PENGARUH ANTIBODI MOLEKUL ADHESIN 37,8 KDA SUB UNIT PILI *Vibrio cholerae* TERHADAP EFEK AGLUTINASI MOLEKUL ADHESIN *Shigella flexneri*

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran

Oleh:

Safira Nur Alita Putri

155070101111084

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PENGARUH ANTIBODI MOLEKUL ADHESIN 37,8 KDA SUB UNIT PILI *Vibrio cholerae* TERHADAP EFEK AGLUTINASI MOLEKUL ADHESIN *Shigella flexneri*

Oleh :

Safira Nur Alita Putri
NIM. 155070101111084

Telah diuji pada
Hari : Kamis
Tanggal :15 November 2018
Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

Dr. dr. Seskoati Prayitnaningsih, Sp.M(K)
NIP. 196810232005012001

Pembimbing I/Penguji II,

Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, Sp. MK(K)
NIP. 194807061980021001

Pembimbing II/Penguji III

dr.Prasetya Ismail P., Sp.A, M.Biomed
NIP. 198110082012121001

Mengetahui
Ketua Program Studi Kedokteran

dr. Tjiwahju Astuti, M.Kes, Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001

Scanned by CamScanner

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Safira Nur Alita Putri

NIM : 155070101111084

Program Studi : Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini adalah hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 15 November 2018

Yang membuat pernyataan,

Safira Nur Alita Putri

NIM. 155070101111084

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kepada Allah SWT karena hanya dengan berkat dan karuniaNya penulis mampu menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul "Pengaruh Antibodi Molekul Adhesin 37,8 kDa Sub Unit Pili V*ibrio cholerae* Terhadap Efek Aglutinasi Molekul Adhesin *Shigella flexneri"***.** Dengan terselesainya Tugas Akhir ini penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. **Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes.,** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. **dr. Triwahju Astuti, M.Kes.,Sp.P(K).,** selaku Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. **Prof. Dr. dr. Sumarno, Sp.MK(K).,** selaku dosen pembimbing I yang membantu dalam memberi arahan dan koreksi yang sistematis.
4. **dr. Prasetya Ismail Permadi, Sp.A, M.Biomed.,** selaku dosen pembimbing II yang memberikan masukan dan koreksi yang sistematis.
5. **Dr. dr. Seskoati Prayitnaningsih, Sp.M(K).,** selaku penguji yang bersedia meluangkan waktu untuk menguji serta memberi masukan dan koreksi kepada penulis.
6. **Pak Slamet, Pak Ali, dan Bu Uci** selaku analis Mikrobiologi yang membantu penulis dalam penelitian dan memberikan solusi dari masalah yang dihadapi peneliti dalam menyelesaikan Tugas Akhir.

7. Kedua orang tua saya yang saya sayangi. **Taufik** dan **Lise Marlina,** atas doa yang tidak pernah putus, limpahan kasih sayang dan motivasi yang telah diberikan sejak saya kecil hingga saat ini.
8. Teman-teman seperjuangan saya, kelas **PD-B 2015** yang senantiasa mengisi hari-hari perkuliahan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya baik dalam suka maupun duka.
9. Teman seperjuangan dalam menyelesaikan Tugas Akhir yang saya banggakan, **Dea Anindhita.**
10. Sahabat-sahabat yang tidak ada hentinya memberikan semangat dan bantuan selama pengerjaan tugas akhir, **Virginia** dan **Dwiky**.
11. Teman-teman PSDM Lakesma 2017 yang selalu menyemangati saya, **Raras,Chori, Vita, Andy, Abdullah, Desy, Martin, dan Salis.**
12. Dan semua pihak yang telah membantu menyelesaikan tugas akhir ini yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa Tugas Akhir ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis membuka diri untuk segala kritik dan saran. Semoga Tugas Akhir ini bermanfaat bagi pembaca khususnya profesi di bidang kesehatan.

Malang, 15 November 2018

Penulis

ABSTRAK

Putri, Safira N. A. 2018. **PENGARUH ANTIBODI MOLEKUL ADHESIN 37,8 KDA SUB UNIT PILI *Vibrio cholerae* TERHADAP EFEK AGLUTINASI PROTEIN ADHESIN *Shigella flexneri.*** Tugas akhir, Program Studi S1 Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, Sp. MK(K). (2) dr. Prasetya Ismail Permadi, Sp. A, M.Biomed

Diare merupakan penyakit nomor dua yang paling banyak menyebabkan kematian pada anak usia di bawah lima tahun. *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri* merupakan salah satu agen penyebab diare yang banyak ditemukan. Vaksinasi merupakan salah satu cara yang paling efektif untuk eradikasi penyakit infeksi. Saat ini terdapat vaksin berbahan dasar *whole cell* yang dapat mengeradikasi penyakit infeksi diare. Oleh sebab itu diperlukan alternatif kandidat vaksin yang lain. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek hemaglutinasi protein adhesin *Shigella flexneri* setelah diberikan antibodi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholera.* Penelitian ini merupakan eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vitro*.

Sampel yang digunakandalam penelitian ini adalah molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae.* Antigen yang digunakan adalah molekul adhesnin *Shigella flexneri.* Metode yang digunakan adalah uji anti hemaglutinasi.

Didapatkan hasil bahwa titer tertinggi anti hemaglutinasi Antibodi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* adalah 1/64. Hal ini menandakan bahwa antibodi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dapat menghambat efek aglutinasi pada protein adhesin *Shigella flexneri*.

Kata Kunci: *Vibrio cholerae, Shigella flexneri,* Protein Adhesin, Hemaglutinasi, Antibodi.

ABSTRACT

Putri, Safira N. A. 2018. **THE EFFECT OF ANTIBODY MOLECULE ADHESIN 37.8 KDA SUBUNIT PILI *Vibrio cholera* ON THE AGLUTINATION EFFECTS OF ADHESIN PROTEIN *Shigella flexneri.*** Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, Sp. MK(K). (2) dr. Prasetya Ismail Permadi, Sp. A, M.Biomed

Diarrhea is the two disease that causes death in children under five years of age. Vibrio cholerae and Shigella flexneri are among the most common agents of diarrhea. Vaccination is one of the most effective ways to eradicate infectious diseases. Nowadays, there is a vaccine with whole cell ingredients that can eradicate diarrheal infections. Thus, another alternative vaccine candidate is needed. The aim of this research is to determine the effect of hemagglutination of the adhesin protein Shigella flexneri after adhesin molecular anti-body 37.8 kDa subunit pili Vibrio cholera was given. This research is a pure experiment (true experimental design) in the laboratory in vitro.

The used sample in this research is the adhesin molecule is 37.8 kDa pili subunit Vibrio cholerae. The antigen that being used is the adhesnin molecule Shigella flexneri. The method that being used is the anti-hemagglutination test.

The results shows that the highest anti-hemagglutination titre Adhesin molecular antibodies 37.8 kDa pili subunit Vibrio cholerae was 1/64. This indicates that adhesin 37.8 kDa anti-body molecules in the pili subunit Vibrio cholerae can inhibit the agglutination effect of the adhesin protein Shigella flexneri.

Keywords: *Vibrio cholerae, Shigella flexneri, adhesin protein, hemagglutination, Antibody.*

DAFTAR ISI

Halaman

Halaman Judul i
Halaman Pengesahan ii
Pernyataan Keaslian Tulisan iii
Kata Pengantar iv
Abstrak vii
Abstract viii
Daftar Isi ix
Daftar Gambar x
Daftar Singkatan xi
Daftar Lampiran xii

BAB I PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 3
1.3 Tujuan Penelitian 3
1.3.1 Tujuan Umum 3
1.3.2 Tujuan Khusus 3
1.4 Manfaat Penelitian 4
1.4.1 Manfaat Akademis 4
1.4.2 Manfaat Praktis 4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA 5
2.1 *Vibrio cholerae* 5
2.1.1 Morfologi *Vibrio cholerae* 5
2.1.2 Struktur Antigenik dan Klasifikasi Biologis 6
2.1.3 Patogenesis dan patologi diare karena Vibrio *cholera* 6
2.1.4 Ahesin *Vibrio cholera* 7
2.2 *Shigella flexneri* 8
2.2.1 Morfologi dan Identifikasi 8
2.2.2 Struktur Antigenik dan Klasifikasi Biologis 8
2.2.3 Patogenesis dan patologi diare karena *Shigella flexneri* 9
2.2.4 Adhesin *Shigella flexneri* 10
2.3 Vaksinasi 11
2.3.1 Molekul Adhesin sebagai Target Vaksin 12

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN 14
3.1 Kerangka Konsep 14
3.2 Hipotesis Penelitian 15

BAB IV METODE PENELITIAN 16
4.1 Rancangan Penelitian 16
4.2 Sampel Penelitian 16
4.3 Tempat dan Waktu Penelitian 16
4.3 Variabel Penelitian 17
4.3.1 Variabel Terikat 17
4.3.2 Variabel Bebas 17
4.5 Definisi Operasional 17
4.6 Instrumen Penelitian 18
4.6.1 Alat dan Bahan 18
4.7 Metode Pengumpulan Data 20
4.7.1 Prosedur Kultur Bakteri 20
4.7.2 Prosedur SDS-PAGE 21
4.7.3 Prosedur Purifikasi Protein dengan Elektroelusi 22
4.7.4 Uji Hemaglutinasi 23
4.7.5 Produksi Antibodi Poliklonal 23
4.7.6 Pengambilan darah dan pemisahan serum 24
4.7.7 Uji Anti Hemaglutinasi 25
4.8 Pengolahan dan Analisa Data 36

BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA 28
5.1 Hasil Penelitian 28
5.1.1 Hasil *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* 28
5.1.2 Hasil Purifikasi Protein dengan Elektroelusi 29
5.1.3 Hasil Uji Hemaglutinasi 30
5.1.3 Hasil Uji Anti Hemaglutinasi 32

5.2 Analisis Data 33
5.2.1 Deskripsi Hasil *SDS-PAGE* 33
5.2.2 Deskripsi Hasil Uji Hemaglutinasi 33
5.2.3 Deskripsi Hasil Uji Anti Hemaglutinasi 35

BAB VI PEMBAHASAN 35

BAB VII PENUTUP 39
7.1 Kesimpulan 39
7.2 Saran 39

Daftar Pustaka 40
Lampiran 43

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Koloni *Vibrio cholerae* pada Medium Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) 6

Gambar 5.1 Hasil *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* .. 25

Gambar 5.2 Protein *Vibrio cholerae* Setelah Purifikasi.....26

Gambar 5.3 Titer Protein *Vibrio cholerae* Setelah Uji *Nanodrop*..... 26

Gambar 5.4 Hasil Uji hemaglutinasi protein *Shigella flexneri*..... 27

Gambar 5.5 Hasil serum antibodi *Vibrio cholerae*..... 28

Gambar 5.6 Hasil Uji Anti Hemaglutinasi..... 29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan Bahan.....40

Lampiran 2. Keterangan Layak Etik.....46

DAFTAR SINGKATAN

aP : Pertusis Aseluler

BCG : *Bacille Calmette-Guerin*

BSA : *Bovine Serum Albumin*

CAMP : *Cyclic Adenosine Monophosphate*

CFA : *Freud/s Complete Adjuvant*

EGTA : *1mM β-amino ethyl ether –N,N,N,"n",-tetra acetic acid*

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FAE : *Follicular Associated Epithelium*

FHA : *Filamentous Hemagglutinin*

GALT : *Gut-Associated Lymphoid Tissue*

HA : Hemaglutinin

Hib : *Haemophillus influenzae* tipe b

IFA : *Incomplete Freud's Adjuvant*

IPV : *Inactivated Polio* Vaccine

LAV : *Live Attenuated Vaccine*

NAD : *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*

NALT : *Nasopharyngeal-Associated Lymphoid Tissue*

OMP : *Outer Membrane Protein*

PBS : *Phosphate-Buffered Saline*

PMN : Polimorfonuklear Neutrofil

PRN : *Pertactin*

RSB : *Reducing Sample Buffer*

SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SIgA : Ig A sekretori

SPSS : *Software Statistical Product and Service Solution*

TBS : *Tris-Buffered Saline*

TBST : *Tris-Buffered Saline Tween*-20

TCBS : *Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose*

TCG : *Thioproline Carbonate Glutamate*

KLB : Kejadian Luar Biasa

BAB 1
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Diare merupakan penyakit nomor dua yang paling banyak menyebabkan kematian pada anak usia di bawah lima tahun dan secara global terdapat hampir 1,7 milyar kasus diare pada anak setiap tahun (WHO, 2017). Terdapat 6.897.463 kasus diare di Indonesia pada tahun 2016. Penyakit diare merupakan penyakit potensial Kejadian Luar Biasa (KLB) yang sering disertai dengan kematian dan merupakan penyakit endemis di Indonesia (Kemenkes, 2017).

Shigella merupakan salah satu agen penyebab terjadinya disentri basiler atau yang dikenal masyarakat umum sebagai diare berdarah. *Shigella* adalah bakteri gram negatif berbentuk batang, non-motil, fakultatif anaerob, dan tidak membentuk spora (Hale dan Keusch, 1996). Di Jakarta Selatan, spesies *Shigella* yang paling sering di dapatkan adalah *Shigella flexneri. Shigella flexneri* merupakan spesies yang juga sering ditemukan pada negara berkembang seperti Bangladesh, Pakistan, dan Afrika (*Herwana et al.*, 2010). *Shigella flexneri* endemik pada negara berkembang (Kotloff *et al.*,1999).

Patogenesis bakteri ini diawali dengan perlekatan dan kolonisasi oleh molekul adhesin pada membran mukus di enterosit yang kemudian memicu proses invasi intraseluler dan kerusakan sel inang. Patogenesis *Shigella* dalam menyebabkan kondisi patologis tersebut diawali dengan proses adhesi, sehingga molekul adhesin dari *Shigella* berperan penting dalam patogenesis disentri (Sumarno *et al.,* 2015).

Vaksinasi merupakan salah satu cara yang paling efektif untuk eradikasi penyakit infeksi. Vaksinasi merupakan metode untuk meningkatkan imunitas protektif terhadap patogen atau toksin tertentu dengan memasukkan komponen imunogenik nonvirulen/non-toksik sehingga menstimulasi antibodi, imunitas seluler, maupun keduanya. Meningkatnya efektor sistem imun sebagai respon vaksinasi adalah salah satu tanda berhasilnya vaksinasi. Pembentukan antibodi merupakan efektor imun utama yang dicetuskan sebagai bentuk respon vaksin (Baratawidjaja, 2010).

Vaksin *Shigellosis* yang pernah diteliti adalah *A formalin-inactivated S sonnei vaccine* (SsWC) oleh *Johns Hopkins University in Baltimore, MD, USA* dimana sediaannya berupa *oral, killed, whole-cell vaccine*. Penelitian ini sudah sampai pada Phase I dengan menggunakan sukarelawan (McKenzie R., 2006).

Pada penelitian sebelumnya, ditemukan bahwa molekul hemaglutinin subunit pili *S. dysenteriae* dengan berat molekul 49,8 kDa ternyata bersifat protektif untuk mencegah diare *Shigella* pada mencit (Sumarno *et al.,* 2015). Oleh karena itu, protein ini pantas dijadikan kandidat vaksin Shigella yang ideal karena bahan dasarnya bukan merupakan *whole cell* yang dapat menyebabkan efek samping bagi penggunanya. Selain protein dengan berat molekul 49,8 kDa, pada pili *Shigella flexneri* juga ditemukan molekul adhesin dengan berat molekul 7,9 kDa, yang ternyata memiliki reaksi silang dengan subunit pili berat molekul 49,8 kDa (Anam *et al.,* 2016).

Pada diare yang disebabkan oleh *Vibrio cholera* juga ditemukan vaksin kolera berbahan dasar *whole cell* dari *Vibrio cholerae O1* yang dikombinasikan dengan rekombinan subunit-B toksin kolera. Proteksi dari vaksin bertahan hingga 6 bulan setelah vaksinasi kedua (WHO, 2010). Demikian juga telah ditemukan

protein sub unit pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang juga merupakan molekul hemaglutinin, adhesin dan protektif untuk mencegah diare pada mencit. Protein hemaglutinin subunit pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang bersifat protektif untuk mencegah diare pada mencit juga merupakan salah satu inovasi kandidat vaksin yang memenuhi kriteria(Sumarno *et al*., 2011).

Berdasarkan fenomena reaksi silang antara subunit pili dengan berat molekul 49,8 kDa dan 7,9 kDa pada *Shigella dysenteriae*, dan ditemukannya fakta bahwa *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa dapat bersifat protektif untuk mencegah diare pada mencit, peneliti ingin mengetahui apakah terdapat efek antara antibodi dari *Vibrio cholerae terhadap* molekul adhesin *Shigella flexneri* dan *Vibrio cholerae* untuk mendapatkan kandidat vaksin yang homolog antara *Shigellosis* dan kolera.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana efek pemberian antibodi molekul adhesin 37,8 kda sub unit pili *vibrio cholerae* terhadap efek aglutinasi molekul adhesin *Shigella flexnerii* pada sel darah mencit*?*

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek hemaglutinasi molekul adhesin *Shigella flexneri* setelah diberikan antibodi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae.*

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Peneliti mendapatkan pengalaman mengembangkan cara berpikir ilmiah dan ide penelitian yang bermanfaat bagi pengembangan profesi.

1.3.2 Manfaat Praktis

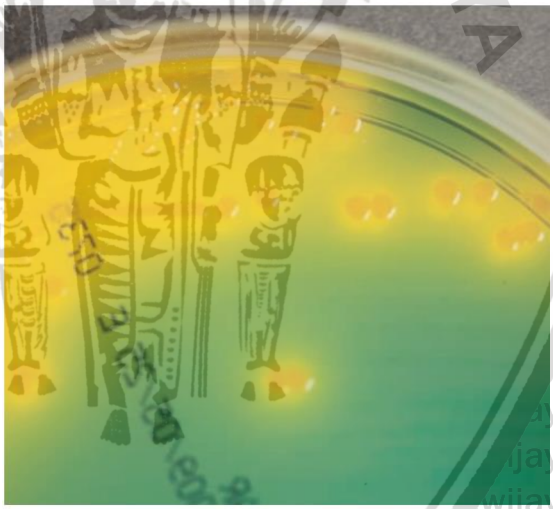
Dapat dijadikan sebagai bahan pertimbangan untuk menciptakan alternatif untuk mendapatkan kandidat vaksin yang homolog antara kolera dan *Shigellosis*.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Vibrio cholerae

2.1.1 Morfologi dan Identifikasi

Vibrio cholerae adalah bakteri gram negatif, berbentuk batang yang bengkok atau berbentuk koma dengan flagela tunggal dan bergerak aktif. *Thiosulfate citrate bile sucrose* (TCBS) merupakan salah satu media yang dapat digunkan sebagai media isolasi *Vibrio cholerae.* Pada medium TCBS *Vibrio cholerae* akan membentuk koloni berwarna kuning akibat fermentasi sukrosa seperti pada gambar 2.1 (Brooks *et al*., 2013).



Gambar 2.1 Koloni *Vibrio cholerae* pada Medium Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS)

Vibrio dapat cepat terbunuh pada pH dibawah 6, namun cukup toleran terhadap suasana alkali. *Vibrio cholerae* bersifat oksidase positif, bakteri ini memfermentasikan sukrosa dan manosa tetapi tidak memfermentasikan

arabinosa. *Vibrio cholerae* juga menghasilkan asam tetapi tidak memproduksi gas (Brooks *et al*., 2013).

2.1.2 Struktur Antigenik dan Klasifikasi Biologis

Vibrio cholerae memiliki lipopolisakarida O yang memberikan spesifisitas secara serologis. Strain *Vibrio cholerae*dari serogrup O1 dan O139 merupakan agen etiologis dari manifestasi klinis kolera. Serogrup O1 dibagi menjadi dua serotipe utama yaitu Inaba dan Ogawa. Serogrup O1 terbagi lagi menjadi dua biotipe berbeda yaitu klasik dan El Tor (Nesper *et al.,*2000). Kedua biotipe mengandung dua serotipe utama yaitu Inaba dan Ogawa. Keduanya dibedakan melalui tes aglutinasi dan antibodi vibriosidal berdasarkan antigen somatik lipopolisakarida tahan panas yang dominan. *Vibrio cholerae* O139 muncul sebagai derivat dari biotipe El Tor pandemik yang kehilangan karakteristik antigen somatik O1, namun memiliki kapsul polisakarida. Sedangkan serogrup O1 tidak membentuk kapsul (Brooks *et al*., 2013)

2.1.3 Patogenesis dan patologi diare karena Vibrio *cholerae*

Untuk menimbulkan manifestasi klinis, seseorang perlu menelan sekitar lebih dari 10^{11} bakteri hidup dengan air sebagai transporternya. Namun setelah pemberian bikarbonat untuk menetralisir asam lambung, manifestasi klinis muncul pada pemberian 10^4 *Vibrio cholerae*. Oleh karena itu, asam lambung sendiri merupakan mekanisme resisten alami terhadap *Vibrio cholerae.* Sehingga, bakteri *Vibrio cholerae* yang diberikan secara oral bersama makanan akan lebih besar kemungkinan nya untuk menimbulkan infeksi. Untuk dapat menempel dan bermultiplikasi di usus halus manusia, *Vibrio cholerae*

membutuhkan satu atau lebih faktor adherens yang dapat memungkinkan bakteri tersebut menempel pada mikrovili di usus halus. *Vibrio cholerae* yang ada di usus halus kemudian akan mengeluarkan toksin yang terdiri dari dua sub unit utama yaitu subunit A yang bertanggung jawab pada aktivitas biologis enterotoksin dan subunit B yang berperan dalam penempelan enterotoksin pada reseptornya di sel inang. Subunit B akan menempel pada reseptor mukosa ganglioside GM_1 yang kemudian akan mencetuskan subunit A yang kemudian melakukan penetrasi pada sel inang dan mentransfer *ADP-ribose* dari *nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)* ke protein target(Brooks *et al.*, 2013).

Aktivasi toksin subunit A menyebabkan peningkatan kadar *cyclic adenosine monophosphate* (C-AMP) sehingga menyebabkan hipersekresi klorida, bikarbonat, dan air. Adanya peningkatan sekresi *sodium dependent chloride* dan penghambatan absorpsi sodium dan chlorida pada microvili menyebabkan pengeluaran cairan diare yang kaya akan elektrolit (20-30L/hari) sehingga menyebabkan dehidrasi, syok, asidosis, dan bahkan kematian (Brooks *et al.,* 2013).

2.1.4 Molekul Adhesin *Vibrio cholerae*

Tahap perlekatan atau adhesi pada epitel usus halus merupakah tahap awal yang sangat penting bagi patogenesis diare kolera. Perlekatan tersebut diperankan oleh protein bakteri yang dikenal sebagai molekul adesi yang akan menempel pada *receptor molecule* (molekul reseptor) pada sel epitel. Karakterisasi molekul adhesin bakteri terdapat pada dua tempat yaitu pada pili dan *outer membrane protein* (OMP). Terdapat beberapa laporan yang menunjukkan bahwa protein dengan berat molekul sekitar 38 kDa pada OMP

merupakan molekul adhesin, seperti yang dilaporkan oleh Sumarno *et al* bahwa protein dengan berat molekul 37,8 kDa pada OMP Vibrio *cholerae* O1 M094V galur Indonesia (Malang) bersifat hemaglutinin dan dikarakterisasi sebagai molekul adhesin. Selain melaporkan molekul adhesin pada OMP, Sumarno *et al* juga menemukan beberapa protein yang bersifat sebagai molekul adhesin pada pili bakteri yang sama yaitu protein dengan berat molekul 50,3 kDa, 37,8 kDa, 35,6 kDa, dan 21,3 kDa.

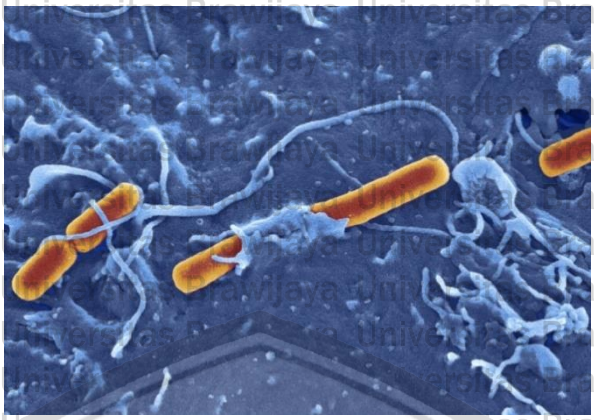
2.2 *Shigella flexneri*

2.2.1 Morfologi dan Identifikasi

Shigella merupakan bakteri batang gram negatif, tidak membentuk spora, fakultatif anaerob, dan non-motil. *Shigella* dibedakan dari *E.coli* melalui uji patogenisitas, fisiologi, dan serologis. *Shigella* tidak memfermentasikan laktosa dan lisin dekarboksilase. *Shigella* juga tidak menghasilkan H_2S (Hale dan Keusch, 1996).

2.2.2 Struktur Antigenik dan Klasifikasi Biologis

Berdasarkan reaksi biokimiawi dan antigen O spesifik *Shigella* dibagi menjadi empat serogrup, yaitu *Shigella dysenteriae* (serogrup A), *Shigella flexneri* (serogrup B), *Shigella boydii* (serogrup C), dan *Shigella sonnei* (serogrup D) (Mao *et al*., 2013).



Gambar 1. Visualisasi morfologi *Shigella flexneri*

2.2.3 Patogenesis dan patologi diare karena *Shigella flexneri*

Shigella merupakan salah satu patogen yang sangat infeksius dengan dosis infektif lebih kecil dari 200 organisme, hal ini didukung oleh karakteristik *Shigella* yang resisten terhadap lingkungan asam sehingga memudahkannya melewati penahan kimiawi lambung hingga menuju ke usus (Sansonetti, 2001). Proses patologis penting dari infeksi *Shigella* adalah proses invasi mukosa sel epitel. Ketika *Shigella* mencapai usus besar manusia, *Shigella* akan menginvasi mukosa sel epitel, melakukan penetrasi di dalam mukosa sel epitel dan kemudian menyebar keseluruh mukosa sel epitel. Respon inflamasi yang dihasilkan sel inang kemudian akan menyebabkan kerusakan lapisan epitel usus dan mengakibatkan munculnya gejala klinis dari Shigellosis (Jennison dan Verma, 2004).

Shigella dapat melakukan penetrasi pada lapian epitel melalui *follicular associated epithelium (FAE)* yang banyak mengandung sel M endositik (*Membranous epithelial cells*). Pada tahap selanjutnya, *Shigella flexneri* mengeksploitasi respon imun sel inang untuk dapat memperbanyak invasi bakteri di sel epitel usus. Makrofag yang terinfeksi *Shigella flexneri* akan melakukan

apoptosi yang menyebabkan dihasilkannya sejumlah besar IL-1. Interleukin 1 berperan penting dalam menginduksi respon inflamasi dan merekrut sel PMN menuju lokasi infeksi. Peningkatan aktifitas sel PMN melewati lapisan epitelial mengganggu integritas dari lapisan epitel itu sendiri dan menyebabkan bakteri yang terdapat di lumen usus dapat masuk ke lapisan sub-mukosa. *Shigella flexneri* juga menginduksi respons inflamasi berupa fagositosis oleh makrofag, namun *Shigella flexneri* memiliki mekanisme invasi berupa *invasion plasmid antigen-B* (Ipa-B) yang berfungsi sebagai agen litik vakuol fagositosis sehingga *Shigella flexneri* mampu menghindari degradasi oleh enzim lisosom dan bebas menuju sitoplasma. Setelah mencapai sitosol maka Ipa-B akan mengaktivkan caspase-1 yang berfungsi sebagai agen pro-apoptotik makrofag sehingga *Shigella flexneri* dapat bebas dan sekali lagi menuju sub-mukosa usus (Jennison dan Verma, 2004).

Pada fase selanjutnya enterosit mengalami kerusakan oleh *Shigella flexneri* dengan cara pelisisan membran sel dan membentuk fokus ulkus mukosa, kerusakan semakin meluas hingga mencapai lamina propria dan memicu reaksi inflamasi yang lebih berat seperti abses. Manifestasi diare dari proses ini merupakan jenis inflamasi yang ditandai dengan volume yang sedikit dan mengandung sel darah putih, sel darah merah, bakteri, dan debris seluler lainnya (Ryan, 2014).

2.2.4 Adhesin *Shigella flexneri*

Ada beberapa tahapan dalam infeksi *Shigella flexneri*. Tahap pertama adalah perlekatan pada enterosit (Todar, 2012). Salah satu struktur bakteri yang terlibat dalam perlekatan bakteri ke sel inang adalah pili (Ribet, 2015).

Sebelumnya didapatkan bahwa subunit pili 49,8 kDa *Shigella dysenteriae* bersifat hemaglutinin terhadap eritrosit mencit (Sumarno *et al.*, 2015). Pada subunit pili 49,8 kDa *Shigella flexneri* telah dilakukan uji hemaglutinasi dengan hasil positif dan merupakan molekul adhesin (Anam *et al.*, 2016).

2.3 Vaksinasi

Vaksinasi adalah salah satu langkah untuk meningkatkan imunitas. Material vaksin termasuk antigen dari patogen dan bahan tambahan yang dapat meningkatkan efektivitas dari vaksin. Strategi awal vaksin adalah menggunakan patogen yang masih hidup atau dilemahkanuntuk menimbulkan imunitas adaptif. Beberapa vaksin yang menggunakan *Live attenuated vaccine* (LAV) adalah vaksin untuk penyakit Tuberkulosis yaitu vaksin BCG (Luca dan Mihaescu, 2013). Selain itu juga vaksin polio per oral, measles, rotavirus dan demam kuning. Terdapat juga vaksin yang menggunakan bakteri yang sudah dimatikan atau virus yang sudah dilemahkan misalnya pada vaksin polio (IPV) dan *whole cell* pertussis (Halperin *et al.*, 1992). Beberapa vaksin menggunakan subunit yang telah dimurnikan contohnya hepatitis dan *Haemophillus influenzae* tipe b (Hib). Beberapa vaksin menggunakan toksin yang disekresikan oleh bakteri yang menginfeksi. Vaksin yang menggunakan cara ini adalah tetanus dan difteri (Luca dan Mihaescu, 2013).

Antigen dari virus atau bakteri ini akan dimasukkan dalam tubuh dan akan menginduksi immunitas tanpa menimbulkan penyakit. Vaksinasi ini juga mampu menurunkan risiko penyakit berkembang menjadi lebih berat dikarenakan sudah terbentuknya kekebalan dari respon imun pertama yang diinduksi vaksin (Kim dan Jang, 2017).

Permukaan mukosa tubuh merupakan area yang pertama kali dan terus menerus terpapar antigen. Oleh karena itu vaksinasi dengan melalui mukosa dinilai lebih baik meskipun per oral, nasal, rectal maupun vaginal. Vaksin melalui mukosa secara efisien dapat menginduksi sel B dan T yang tahan lama. Selain itu vaksin melalui mukosa juga dapat menginduksi respon imun *antigen-spesific humoral* dan *cell-mediated* baik sistemik maupun mukosal. Sistem imun mukosal memiliki bagian induktif dan efektor. Bagian induktif dari sistem imun mukosa adalah *gut-associated lymphoid tissue* (GALT) dan *the nasopharyngeal-associated lymphoid tissue* (NALT). *Gut-associated lymphoid tissue* termasuk *Payer's patches, mesenteric lymph nodes,* dan *isolated lymphoid follicles.* Area induktif sistem imun mukosal dilapisi oleh FAE yang terdiri dari enterosit dan sel M. Sedangkan Ig A sekretori (SIgA) merupakan efektor imun utama pada permukaan mukosa dan bekerja melalui tiga mekanisme yaitu: ekskresi antigen, eksklusi imun, dan netralisasi antigen intraseluler (Kim dan Jang, 2017).

Target dari vaksinasi dapat digunakan untuk menginduksi imunitas untuk mencegah perlekatan dan terbentuknya kolonisasi bakteri di mukosa, mencegah bakteri berpenetrasi dan replikasi di mukosa atau mencegah toksin dari bakteri merusak epitel dan target selnya. Membran mukosa di intestinal memiliki kekhususan dalam menginduksi sistem imun mukosa yang melindungi permukaan dari patogen. Sistem imun mukosa memiliki 3 fungsi utama yaitu perlindungan membran mukosa dari invasi dan kolonisasi bakteri, mencegah pembentukan antigen dari makanan, materi udara dan mikrobiota serta mencegah perkembangan dari respon imun yang berbahaya (Holmgren, 2005).

2.3.1 Molekul Adhesin sebagai Target Vaksin

Molekul adhesin berperan penting dalam kolonisasi. Kolonisasi dimulai dengan penempelan bakteri pada reseptornya yang terletak pada sel inang. Penempelan tersebut dimediasi oleh protein adhesi. Pada bakteri intraseluler, adhesin setelah berikatan dengan permukaan sel inang juga memicu terjadinya internalisasi dari bakteri ke dalam sel inang. Salah satu struktur bakteri yang terlibat dalam perlekatan bakteri ke sel inang adalah pili (Ribet, 2015).

Metode pengembangan molekul adhesi sebagai vaksin pernah dilakukan sebelumnya yaitu pada pertussis. *Bordetella pertussis* mengekspresikan 2 adhesin di permukaannya. *Filamentous hemagglutinin* (FHA) dan pertactin (PRN) (Wizemann *et al.*, 1999). Vaksin pertusis aseluler (aP) memiliki beberapa komponen dalam vaksinnya yaitu toksin pertusis FHA dan PRN yang adalah molekul adesi 68-70 kDa protein, fimbrial-2 dan fimbrial-3 serta tentunya ajuvan dari vaksin. PRN adalah protein permukaan dari bakteri *Bordetella pertussis* paling immunogenik yang memediasi perlekatan ke sel eukariota (WHO, 2009).

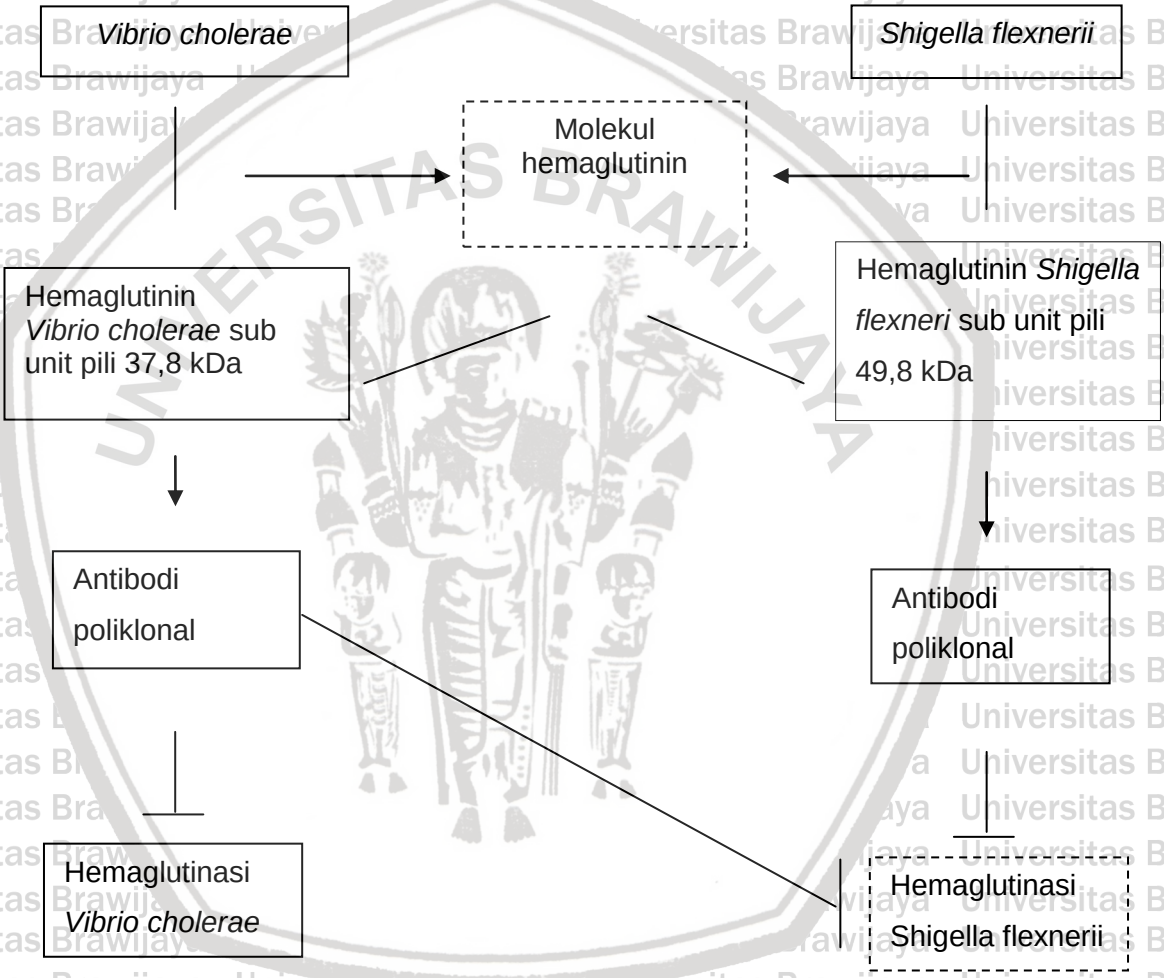
Berdasarkan studi yang sudah dilakukan Sumarno pada mencit dibuktikan bahwa terdapat korelasi antara kemampuan *Shigella dysenteriae* untuk perlekatan dengan enterosit dari mencit dengan jumlah pili pada bakteri. Hal ini dapat membuktikan bahwa pengurangan dapat membantu mengurangi jumlah bakteri, sehingga molekul adhesi dapat dikembangkan untuk kandidat vaksin dari *Shigella*. Penelitian lain yang mendukung sudah melakukan identifikasi subunit pili dari masing-masing spesies dari *Shigella sp* (Anam, 2016).

Studi lain dari Sumarno (2003) juga menyebutkan adanya perlekatan antara bakteri penyebab kolera yaitu *Vibrio cholerae* dengan bobot molekul 37,8

kDa. Dengan metode ELISA, ditemukan Fibronectin, laminin dan RGD berikatan dengan protein OMP 37,8 kDa ini.

BAB 3
KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:

: mempengaruhi

: menghambat

: variabel yang diteliti

: variabel yang tidak diamati secara langsung

3.2 Deskripsi Kerangka Konsep

Bakteri *Shigella flexneri* dan *Vibrio cholerae* memiliki molekul adhesin yang bersifat hemaglutinin dan berperan dalam proses hemaglutinasi. Bakteri *Vibrio cholerae* memiliki molekul adhesin dengan berat molekul 37,8 kDa pada subunit pilinya bersifat protektif terhadap infeksi *Vibrio cholerae*. Kedua molekul hemaglutinin ini diketahui bersifat imunogenik dan bersifat protektif untuk mencegah diare pada mencit dengan menginduksi terbentuknya antibodi poliklonal, sehingga diduga berpotensi memiliki reaksi silang di antara keduanya.

BAB 4
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vitro* menggunakan rancangan eksploratif untuk mencari reaksi silang *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexnerii.*

4.2 Populasi dan Sampel

Pada penelitian ini digunakan 8 ekor mencit Balb/c jantan.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Waktu penelitian dilaksanakan mulai sekitar bulan Februari sampai dengan Oktober 2018.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian injeksi molekul adhesin *Vibrio cholerae*.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah efek hemaglutinasi protein adhesin *Shigella flexneri.*

4.5 Definisi Operasional

a. **Mencit Balb/c:** Mencit jantan spesies *mus musculus* galur B albino *clone* (Balb/c) berumur kurang lebih 8 minggu dengan berat badan kurang lebih 28 gram.

b. **Bakteri *Vibrio cholerae* 01 :** Diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, kemudian dikultur untuk diisolasi proteinnya.

c. **Bakteri Shigella flexneri:** Diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, kemudian dikultur untuk diisolasi proteinnya.

d. **Protein adhesin 37,8 kDa:** Protein pili yang memperantarai perlekatan bakteri pada sel enterosit yang diisolasi dari subunit pili *Vibrio cholerae* melalui SDS-PAGE setelah dilakukan pemotongan dengan *pili cutter* di laboratorium Mikrobiologi FKUB.

e. **Hemaglutinasi:** Proses penggumpalan atau perlekatan sel darah merah.

f. **Antibodi poliklonal:** Kumpulan antibodi dari sel B yang berbeda yang mengenali beberapa epitop pada antigen yang sama. Masing-masing antibodi mengenali epitop khas di antigen.

4.6 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

1. Alat dan Bahan Kultur Bakteri

   a. *Shigella flexneri*

      Alat yang digunakan adalah *plate agar*, *scrap*, botol, *water bath*, inkubator. Bahan yang digunakan adalah agar *Mac-Conkey*

atau *Salmonella-shigella agar*, *phosphate-buffered saline* (PBS) (pH 7.4), *Thioproline Carbonate Glutamate* (TCG).

b. *Vibrio Cholerae*

Alat yang digunakan adalah *plate agar*, *scrap,* botol, *water bath*, inkubator. Bahan yang digunakan adalah Medium *Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose* (TCBS) agar, medium TCG yang terdiri atas 0,02% *thioproline*, 0,3% NaHCO3, 0,1% *monosodium l-glutamat*, 1% *bactotryptone*, 0,2% *yeast extract*, 0,5% NaCl, 2% bacto agar dan *1mM β-amino ethyl ether –N,N,N,"n",-tetra acetic acid* (EGTA).

2. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS PAGE)

Bahan yang dibutuhkan adalah sampel protein yang sudah dipanaskan dalam suhu 100^{o}C selama 5 menit dalam larutan *buffer* yang mengandung 5Mm Tris Ph 6,8; 5% *mercaptoethanol;* 2,5% w/v *sodium dodecyl sulfate;* 10% v/v *glycerol* dengan *bromophenol blue tracer color*; 12,5% *mini slab gel* dengan 4% *tracking gel.* Arus listrik sebesar 120 mV. Pewarna *coomasie brilliant blue* dan *marker* protein *fermentas.*

3. Purifikasi Protein dengan Elektroelusi

Alat dan bahan yang digunakan adalah *Gel* protein dari SDS PAGE, pewarna *GelCode Blue Stain Reagent*/*Commasie Blue* atau *Silver Staining, scalpel,* wadah elektroelusi

4. Uji Hemaglutinasi

Bahan yang dibutuhkan adalah sel darah merah dari jantung mencit dan protein subunit pili yang akan diuji yaitu 37,8 kDa milik *Vibrio cholerae.* Sampel diencerkan dengan konsentrasi ½ dalam volume *microplate* dimana 1 sumur/lubang adalah 50µl.

5. Produksi Antibodi Poliklonal

Bahan yang dibutuhkan sebagai antigen adalah Hemaglutinin (HA) subunit pili 37,8 kDa *Vibrio cholerae*. *Freud/s Complete Adjuvant (CFA)* dibutuhkan untuk emulsifikasi antigen. *Incomplete Freud's Adjuvant* (IFA) dibutuhkan untuk emulsifikasi *booster*.

6. Pengambilan darah dan pemisahan serum

Pengambilan darah menggunakan *cardiac* puncture karena paling cocok untuk memperoleh darah dalam jumlah besar dan berkualitas baik dalam sekali ambil. Darah diambil dari 7 mencit. Bahan dan alat yang dibutuhkan adalah mencit, anestesi, handuk, kapas, jarum 19-25G dengan *syringe* 1-5 ml, pisau bedah, *tube* untuk *thracotomy* (diameter 0,1-0,3 mm), plastik untuk sampah, tabung koleksi sampel darah, *refrigerator*.

7. Uji Anti Hemaglutinasi

Bahan yang dibutuhkan adalah serum dari mencit yang telah diinjek oleh subunit pili 37,8 kDa *Vibrio cholerae.* Sampel diencerkan dengan konsentrasi ½ dalam volume *microplate* dimana 1 sumur/lubang adalah 50µl.

4.7 Metode Pengumpulan Data

1. Prosedur Kultur Bakteri

a. Kultur *Shigella flexneri*

Shigella flexneri yang digunakan pada penelitian ini didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. *S. flexneri* ditanam pada agar Mac-Conkey atau *Salmonella-shigella* agar sebagai media selektif. Bakteri *S. flexneri* dari *Salmonella Shigella agar* dilarutkan dalam 10 mL phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4). Suspensi dari bakteri diambil dari *scrapping*. Botol dikocok selama 30 menit di water bath pada suhu 37^0C. Sedangkan untuk pertumbuhan dari pili digunakan medium *Thioproline Carbonate Glutamate* (TCG) yang diberi 10 ml suspensi dari bakteri dan diinkubasi selama 2 x 24 jam.

b. Kultur *Vibrio Cholerae*

Medium *Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose* (TCBS) *agar* digunakan sebagai media selektif. Sedangkan medium TCG digunakan untuk meningkatkan produksi dari pili *Vibrio cholerae*. Medium TCG terdiri dari 0,02% *thioproline*, 0,3% NaHCO3, 0,1% *monosodium l-glutamat*, 1% *bactotryptone*, 0,2% *yeast extract*, 0,5% NaCl, 2% *bacto agar* dan *1mM β-amino ethyl ether – N,N,N,"n",-tetra acetic acid* (EGTA). Lama inkubasi kultur dalam medium TCG adalah selama 2 x 24 jam.

2. Prosedur SDS PAGE

a. Sebagai persiapan SDS PAGE, dilakukan pembuatan *stacking gel* dan *separating gel.*

b. Tuangkan *separating monomer solution* ke dalam *gel cassette*. Diamkan hingga gel mengeras.

c. Tuangkan *stacking monomer solution* ke dalam *gel cassette* yang telah berisi *separating monomer solution*. Tambahkan ddH_2O untuk meng-*adjust* volume.

d. Pasang cetakan *(comb)* ke dalam *gel casting*, dan masukkan ke dalam *chamber*.

e. Siapkan sampel yang akan digunakan. Tambahkan RSB (*Reducing Sample Buffer*) ke dalam sampel dengan perbandingan 1:1. Panaskan selama kurang lebih 5 menit untuk mendenaturasi protein.

f. Masukkan 10 µl marker protein ke dalam *well.* Masukkan sampel ke dalam masing-masing *well* yang telah tercetak (±15-20 µl/well). Running gel selama 35 menit dengan tegangan 200v, *constant voltage*. Perhatikan pergerakan *marker protein* dan *tracking dye* (berwarna biru).

g. Jika *tracking dye* sudah mencapai garis hijau dari *gel cassette*, proses running dapat dihentikan.

h. Lepaskan gel dari *gel cassette* secara perlahan. Masukkan ke dalam *staining box*.

i. Tuangkan larutan *staining buffer* hingga gel terendam sempurna. Inkubasi selama ± 4 jam-overnight dalam *shaker* inkubator. Ganti

larutan *staining buffer* dengan larutan *de-staining buffer*. Inkubasi dalam *shaker* inkubator hingga pita-pita protein tampak jelas.

j. Setelah berat molekul dari protein pili berhasil teridentifikasi menggunakan SDS PAGE, pili dengan berat molekul 37,8 kDa *Vibrio cholerae* dan 49,8 kDa *Shigella flexneri* dipurifikasi menggunakan elektroelusi.

3. Prosedur Purifikasi Protein dengan Elektroelusi

Pewarnaan *Side Strips* dari *gel*

a. Setelah elektroforesis (SDS PAGE), gunakan *scalpel* untuk memotong strip di sisi kanan atau kiri *gel* (agar tanda berat molekul ikut terpotong). Letakkan strip di nampan untuk pewarnaan, sisa gel yang tidak dipotong disimpan di *glass plate*
b. Warnai strip yang sudah dipotong dengan pewarna protein seperti *GelCode Blue Stain Reagent*/*Commasie Blue* atau *Silver Staining.* Strip ini akan berfungsi sebagai strip referensi
c. Letakkan strip yang sudah terwarna disamping strip yang belum terwarna. Potong barisan yang sejajar dengan barisan berwarna pada strip yang sudah terwarna. Barisan atas dan bawah dari barisan yang sejajar juga bisa dipotong karena ada kemungkinan juga mengandung protein spesifik yang dicari

Elektroelusi protein dari *gel*

a. Strip yang mengandung protein spesifik yang dicari ditempatkan pada wadah elektroelusi.

b. Protein akan dielusi dari gel ke larutan *buffer* menggunakan lapangan elektrik dan ditangkap oleh membran dialisis

4. Uji Hemaglutinasi

a. Sel darah merah dari jantung mencit kontrol diambil

b. Sampel protein adhesin *Shigella flexneri* diencerkan dengan konsentrasi ½ dalam volume *microplate* dimana 1 sumur/lubang adalah 50µl.

c. Lakukan serial delusi hingga sumur 10

d. Masukkan suspensi sel darah merah dari jantung mencit (konsentrasi 0,5%) ke tiap sumur/lubang hingga mencapai 50µl

e. Suspensi kemudian diputar dengan *rotator plate* selama 1 menit.

f. Diamkan di suhu ruang (20-25^{o}C) selama 1 jam. Titer ditentukan dengan memperhatikan aglutinasi sel darah merah pada pengenceran terendah (Agustina, 2012).

5. Produksi Antibodi Poliklonal

a. Hemaglutinin (HA) protein subunit pili 37,8 kDa *Vibrio cholerae* berperan sebagai antigen

b. Antigen dimasukkan ke dalam *syringe*

c. Antigen diemulsifikasi (agar fase yang terdispersi adalah zat cair) dengan *Freud's Complete Adjuvant* (CFA) secara intraperitoneal dengan dosis 100 mg dalam 100 ml *Phosphahte Buffered Saline* (PBS) 10. PBS berperan sebagai cairan pembilas dan pengencer antibodi

d. Antigen disuntikkan ke mencit sebagai imunisasi pertama

e. *Booster* diberikan pada minggu ketiga, keempat dan kelima dengan antigen yang sudah diemulsifikasi menggunakan *Incomplete Freud's Adjuvant* (IFA) dengan dosis yang sama dengan CFA (Agustina, 2012).

6. Pengambilan darah dan pemisahan serum

Pengambilan serum menggunakan darah dari jantung mencit yang diambil 1 minggu setelah pemberian *booster* terakhir. Mencit sebelumnya diberikan anestesi terminal terlebih dahulu.

a. Ada 3 cara untuk melakukan *cardiac puncture* yaitu:

- Pegang mencit dengan memegang bagian kulit di atas pundak sehingga kepala akan ada di bagian atas kaki di bawah dengan bagian perut menghadap ke arah kita. Gunakan *syringe* 1 ml dan jarum 22G. Masukan jarum 5 mm dari tengah thoraks menuju bagian dagu, sedalam 5-10 mm, dengan sudut 25-30 derajat dari dada.
- Posisikan mencit dengan bagian punggung di bawah dan perut menghadap ke arah kita. Dorong *syringe* secara vertikel melalui sternum.
- Posisikan mencit dengan satu bagian badan di bawah sehingga bagian perut menghadap kanan atau kiri dari operator. Masukkan jarum perpendikular dinding dada.

b. Darah yang sudah diambil disimpan di inkubator dengan suhu 37^{o}C dengan posisi miring selama 30 menit.

c. Simpan darah di *refrigerator* dengan suhu 4^{o}C selama 10 menit

d. Sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit
e. Cairan jernih di bagian atas (serum) dipisahkan dari gumpalan darah yang terletak di bawah
f. Simpan di tabung steril pada suhu -20^{o}C

Jika darah tidak langsung muncul keluarkan 0,5 cc udara untuk menciptakan keadaan vakum di *syringe*. Tarik jarum tanpa mengeluarkannya dari kulit lalu geser jarum. Saat darah muncul di *syringe*, pertahankan dan secara perlahan tarik darah. Hati hati untuk tidak menarik terlalu cepat karena dapat menyebabkan jantung *collapse*. Jika darah berhenti mengalir, putar jarum atau tarik jarum sedikit ke atas (Hoff, 2000 dan Agustin,2012).

7. Uji Anti Hemaglutinasi
   a. PBS dengan pH 7,4 dimasukkan ke dalam masing-masing well
   b. Menambahkan serum di well kedua sebanyak 50 µl
   c. Melakukan serial delusi sampai well ke 10
   d. Menambahkan antigen *S. Flexneri* dengan titer sesuai dengan tertinggi pada uji HA yaitu 1/8 sebayak 50 µl
   e. Menambahkan suspensi eritrosit sebanyak 50 µl ke well 2 samapi 10
   f. Well 11 digunakan sebagai kontrol negatif dengan serum dan eritrosit
   g. Well 12 digunakan sebagaai kontrol positif dengan eritrosit dan antigen *Shigella flexneri*
   h. Mikroplate didiamkan dalam suhu ruangan dan diamati sampai hasil terlihat

4.8. Pengolahan dan Analisa Data

Pengolahan dan analisa data dilakukan dengan mengamati dan mendeskripsikan hasil uji anti hemaglutinasi dari serum antibodi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae.*

4.9 Alur Penelitian

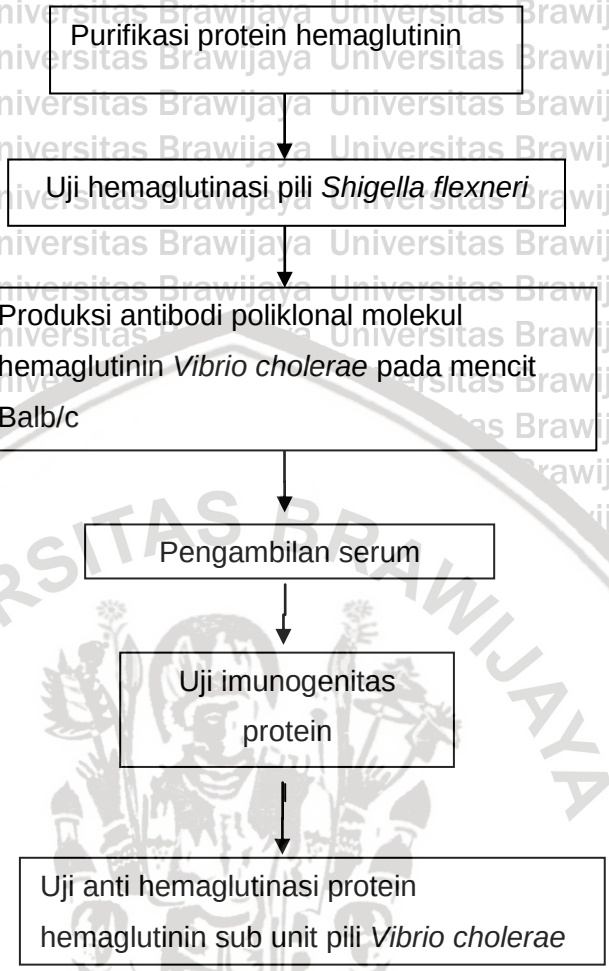
[

Kultur bakteri *Shigella flexneri* dan *Vibrio cholerae*

↓

Isolasi protein berdasar berat molekul dengan SDS PAGE

↓


Purifikasi protein hemaglutinin
Uji hemaglutinasi pili *Shigella flexneri*
Produksi antibodi poliklonal molekul hemaglutinin *Vibrio cholerae* pada mencit Balb/c
Pengambilan serum
Uji imunogenitas protein
Uji anti hemaglutinasi protein hemaglutinin sub unit pili *Vibrio cholerae*

BAB 5
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

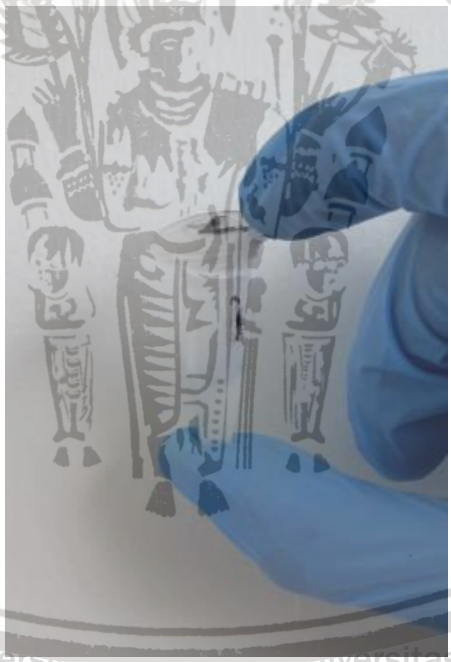
Untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekul, digunakan metode *SDS-PAGE.* Hasil dari *SDS-PAGE* didapatkan hasil seperti yang ditunjukkan gambar 5.1.

Gambar 5.1 Hasil *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

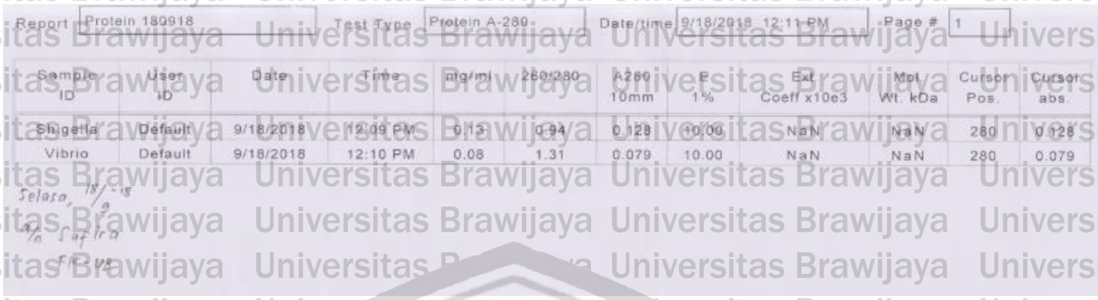
Dari hasil tersebut digunakan protein adhesin subunit pili 37,8 kDa *Vibrio cholerae* untuk memproduksi antibodi poliklonal pada mencit perlakuan.

5.1.2 Hasil Purifikasi Protein dengan Elektroelusi

Purifikasi protein dilakukan untuk mendapatkan protein adhesin *Vibrio cholerae* yang sudah tidak tercampur dengan bahan-bahan kimia atau kontaminan lain nya seperti terlihat pada gambar 5.2. Dari prosedur ini didapatkan protein *Vibrio cholerae* dengan titer 0.08 µl/µg yang diuji dengan uji nanodrop menggunakan *spectrophotometer* yang ditunjukkan pada gambar 5.3.



Gambar 5.2 Protein *Vibrio cholerae* Setelah Purifikasi



Report: Protein 180918 | Test Type: Protein A-280 | Date/time: 9/18/2018 12:11 PM | Page #: 1

Sample ID	User ID	Date	Time	mg/ml	260/280	A280 10mm	E 1%	Ext Coeff x10e3	Mol Wt. kDa	Cursor Pos.	Cursor abs.
Shigella	Default	9/18/2018	12:09 PM	0.13	0.94	0.128	10.00	NaN	NaN	280	0.128
Vibrio	Default	9/18/2018	12:10 PM	0.08	1.31	0.079	10.00	NaN	NaN	280	0.079

Gambar 5.3 Titer Protein *Vibrio cholerae* setelah uji *Nanodrop*

5.1.3 Hasil Uji Hemaglutinasi

Protein *Shigella flexneri* yang telah terpurifikasi digunakan pada uji hemaglutinasi untuk melihat kemampuan protein *Shigella flexneri* untuk menggumpalkan eritrosit mencit. Pada gambar 5.4 terlihat dari uji hemaglutinasi sumur 1 diisi dengan kontrol positif berisi eritrosit dan protein *Shigella flexneri,* sumur 2 yang berisi eritrosit dan protein *Shigella flexneri* yang telah dilakukan serial dilusi dengan titer sampel 1/2 didapatkan hasil positif. Sumur 3 yang berisi eritrosit dan protein *Shigella flexneri* yang telah di lakukan serial dilusi dengan konsentrasi sampel 1/4 didapatkan hasil positif. Sedangkan Sumur 4 sampai dengan sumur 10 yang berisi eritrosit dan protein *Shigella flexneri* yang telah di lakukan serial dilusi dengan konsentrasi sampel 1/8-1/512 didapatkan hasil negatif. Dengan hasil tersebut didapatkan titer tertinggi protein *Shigella flexneri* sebesar 1/4 yang akan digunakan untuk uji anti hemaglutinasi.

Gambar 5.4 Hasil Uji hemaglutinasi protein *Shigella flexneri*. Angka 1/2 - 1/512 menunjukkan titer sampel setelah dilusi. KN= Kontrol Negatif. KP= Kontrol Positif. Sampel adalah protein adhesin *Shigella flexneri* dengan berat molekul 49,8 kDa.

5.1.4 Hasil Produksi Antibodi Poliklonal

Dari pengambilan darah mencit, hasil tersebut disentrifugasi dan menghasilkan serum antibodi poliklonal 37, 8 kDa *Vibrio cholerae* seperti terlihat pada gambar 5.5.

Gambar 5.5 Hasil serum antibodi *Vibrio cholerae*

5.1.5 Hasil Uji Anti Hemaglutinasi

Hasil uji anti hemaglutinasi positif apabila terdapat deposit dari eritrosit mencit seperti pada bagian kontrol positif (Hierholzer *et al.*, 1996). Serum antibodi poliklonal 37,8 kda *Vibrio cholerae* digunakan sebagai sampel pada uji anti hemaglutinasi. Pada gambar 5.5 terlihat pada sumur 2 sampai dengan sumur 10 diberikan sampel yang telah dilakukan serial dilusi dengan konsentrasi berturut-turut 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, dan 1/512. Masing-masing sumur tersebut direaksikan dengan eritrosit mencit dan protein adhesin *Shigella flexneri* dengan konsentrasi 1/4 (diperoleh dari uji hemaglutinasi). Dari uji anti hemaglutinasi didapatkan hasil positif pada sumur 2 - sumur 7. Sedangkan pada sumur 8-10 didapatkan hasil negatif. Sumur 11 berisi kontrol negatif yang berisi antibodi poliklonal tanpa pengenceran, dan sumur 12 berisi kontrol negatif yang berisi protein adhesin *Shigella flexneri* dan eritrosit tanpa pemberian antibodi poliklonal.

Gambar 5.6 Hasil Uji Anti Hemaglutinasi. Angka 1/2 - 1/512 menunjukkan titer sampel setelah dilusi. KN = Kontrol Negatif. KP = Kontrol Positif. Sampel adalah antibodi poliklonal 37,8 kDa *Vibrio cholerae.* .

5.2 Analisa Data

5.2.1 Deskripsi Hasil *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

Dari hasil SDS-PAGE didapatkan beberapa protein dengan berat molekul berbeda. Pada penelitian ini digunakan protein *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang digunakan sebagai antigen untuk menimbulkan antibodi pada mencit perlakuan (Sumarno *et al.*, 2011). Sedangkan untuk *Shigella flexneri* digunakan pili dengan berat molekul 49,8 kDa yang nantinya akan dipakai sebagai sampel antigen pada uji hemaglutinasi dan anti hemaglutinasi.

5.2.1 Deskripsi Hasil Uji Hemaglutinasi

Uji hemaglutinasi digunakan untuk menentukan kemampuan protein adhesin *Shigella flexneri* untuk mengaglutinasikan eritrosit mencit. Hasil uji hemaglutinasi juga digunakan untuk menentukan titer tertinggi protein adhesin *Shigella flexneri* yang akan digunakan pada uji anti hemaglutinasi. Pada hasil uji hemaglutinasi didapatkan hasil positif apabila terdapat proses hemaglutinasi eritrosit mencit oleh protein *Shigella flexneri*. Adanya hemaglutinasi tersebut ditandai dengan tidak terbentuknya endapan eritrosit pada dasar sumuran akibat eritrosit berikatan dengan protein *Shigella flexneri* dan menyebabkan eritrosit bukan membentuk titik endapan di dasar, melainkan membentuk lapisan yang diakibatkan oleh ikatan antara antigen dan eritrosit berikatan pada sumur seperti pada sumur 1 yang berisi kontrol positif

(Hierholzer *et al.*, 1996). Sedangkan pada hasil negatif, akan terbentuk endapan eritrosit yang membentuk titik pada dasar sumuran seperti pada sumur 12.

Dari hasil uji hemaglutinasi yang dilakukan, didapatkan hasil positif pada sumur 2 yang berisi eritrosit mencit dan direaksikan denga protein adhesin *Shigella flexneri* dengan konsentrasi 1/2, ditandai dengan tidak terbentuknya endapan di dasar sumuran, hal ini menandakan pada sumuran 2 terjadi proses hemaglutinasi eritrosit mencit oleh protein adhesin *Shigella flexneri* konsentrasi 1/2. Pada sumur 3 yang berisi eritrosit mencit dan protein adhesin *Shigella flexneri* dengan konsentrasi 1/4 didapatkan hasil positif dengan tidak adanya betukan endapan pada dasar sumuran yang menandakan adanya proses hemaglutinasi oleh protein *Shigella flexneri*. Pada sumur 4 dengan konsentrasi protein adhesin *Shigella flexneri* 1/8, didapatkan hasil negatif. Hal ini ditandai dengan terbentuknya gambaran endapan pada dasar sumur yang membentuk titik berwarna merah yang merupakan endapan eritrosit mencit yang tidak berikatan dengan protein adhesin *Shigella flexneri*. Pada sumur 4 yang berisi protein adhesin *Shigella flexneri* dengan konsentrasi 1/8 didapatkan hasil negatif yang juga ditandai dengan terbentuknya endapan eritrosit pada dasar sumuran yang menandakan tidak terjadinya hemaglutinasi eritrosit oleh protein adhesin *Shigella flexneri*. Pada sumur 5 yang berisi protein adhesin *Shigella flexneri* dengan konsentrasi 1/16 juga didapatkan hasil negatif dengan adanya endapan eritrosit pada dasar sumur yang menandakan tidak terjadinya proses hemaglutinasi eritrosit. Pada sumur 6 yang berisi protein adhesin *Shigella flexneri* dengan konentrasi 1/32 didapatkan hasil negatif ditandai dengan terbentuknya endapan pada dasar sumuran, menandakan tidak terjadinya proses hemaglutinasi

eritrosit. Pada sumur 7 yang berisi protein adhesin *Shigella flexneri* dengan konsentrasi 1/64 didapatkan hasil negatif yang menandakan tidak terjadinya proses hemglutinasi eritrosit. Pada sumur 8 yang berisi protein adhesin *Shigella flexneri* dengan konsentrasi 1/128 juga didapatkan hasil negatif ditandai oleh adanya bentukan endapan di dasar sumur menandakan tidak terjadinya proses hemaglutinasi eritrosit mencit. Pada sumur 9 yang berisi protein adhesin *Shigella flexneri* dengan konsentrasi 1/256 didapatkan hasil negatif yang menandakan tidak terjadinya proses hemaglutinasi eritrosit mencit, hal ini ditandai dengan terbentuknya endapan eritrosit pada dasar sumur. Pada sumur 10, yang berisi protein adhesin *Shigella flexneri* dengan konsentrasi 1/512 didapatkan hasil negatif ditandai dengan terbentuknya endapan eritrosit pada dasar sumur menandakan pada konsentrasi 1/512, protein adhesin *Shigella flexneri* tidak mengumpalkan eritrosit mencit.

Berdasarkan hasil uji hemaglutinasi yang telah dilakukan, didapatkan bahwa titer tertinggi protein adhesin *Shigella flexneri* 49,8 kDa adalah 1/4 yang akan digunakan sebagai titer protein adhesin *Shigella flexneri* pada uji anti hemaglutinasi serum antibodi *Vibrio cholerae* 37,8 kDa.

5.2.2 Hasil Uji Anti Hemaglutinasi

Uji anti hemaglutinasi dilakukan untuk menentukan kemampuan antibodi poliklonal *Vibrio cholerae* 37,8 kDa untuk menghambat proses hemaglutinasi eritrosit mencit. Pada uji anti hemaglutinasi didapatkan hasil positif apabila proses hemaglutinasi eritrosit mencit tidak terjadi karena dapat dihambat oleh antibodi poliklonal 37,8 kda *Vibrio cholerae*. Hal ini ditandai dengan terbentuknya endapan

eritrosit pada dasar sumur dan menunkukkan gambaran titik merah seperti gambaran kontrol negatif pada sumur 11. Sedangkan hasil negatif menunjukkan terjadinya proses hemaglutinasi eritrosit mencit yang tidak dapat dihambat oleh antibodi poliklonal 37,8 kDa *Vibrio cholerae* ditandai dengan tidak terbentuknya endapan eritrosit pada dasar sumur seperti gambaran kontrol positif pada sumur 12.

Pada sumur 2 yang diberi sampel antibodi poliklonal dengan konsentrasi 1/2 didapatkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya endapan eritrosit pada dasar sumur. Hal ini menandakan bahwa pada konsentrasi 1/2, antibodi poliklonal *Vibrio cholerae* 37,8 kDa dapat menghambat proses hemaglutinasi yang disebabkan oleh protein adhesin *Shigella flexneri*. Pada sumur 3 yang diberi sampel antibodi poliklonal dengan konsentrasi 1/4 juga didapatkan hasil positif, pada sumur 3 terbentuk endapan eritrosit yang terbentuk di dasar sumur menandakan terhambatnya nya proses hemaglutinasi akibat protein adhesin *Shigella flexneri*. Pada sumur 4 dengan konsentrasi sampel antibodi poliklonal 1/8, didapatkan hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan eritrosit pada bagian bawah sumur yang menandakan pada konsentrasi 1/8, antibodi poliklonal Vibrio cholera 37,8 kda dapat menghambat proses hemaglutinasi eritrosit. Pada sumur 5 dengan konsentrasi sampel antibodi poiklonal 1/16 didapatkan hasil positif ditandai dengan tebentuknya titik endapan eritrosit pada dasar sumur yang menandakan bahwa proses hemaglutinasi eritrosit mencit dapat dihambat. Pada sumur 6 dengan konsentrasi sampel antibodi 1/32 didapatkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya endapan eritrosit pada dasar sumur yang juga menandakan bahwa pada sumur 6, antibodi poliklonal *Vibrio cholerae* 37,8 kDa mampu menghambat

proses hemaglutinasi eritrosit mencit. Pada sumur 7 dengan konsentrasi sampel antibodi 1/64 juga masih didapatkan hasil positif. Dengan konsentrasi antibodi 1/64, endapan eritrosit mencit di dasar sumur masih tebentuk sehingga menandakan bahwa pada konsentrasi 1/64 proses hemaglutinasi masih bisa dihambat. Sedangkan pada sumur 8 dengan konsentrasi sampel antibodi poliklonal 1/128, didapatkan hasil negatif. Hal ini ditandai dengan tidak adanya lagi endapan eritrosit pada dasar sumur yang menandakan bahwa terjadi proses hemglutinasi pada sumur 8. Artinya, pada konsentrasi 1/128 antibodi poliklonal *Vibrio cholerae* 37,9 kDa tidak dapat menghambat proses hemaglutinasi ertrosit mencit yang diakibatkan oleh protein adhesin *Shigella flexneri*. Pada sumur 9 dengan konsentrasi sampel antibodi piloklonal 1/256 dan sumur 10 dengan konsentrasi sampel antibodi poliklonal 1/512 juga didpatkan hasil negatif. Hal ini juga menunjukan bahwa pada konsentrasi 1/256 dan konsentrasi 1/512 antibodi poliklonal *Vibrio cholerae* 37,8 kDa tidak dapat menghambat proses hemaglutinasi yang disebabkan oleh protein adhesin *Shigella flexneri*.

Berdasarkan hasil uji antihemaglutinasi yang telah dilakukan, didapatkan hasil bahwa antibodi poliklonal *Vibrio cholerae* 27,8 kDa sampai dengan dilusi 1/64 dapat mengambat proses hemaglutinasi yang disebabkan oleh protein adhesin *Shigella flexneri*. Sedangkan pada konsentrasi yang lebih rendah menunjukkan hasil yang negatif yang artinya terjadi proses hemaglutinasi eritrosit mencit. Pada uji anti hemaglutinasi proses inhibisi diperantarai oleh antibodi poliklonal yang berperan dalam mengikat protein adhesin sehingga proses hemaglutinasi tidak terjadi.

BAB 6
PEMBAHASAN

Molekul adhesin berperan penting dalam patogenesis infeksi bakteri termasuk *Shigella flexneri.* Proses infeksi diawali dengan kolonisasi. Kolonisasi dimulai dengan penempelan bakteri pada reseptornya yang terletak pada sel inang yang dimediasi oleh molekul adhesin bakteri. Salah satu struktur bakteri yang terlibat dalam perlekatan bakteri ke sel inang adalah pili (Ribet, 2015). Dari penelitian sebelumnya didapatkan bahwa subunit pili 49,8 kDa *Shigella flexneri* merupakan molekul adhesin yang bersifat hemaglutinin (Anam *et al.*, 2016).

Skrining untuk pemeriksaan molekul adhesin adalah dengan menggunakan uji hemaglutinasi. Apabila ditemukan uji hemaglutinasi yang positif maka perlu dilanjutkan dengan melakukan tes apakah molekul tersebut merupakan molekul adhesin (Nakasone dan Iwanaga, 1998). Pada subunit pili 49,8 kDa *Shigella flexneri* telah dilakukan uji hemaglutinasi dengan hasil positif dan merupakan molekul adhesin (Anam *et al.*, 2016).

Pada penelitian sebelumnya, dari uji hemaglutinasi didapatkan bahwa subunit pili *Vibrio cholerae* 37,8 kDa merupakan molekul adhesin dan bersifat hemaglutinin. Ditemukan juga bahwa subunit pili 37,8 kDa *Vibrio cholerae* bersifat protektif terhadap infeksi *Vibrio* dengan munculnya respon imun dan peningkatan IgA pada mencit perlakuan (Sumarno *et al.*, 2011).

Maka didapatkan bahwa molekul adhesin subunit pili 49,8 kDa *Shigella flexneri* dan molekul adhesin subunit pili 37,8 kDa *Vibrio cholerae* merupakan molekul hemaglutinin.

Dari hal tersebut, muncul pertanyaan apakah molekul adhesin subunit pili 49,8 kDa *Shigella flexneri* identik dengan molekul adhesin subunit pili *37,8 kDa Vibrio cholerae.* Maka, dilakukanlah penelitian ini dengan melakukan uji anti hemaglutinasi untuk melihat apakah antibodi subunit pili *37,8 kDa Vibrio cholerae* dapat menghambat proses hemaglutinasi akibat molekul adhesin *Shigella flexneri.*

Pada penelitian ini molekul adhesin *Shigella flexneri* dengan berat molekul 49,8 kDa dilakukan uji hemaglutinasi dan didapatkan hasil positif pada sumur 2 dan sumur 3 yang masing–masing berisi titer antigen 1/2 dan 1/4 yang ditandai dengan tidak terbentuknya endapan eritrosit pada dasar sumur. Pada sumur 4 sampai sumur 10 yang masing-masing berisi antigen dengan titer 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, dan 1/512 didapatkan hasil negatif. Dapat disimpulkan bahwa molekul adhesin *Shigella flexneri* dengan berat molekul 49,8 kDa memiliki titer hemaglutinasi sebesar 1/4. Dimana titer hemaglutinasi merupakan dilusi terendah yang dapat menimbulkan proses aglutinasi eritrosit (Miliana *et al.*, 2017). Sedangkan pada titer yang lebih kecil tidak menimbulkan proses hemaglutinasi. Pada penelitian yang dilakukan oleh Miliana *et al.* (2017), didapatkan titer hemaglutinasi dari *Shigella flexneri 28 kDa OMP* adalah 1/32. Hasil negatif pada titer yang lebih rendah ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan pada mencit oleh Mitra *et al.* (2012) bahwa aktivitas hemaglutinasi memiliki hubungan langsung dengan kemampuan kolonisasi pada mencit perlakuan. Pembacaan hasil negatif maupun positif pada uji

hemaglutinasi ini berdasarkan fakta bahwa eritrosit yang tidak mengalami aglutinasi akan tenggelam dan membentuk endapan pada dasar sumur. Sedangkan pada eritrosit yang tidak mengalami aglutinasi akan membentuk struktur kristal dan melingkupi sisi sumur (Hierholzer *et al.*, 1996).

Pada tahun 2015, Sumarno *et al.* menemukan bahwa protein hemaglutinin subunit pili *S. dysenteriae* dengan berat molekul 49,8 kDa ternyata bersifat protektif untuk mencegah diare *Shigella* pada mencit. Selain protein dengan berat molekul 49,8 kDa, pada pili *Shigella flexneri* juga ditemukan molekul adhesin dengan berat molekul 7,9 kDa, yang ternyata memiliki reaksi silang dengan subunit pili berat molekul 49,8 kDa (Anam K. *et al.,* 2016). Sedangkan pada penelitian lainnya ditemukan bahwa molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dapat menimbulkan respon imun dan meningkatkan IgA pada mencit (Sumarno *et al.,* 2011).

Pada uji anti hemaglutinasi antibodi Vibrio cholera 37,8 kDa, pada sumur 2 sampai sumur 7 dengan titer antibodi masing–masing 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, dan 1/64 didapatkan hasil positif. Hal ini ditandai dengan terbentuknya endapan eritrosit pada dasar sumur yang membentuk titik. Sedangkan pada sumur 8 sampai dengan sumur 10 dengan titer antibodi masing–masing 1/128, 1/256, dan 1/512 didapatkan hasil negatif. Dapat disimpulkan bahwa sampai dengan titer 1/64, antibodi *Vibrio cholerae* 37,8 kDa dapat menghambat efek aglutinasi dari molekul adhesin *Shigella flexneri*. Ditandai dengan tidak terjadinya hemaglutinasi dari eritrosit mencit akibat antibodi poliklonal dari serum yang mengikat antigen dan menghalangi antigen untuk dapat berikatan dengan eritrosit (Janeway C. A. Jr. *et al*., 2001). Eritrosit yang tidak

berikatan dengan antigen kemudian akan tenggelam dan membentuk gambaran titik pada dasar sumur (WHO, 2005).

Sedangkan pada titer yang lebih rendah, antibodi *Vibrio cholerae* 37,8 kDa tidak dapat menghambat proses hemaglutinasi. Berdasarkan hal tersebut didapatkan titer anti hemaglutinasi antibodi *Vibrio cholerae* adalah 1/64. Titer anti hemaglutinasi didefinisikan sebagai dilusi terakhir dari serum antibodi yang dapat menghambat hemaglutinasi (Meijer *et al.*, 2006).

Metode pengembangan molekul adhesin sebagai vaksin pernah dilakukan sebelumnya yaitu pada pertussis. *Bordetella pertussis* mengekspresikan 2 adhesin di permukaan nya. *Filamentous hemagglutinin* (FHA) dan *pertactin* (PRN) (Wizemann *et al*., 1999). Dari hasil uji anti hemaglutinasi pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa antibodi 37,8 kda *Vibrio cholerae* dapat menghambat efek hemaglutinasi molekul adhesin *Shigella flexneri*. Maka, molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* molekul adhesin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* yang merupakan molekul hemaglutinin dapat menjadi kandidat vaksin yang homolog untuk kolera dan *shigellosis*.

BAB 7
PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa antibodi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dapat menghambat efek hemaglutinasi protein adhesin *Shigella flexneri*.

7.2 Saran

Adapun saran yang dapat peneliti berikan dari penelitian ini adalah:

a. Perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui respon antibodi *Vibrio cholerae* terhadap protein adhesin *Shigella flexneri* dengan menggunakan metode lain yaitu *dot blot* dan *western blot*.
b. Perlunya penelitian lain untuk mengetahui respon antibodi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* terhadap protein adhesin bakteri S*higella sp* lain nya.
c. Perlu dilakukan penelitian lanjut untuk mengetahui protektifitas antibodi *Vibrio cholerae* terhadap infeksi *Shigella flexneri.*

DAFTAR PUSTAKA

Anam K., Nurdiana, Hernowati T. E., Hidayat S. dan Sumarno R. P., Cross Immunity among the 49.8 KDa Pili Subunit Hemagglutinin Proteins and 7.9 KDa Pili Subunit Anti Hemagglutinin Proteins of Shigella spp. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical research.* 2016. 7 (2): 19-30.

Avanita, A.S., Winarsih, S., Hidayat, S. and Nurhidayati, D.Y., Sumarno, R.P., 2015. Haemaglutination of Shigella dysenteriae subunit pili protein with anti-haemaglutination of S. dysenteriae subunit pili protein as a molecule adhesion in mouse enterocytes. *African Journal of Microbiology Research*, *9*(11), pp.781-787.

Baratawidjaja K dan Rengganis I., *Imunologi Dasar*, Edisi Kesembilan, Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Indonesia, Jakarta, 2010.

Brooks, GF., Jawetz, E., Melnick, JL., & Adelberg, EA. 2013. *Jawetz, Melnick& Adelberg's medical microbiology*. 26th Ed. Mc-GrawHill Medical, New York, p. 229-241

Fitrianingsih, A.A., Rachma, L.N., Milliana, A., Hernowati, T.E., Santoso, S. and Prawiro, S.R., 2017. Cross Reaction among Antibody Pili sub unit Hemagglutinin Proteins and Outer Membrane sub unit Hemagglutinin Proteins of Shigella flexneri. *Journal of Tropical Life Science*, *7*(1), pp.1-7.

Greenwood B. 2014. The contribution of vaccination to global health: past, present and future. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *369*(1645).

Hale TL, Keusch GT. Shigella. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 22. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8038, diakses pada 4 November 2017)

Halperin, S., Scheifele, D., & Macdonald, N. 1992. Acellular versus whole-cell pertussis vaccines. *The Canadian journal of infectious diseases = Journal canadien des maladies infectieuses*, *3*(2), 57-8.

Herwana E, Surjawidjaja JE, Salim OC, Indriani N, Bukitwetan P, dan Lesmana M. 2010. Shigella-associated diarrhea in children in South Jakarta, Indonesia. *Southern Asian J Trop Med Public Health*. 41(2): 418–425.

Hierholzer J., Brian many W. J., dan Hillar K. O., Virology Methods Manual. 1st Edition. London: *ACADEMIC PRESS.* 1996; 309-312.

Holmgren, J. and Czerkinsky, C., 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine*, *11*, pp.S45-S53.

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition.* New York: Garland Science; 2001. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10757/, diakses pada 4 November 2018)

Jennison, AV., Verma, NK. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol Rev*. 2004:43-58

Kemenkes, 2017. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2016.* Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 2017. Hal. 169-170.

Kerr, JR. Cell adhesion molecules in the pathogenesis of host defense against microbial infection. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 1999;S2:220-230

Kim S.H, Jang Y.S. The Development of Mucosal Vaccines for Both Mucosal and Systemic Immune Induction and the Roles Played by Adjuvants, 2017, 6(1): 15-21

Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, dan Levine MM. 1999. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull World Health Organ 1999; 77(8): 651–666.

Luca, S., & Mihaescu, T. 2013. History of BCG Vaccine. *Maedica*, *8*(1), 53-8.

Mao, Y., Cui E., Bao, C., Liu, Z., Chen, S., Zhang, J., Wang, H., *et al*. Changing trends and serotype distribution of *Shigella*species in Beijing from 1994 to 2010. *Gut Pathogens.* 2013,5:21

McKenzie R, et al. 2006. Safety and immunogenicity of an oral, inactivated, whole-cell vaccine for Shigella sonnei: preclinical studies and a Phase I trial. Vaccine 24:3735–3745

Meijer A., Bosman A., Van De Kamp E. E.H.M., Wilbrink B., Van Beest Holle M. D. R., Koopmans M. (2006). Measurement of antibodies to avian influenza virus A(H7N7) in humans by hemagglutination inhibition test. Journal of Virological Methods 132 (2006) 113–120

Nakasone N. dan Iwanaga M. Characterization of Outer mebrane Protein OmpU of *Vibrio cholerae* O1. *Infection and Immunity.* 1998. 66(10) : hal.4726-4728

Nesper J., Kapfhammer D., dan Klose K. E. Characterization of Vibrio cholerae O1 Antigen as the Bacteriophage K139 Receptor and Identification of IS1004 Insertions Aborting O1 Antigen Biosynthesis. *Journal of Bacteriology, 2000,* 182(18) : p. 5097-5104

Miliana, A., Noorhamdani AS., Poeranto, S., Handono, K., Prawiro, SR., Fitrianingsih, AA., Rachma, LN. Antibodies against *Shigella flexneri*

adhesion molecule outer membrane protein (OMP) can cross-react with OMPs of some *Shigella*species. *Tropical Journal of Pharm Res.* 2017;16(2):255-261

Ribet, D. and Cossart, P., 2015. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and Infection*, *17*(3), pp.173-183.

Ryan, K., Ray, CG., *et al*. 2014. *Sherris medical microbiology*. 6th Ed. Mc-Graw Hill Education, New York, p. 596-8

Sansonetti, PJ. Shigellosis: From symptoms to molecular pathogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;280: G319-G323

Setyorini D., Utami Y. D., Widjayanto E., Winarsih S., Noorhamdani A. S. dan Prawiro S. R. Protectivity of Adhsion Molecules Pili 49,8 kDa *Shigela Dysenteriae* Conjugated with ISCOM Against Bacterial Colonization and Colonic Epithelial Cells damage in Mice. *International Journal of Tropical Medicine.*2013. 8 (1): 19-26

Siegrist, C.A., 2008. Vaccine immunology. *Vaccines*, *5*, p.1725.

Sumarno, 2003.Molecular weight of protein receptor of vibrio cholerae O1 M094V in enterocyte of rat. *Jurnal Kedokteran Yarsi*, *11*(8), 20-29.

Sumarno, R. P., Susanto A., Ismanoe G., dan Winarsih S. 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*

Todar K (2008-2012). *Shigella* and Shigellosis. Review of Todar's Online Textbook of Bacteriology. Madison, Wisconsin.

Wizemann T. M., Adamou J. E., dan Langermann.1999. Adhesins as Target for Vaccine Development. *Emergency Infectious*. Dis.5 : 395-403

World Health Organization, 2010. *The Immunological Basis for Immunization Series; Modul 14: Cholerae,* WHO Document Production Services, Geneva, p. 16

World Health Organization, 2017. *Diarrhoeal Disease,* (Online), (http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease, diakses 13 November 2017)

World Health Organization, 2009. The Immunological basis for Immunization Series. Module 4: Pertussis. *Update*.

World Health organization, 2005. Global Influenza Program Surveilance Network. Evolution of H5N1 Avian influenza Viruses in Asia, Emerging Infect. Hal. 1515-1521