURABAYA
Jalan Karangmengkasan No. 18, Surabaya - 60286
Telepon Pelayanan : (031) 5020306, TU : (031) 502145, Faksimili : (031) 5020388
Website : bblksurabaya.com, Surat elektronik : bblksuby@yahoo.co.id

Surabaya, 12 Oktober 2011

Hasil Uji Biokimia terhadap bakteri :

- Shigella flexneri
- Shigella sonnei
- Shigella boydii
- Shigella dysenteriae

No	Macam-macam media	Shigella flexneri	Shigella sonnei	Shigella boydii	Shigella dysenteriae
1.	Glikose	Pos	Pos	Pos	Pos
2.	Laktose	Neg	Pos	Neg	Neg
3.	Mahose	Neg	Pos	Neg	Neg
4.	Indol	Pos	Neg	Neg	Neg
5.	M.R.	Pos	Pos	Pos	Pos
6.	Lysine	Neg	Neg	Neg	Neg
7.	Simon sirirat	Neg	Neg	Neg	Neg
8.	Motility	Neg	Neg	Neg	Neg
9.	Urea	Neg	Neg	Neg	Neg
10.	Ornitin	Neg	Pos	Neg	Neg
11.	Pengecatan gram	Gram neg batang	Gram neg batang	Gram neg batang	Gram neg batang

BALAI BESAR LABORATORIUM KESEHATAN
SURABAYA
BALAI BESAR KESI LAB KLINIK

dr. Eviyati Irawan
081315020388022001

Lampiran 3

Hasil Analisis Statistik

Kruskal-Wallis Test

Ranks

Protein	N	Mean Rank
Adhesi Titer 1/500	4	2,50
Titer 1/1000	4	6,50
Titer 1/2000	4	10,50
Titer 1/4000	4	14,50
Titer 1/8000	4	18,50
Titer 1/16000	4	22,50
Kontrol	4	26,50
Total	28	

Test Statistics^{a,b}

	Adhesi
Chi-Square	26,490
df	6
Asy mp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Protein

Post Hoc Tests

Mann-Whitney Test

1. Kontrol >< Titer 1/16000

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi Titer 1/16000	4	2,50	10,00
Kontrol	4	6,50	
Total	8		26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein

2. Kontrol >< Titer 1/8000

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi Titer 1/8000	4	2,50	10,00
Kontrol	4	6,50	
Total	8		26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein



3. Kontrol >< Titer 1/4000

Ranks

	Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/4000	4	2,50	10,00
	Kontrol	4	6,50	26,00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein

4. Kontrol >< Titer 1/2000

Ranks

	Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/2000	4	2,50	10,00
	Kontrol	4	6,50	26,00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein



5. Kontrol >< Titer 1/1000

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi Titer 1/1000	4	2,50	10,00
Kontrol	4	6,50	26,00
Total	8		

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,323
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein

6. Kontrol >< Titer 1/500

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi Titer 1/500	4	2,50	10,00
Kontrol	4	6,50	26,00
Total	8		

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein



7. Titer 1/16000 <> Titer 1/8000

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/8000	4	2,50
	Titer 1/16000	4	6,50
	Total	8	26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein

8. Titer 1/16000 <> Titer 1/4000

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/4000	4	2,50
	Titer 1/16000	4	6,50
	Total	8	26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein



9. Titer 1/16000 >< Titer 1/2000

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/2000	4	2,50
	Titer 1/16000	4	6,50
	Total	8	26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein

10. Titer 1/16000 >< Titer 1/1000

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/1000	4	2,50
	Titer 1/16000	4	6,50
	Total	8	26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,323
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein



11. Titer 1/16000 <> Titer 1/500

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/500	4	2,50
	Titer 1/16000	4	6,50
	Total	8	26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein

12. Titer 1/8000 <> Titer 1/4000

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/4000	4	2,50
	Titer 1/8000	4	6,50
	Total	8	26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein



13. Titer 1/8000 <> Titer 1/2000

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/2000	4	2,50
	Titer 1/8000	4	6,50
	Total	8	26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein

14. Titer 1/8000 <> Titer 1/1000

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/1000	4	2,50
	Titer 1/8000	4	6,50
	Total	8	26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,323
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein



15. Titer 1/8000 <> Titer 1/500

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/500	4	2,50
	Titer 1/8000	4	6,50
	Total	8	26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein

16. Titer 1/4000 <> Titer 1/2000

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/2000	4	2,50
	Titer 1/4000	4	6,50
	Total	8	26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein



17. Titer 1/4000 <> Titer 1/1000

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/1000	4	2,50
	Titer 1/4000	4	6,50
	Total	8	26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,323
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein

18. Titer 1/4000 <> Titer 1/500

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/500	4	2,50
	Titer 1/4000	4	6,50
	Total	8	26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein



19. Titer 1/2000 >< Titer 1/1000

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/1000	4	2,50
	Titer 1/2000	4	6,50
	Total	8	26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,323
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein

20. Titer 1/2000 >< Titer 1/500

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/500	4	2,50
	Titer 1/2000	4	6,50
	Total	8	26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein



21. Titer 1/1000 <> Titer 1/500

Ranks

Protein	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhesi	Titer 1/500	4	2,50
	Titer 1/1000	4	6,50
	Total	8	26,00

Test Statistics^b

	Adhesi
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,323
Asy mp. Sig. (2-tailed)	,020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Protein

Rangkuman Uji Post Hoc

Perlakuan	Nilai P	Kesimpulan ($\alpha = 0,05$)
Kontrol (0)	1/16000	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
	1/8000	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
	1/4000	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
	1/2000	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
	1/1000	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
	1/500	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
1/16000	1/8000	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
	1/4000	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
	1/2000	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
	1/1000	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
	1/500	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
1/8000	1/4000	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
	1/2000	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
	1/1000	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
	1/500	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
1/4000	1/2000	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
	1/1000	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
	1/500	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
1/2000	1/1000	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
	1/500	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan
1/1000	1/500	Berbeda bermakna antar kelompok perlakuan



Correlations

Correlations

		Protein	Adhesi
Protein	Pearson Correlation	1	-,871**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	28	28
Adhesi	Pearson Correlation	-,871**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	28	28

**. Correlation is significant at the 0.01 level

Regression

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
Adhesi	412,3571	191,80936	28
Protein	*****	,0006795628	28

Correlations

		Adhesi	Protein
Pearson Correlation	Adhesi	1,000	-,871
	Protein	-,871	1,000
Sig. (1-tailed)	Adhesi	.	,000
	Protein	,000	.
N	Adhesi	28	28
	Protein	28	28

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Change Statistics				
					R Square Change	F Change	df 1	df 2	Sig. F Change
1	,871 ^a	,759	,750	95,95225	,759	81,893	1	26	,000

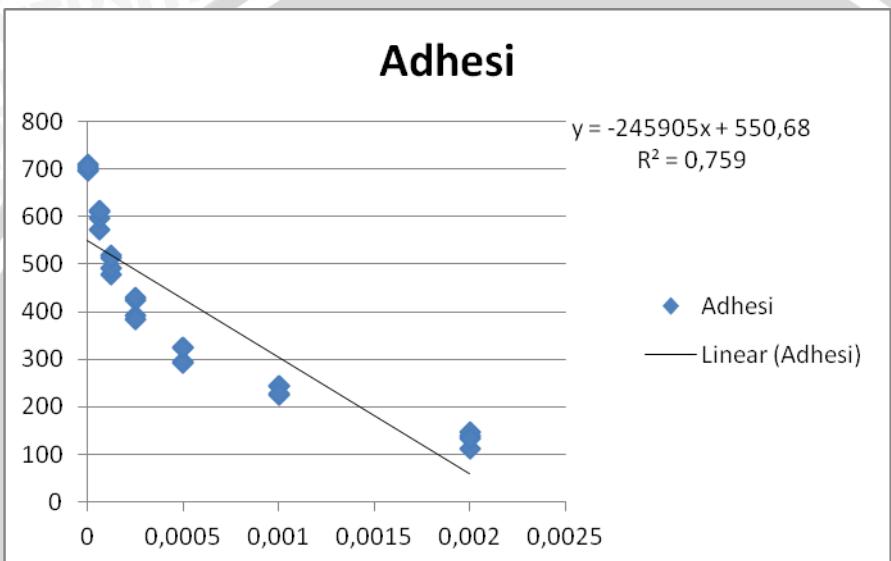
a. Predictors: (Constant), Protein



Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients		Beta	t	Sig.	Correlations		
	B	Std. Error				Zero-order	Partial	Part
1	(Constant) 550,679	23,716		23,220	,000			
	Protein -245905	27173,383	-,871	-9,049	,000	-,871	-,871	-,871

a. Dependent Variable: Adhesi

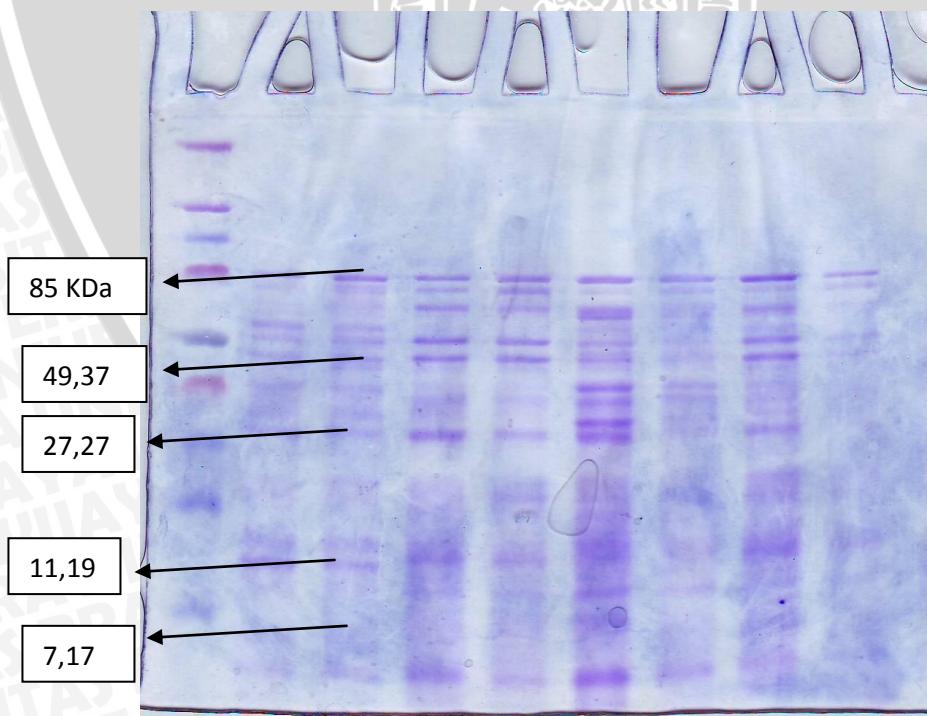


Lampiran 4

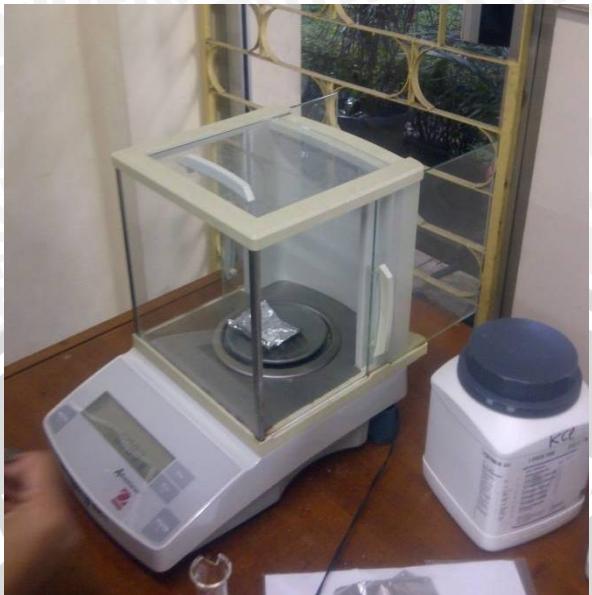
Dokumentasi Penelitian



Gambar 1. Strain Bakteri *Shigella* sp.



Gambar 2.
Shigella spp.

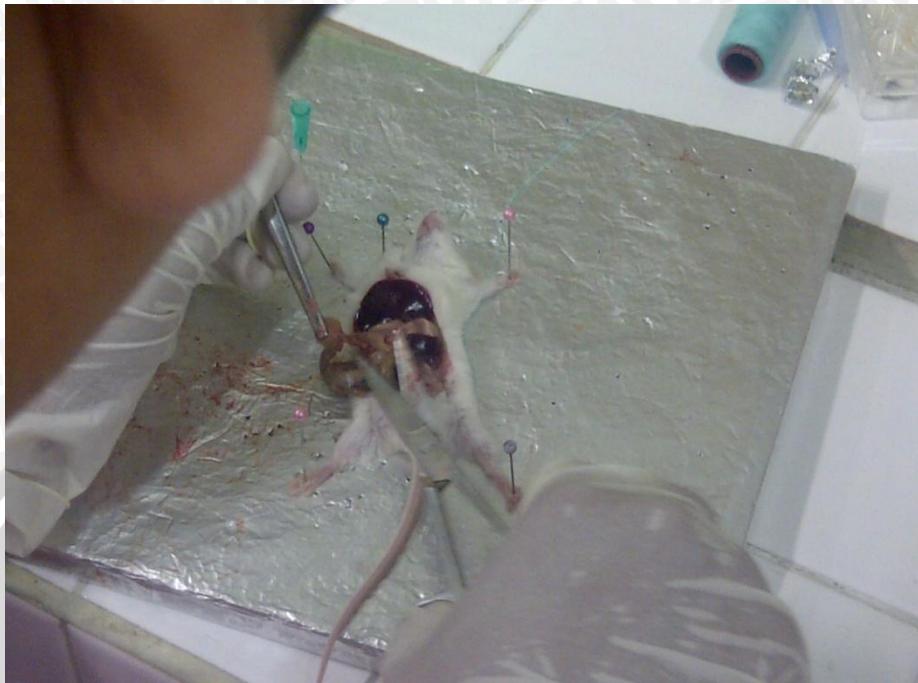


Profil protein

Gambar 3. Penimbangan Bahan Larutan A, B dan C



Gambar 4. Pengaturan pH Larutan



Gambar 5. Pembedahan Mencit



Gambar 6. Washing



Gambar 7. Sentrifugasi

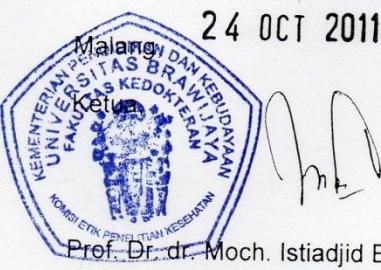


Gambar 9. Bahan Pengecatan Gram



Gambar 10. Hasil Pengecatan Gram Preparat

Lampiran 5**Surat Keterangan Kelaikan Etik**

	KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL MINISTRY OF NATIONAL EDUCATION FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MEDICAL FACULTY BRAWIJAYA UNIVERSITY KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH Jalan Veteran Malang – 65145 Telp. (0341) 5516111 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755 e-mail : kepk.fkub@gmail.com http://fk.brawijaya.ac.id
KETERANGAN KELAIKAN ETIK ("ETHICAL CLEARANCE")	
No. 0255 / EC / KEPK – S2- JK / 10 / 2011	
<p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN</p> <p>JUDUL : RESPON IMUN sIgA MOLEKUL ADHESIN SHIGELLA DYSENTERIAE 7,9 kDa dan 49,8 kDa TERHADAP SEKRESI CAIRAN USUS MENCIT</p> <p>PENELITI UTAMA : YULIAN WIJI UTAMI, SKp., M.Kes</p> <p>UNIT/ LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN :</p> <ul style="list-style-type: none"> - LABORATORIUM MIKROBIOLOGI FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG - LABORATORIUM BIOMEDIK FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG - LABORATORIUM BIOLOGI MOLEKULER FAKULTAS MIPA UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG <p>DINYATAKAN LAIK ETIK</p> <p style="text-align: right;">24 OCT 2011'</p> <div style="text-align: center;">  Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS, M.Hum </div>	



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Laela Fitriana
NIM : 0910711011
Program Studi : Program Studi Pendidikan Dokter
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya,

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan tulisan atau pikiran orang lain yang sayaaku 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, 10 November 2012

Yang membuat pernyataan,

Laela Fitriana

NIM. 0910711011

