

**VAKSINASI PERORAL HEMAGLUTININ 49,8 kDa SUBUNIT PILI
Shigella flexneri MENGINDUKSI RESPON IMUN MUKOSA Ig A
SEKRETORI DAN IL-17 SERUM PADA MENCIT BALB/C**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister Biomedik**



Oleh :

dr. Adrian Prasetya

166070122011011

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019

**VAKSINASI PERORAL HEMAGLUTININ 49,8 kDa SUBUNIT PILI
Shigella flexneri MENGINDUKSI RESPON IMUN MUKOSA Ig A
SEKRETORI DAN IL-17 SERUM PADA MENCIT BALB/C**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister Biomedik**



Oleh :

dr. Adrian Prasetya

166070122011011

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan tesis dengan judul "Vaksinasi Peroral Hemagglutinin 49,8 kDa Subunit Pili *Shigella flexneri* Menginduksi Respon Imun Mukosa Ig A Sekretori dan IL-17 Serum pada Mencit Balb/c". Pokok bahasan utama pada tesis ini mencakup prokektivitas molekul hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* sebagai kandidat vaksin, dinilai dari bangkitnya efektor imun s-Ig A pada mukosa usus dan IL-17 pada serum darah mencit, sehingga dapat dijadikan sebagai batu pijakan pengembangan vaksin untuk diare yang disebabkan oleh *Shigella flexneri* berbasis molekul adhesin.

Penulis menyadari bahwa selama proses penyusunan tesis ini banyak bantuan dan dukungan dalam berbagai bentuk yang diterima oleh penulis, oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat, karunia, serta petunjuk-Nya sehingga penulis senantiasa mendapatkan kemudahan dan kekuatan dalam menyelesaikan tesis ini.
2. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si, Med., Sp.A (K), selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan saya kesempatan menimba ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
3. dr. Hidayat Sujuti, PhD., Sp.M, selaku ketua program studi S2 Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas segala ilmu, wejangan, dan motivasi yang telah diberikan kepada penulis

4. Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, Sp.MK (K) dan Prof. Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si, Apt. selaku pembimbing saya atas segala masukan, kritik, dan saran yang beliau berikan ditengah-tengah kesibukan beliau sehingga penulis mampu menyelesaikan tesis ini dengan baik.
5. Ayahanda saya Tatang Sumantri dan ibunda saya tercinta Subur, S.H, Saudara-saudara saya Aditya Pratama, S.S, Advarel Prayoga, S.T, Lita Andiati, Lidyia atas segala doa, kasih sayang, dan dukungan baik moril maupun materiil kepada saya yang tak terhingga sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini
6. Prof. Dr. dr. Kusworini Handono, M.Kes., SpPK, dr. Dewi Santosaningsih M.Kes., Phd dan Dr. dr. Endang Sri Wahyuni, MS. selaku penguji saya yang senantiasa memberikan masukan dan kritik yang membangun dengan sabar
7. Mbak Uci, Mas Slamet, Mbak Suci, Mbak Bunga dan Mas Yudha selaku analis laboratorium Mikrobiologi dan Biomedik yang telah membantu penulis dalam melakukan penelitian
8. dr. Aisha Andriana dan Amira Karina yang senantiasa setia memberikan doa, dukungan dan motivasi bagi penulis dalam segala tahap penyusunan tesis ini
9. Teman-teman penelitian "Adhesion Molecule": dr. Aisyah Amalia, dr. Elsa Larissa, dr. Genitri Indraswari, dr. Septha Rully, dan dr. Merika Soraya yang telah berbagi masa suka dan duka bersama penulis hingga menyelesaikan tesis ini
10. Teman-teman "Adhesion Molecule '17'": Dea Aninditha, S.Ked, Guntur Rizal, S.Ked, Jaya Purna Khamid, S.Ked, Rafif, S.Ked, dan Safira Nur Alita, S.Ked atas segala bantuannya selama penelitian

11. Teman-teman Program *Fast-track* Biomedik angkatan 2017: dr. Aisyah Amalia, dr. Merika Soraya, dr. Arief Fadilah, dr. Elsa Larissa, dr. Ervin Monica, dr. Genitri Indraswari, dr. Primayuni Dhia, dr. Rara Aulia, dr. Septha Rully, dr.

Shelby Amrus dan dr. Melinda yang senantiasa memberi dukungan dan motivasi selama masa suka dan duka perkuliahan hingga penyusunan tesis ini

12. Teman-teman "Warnos": dr. M. Edel Dwi Putra, dr. M. Hazmi Kharismawan, dr. Atier Al-Wifaq, dr. Ridlo Ruditya Putra, dr. M. Aufillah, dan dr. Jordanio Atmaja atas doa dan semangat yang diberikan sehingga mendorong penulis untuk segera menyelesaikan tesis ini dengan baik

13. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan tesis ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu

Akhir kata, penulis menyadari bahwa masih terdapat kekurangan dalam berbagai aspek penulisan tesis ini, sehingga segala masukan dan kritik konstruktif akan sangat berharga guna penyempurnaan penelitian ini sehingga kelak penelitian ini dapat dimanfaatkan secara luas khususnya dalam bidang kesehatan.

Malang, 06 Februari 2020

Penulis

RINGKASAN

dr. Adrian Prasetya, NIM. 166070122011011. Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, 8 Januari 2020. Vaksinasi Peroral Hemaglutinin 49,8 kDa Subunit Pili *Shigella flexneri* Menginduksi Respon Imun Mukosa Ig A Sekretori dan IL-17 Serum Pada Mencit Balb/C. Pembimbing : (1) Prof.Dr.dr. Sumarno, DMM, Sp.MK (K), (2) Prof. Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt, M.Si.

Shigellosis merupakan infeksi diare akut yang disebabkan oleh bakteri *Shigella sp.* Angka kejadian Shigellosis mencapai 188 juta kasus diseluruh dunia dengan *case fatality rate* sekitar 0,09% tiap tahunnya. Walaupun jarang bersifat fatal, Shigellosis berkaitan dengan angka kejadian stunting dan peningkatan resiko mortalitas dari penyakit infeksi lain, oleh karena itu, pencegahan dengan vaksinasi menjadi sangat penting dilakukan. Di Indonesia sendiri, epidemiologi terbaru Shigellosis sulit diketahui secara pasti, karena pemeriksaan laboratorium yang masih terbatas dan tersamarkannya dengan sebutan diare secara umum, namun dari epidemiologi etiologi di beberapa rumah sakit di Indonesia menunjukkan, dari keempat spesies *Shigella sp.*, *Shigella flexneri* merupakan spesies yang paling sering menyebabkan Shigellosis. Hingga saat ini belum ada vaksin yang berlisensi dan efektif yang tersedia untuk *Shigella sp.* dikarenakan banyaknya diversitas antigen O polisakarida strain *Shigella sp.*, oleh karena itu beberapa jenis kandidat vaksin Shigellosis yang masih dalam tahap penelitian dan perkembangan terus digencarkan.

Pengembangan vaksin yang efektif harus didasarkan pada patogenesis mikroba penyebab dan sebagai tahap pertama dalam perjalanan penyakit, *Shigella sp.* harus mampu melakukan adhesi atau perlekatan yang diperankan oleh pili dan OMP. Bakteri yang tidak mampu melakukan adhesi akan dikeluarkan dari tubuh oleh cairan mukus dan gerakan peristaltik tubuh, oleh karena itu vaksinasi dengan bahan antigen pili maupun OMP akan lebih efektif sebagai kandidat bahan vaksin karena mampu mencegah adanya perlekatan tersebut. Beberapa protein pili *Shigella flexneri* juga telah diidentifikasi diantaranya protein dengan berat molekul 49,8 kDa yang memiliki titer hemaglutinin yang paling tinggi. Vaksinasi melalui rute per oral juga dianggap lebih efektif dalam dalam mencetuskan imunitas mukosa yang penting untuk mencegah infeksi patogen yang melibatkan mukosa seperti *Shigella sp.* Selain itu, vaksinasi peroral dinilai lebih ekonomis, tidak invasif dan minimum resiko infeksi akibat penggunaan jarum suntik serta memiliki profil keamanan yang tinggi sehingga cocok diterapkan di negara berkembang seperti di Indonesia.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan adanya peningkatan respon imun yang ditandai peningkatan kadar s-Ig A pada mukosa usus mencit dan peningkatan kadar IL-17 pada serum darah mencit yang divaksinasi dengan molekul hemaglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri*. Metode penelitian dimulai dari kultur *Shigella flexneri* pada media selektif *Salmonella Shigella Agar* dan media *Thioproline carboate Glutamate* (TCG) untuk memperkaya pertumbuhan pili. Hasil kultur bakteri, kemudian dilakukan pemotongan pili dengan *pili cutter* desain Sumarno. Selanjutnya, dilakukan

profiling menggunakan SDS-PAGE dan purifikasi protein dengan metode elektroelusi untuk mendapatkan protein pili dengan berat molekul 49,8 kDa sebagai bahan kandidat vaksin. Pada penelitian ini digunakan hewan coba mencit balb/c jantan usia 6-8 minggu, setelah aklimatisasi selama 1 minggu, kelompok perlakuan kemudian divaksinasi peroral dengan molekul hemagglutinin 49,8 kDa yang telah dikonjugasikan dengan CTB selama 28 hari, yaitu pada hari 7, 14, 21 dan 28. 7 hari setelah dosis vaksin terakhir, mencit kemudian dikorbankan sesuai protokol etik. Selanjutnya, dilakukan pembedahan untuk pengambilan sampel kerokan mukosa usus untuk diukur kadar s-Ig A dan pengambilan darah dari jantung untuk diukur kadar IL-17 dengan metode ELISA. Hasilnya dilakukan analisa statistik.

Berdasarkan hasil uji Mann Whitney untuk data pengukuran kadar IL-17 didapatkan, terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dengan ($p < 0,001$). Sedangkan untuk hasil uji T-independent untuk hasil data pengukuran kadar s-Ig A juga didapatkan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ($p < 0,001$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian molekul hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* sebagai kandidat vaksin dapat mencetuskan respon imun yang penting dalam sistem imun mukosa yang ditunjukkan adanya peningkatan yang bermakna untuk kadar s-Ig A pada mukosa usus mencit dan kadar IL-17 pada serum darah mencit. Namun dari kesimpulan tersebut masih perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui protektifitas molekul hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* sebagai kandidat vaksin dengan metode MLIL dan uji protektifitas terhadap spesies *Shigella sp.* lain untuk pengembangan vaksin yang homolog.



SUMMARY

Adrian Prasetya, MD, NIM. 166070122011011. Magister of Biomedical Science Faculty of Medicine Universitas Brawijaya, Malang, January 8th 2020. Vaccination Via Oral of Hemagglutinin 49,8 kDa Subunits of Pili *Shigella flexneri* Induces Mucosal Secretory Ig A and serum IL-17 in mice Balb/c. Supervisors : (1) Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, Sp. MK (K), (2) Prof. Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt. M.Si.

Shigellosis is an acute diarrheal infection caused by *Shigella sp.* The incidence of Shigellosis reaches 188 million cases worldwide with a case fatality rate of around 0.09% annually. Although rarely fatal, Shigellosis is associated with the incidence of stunting and an increased risk of mortality from other infectious diseases, therefore, prevention by vaccination is very important. In Indonesia alone, the latest epidemiology of Shigellosis is difficult to know with certainty, because laboratory tests are still limited and disguised as diarrhea in general, but from the etiological epidemiology in several hospitals in Indonesia shows, of the four species of *Shigella sp.*, *Shigella flexneri* is a species that is most often causes shigellosis. Until now there is no licensed and effective vaccine available for *Shigella sp.* due to the large diversity of O polysaccharide antigens in the *Shigella sp.* strain, by therefore several types of Shigellosis vaccine candidates that are still in the research and development stage are being intensified.

The development of an effective vaccine must be based on the pathogenesis of the causative microbes and as the first stage in the course of the disease, *Shigella sp.* must be capable of adhesion or attachment played by the pili and OMP. Bacteria that are not capable of adhesion will be removed from the body by mucous fluid and peristalsis, therefore vaccination with pili antigen or OMP will be more effective as a candidate for vaccine material because it is able to prevent the attachment. Several *Shigella flexneri* pili proteins have also been identified including proteins with a molecular weight of 49.8 kDa which have the highest hemagglutinin titers. Vaccination via oral route is also considered to be more effective in triggering mucosal immunity which is important for preventing pathogenic infections involving the mucosa such as *Shigella sp.* In addition, oral vaccination is considered to be more economical, non-invasive and minimizes the risk of infection due to the use of syringes and has a high safety profile so that it is suitable to be applied in developing countries such as Indonesia.

The purpose of this study is to prove an increase in immune response which is marked by an increase in s-Ig A levels in the mucosal intestinal mucosa and an increase in IL-17 levels in blood serum of mice vaccinated with 49.8 kDa hemagglutinin molecule *Shigella flexneri* pili subunits. The research method starts from *Shigella flexneri* culture on selective media Salmonella Shigella Agar and Thioprolin carboate Glutamate (TCG) media to enrich pili growth. The results of bacterial culture, then cut pili with Sumarno's design pili cutter. Furthermore, profiling was done using SDS-PAGE and protein purification by electroelution method to obtain pili protein with molecular weight of 49.8 kDa as vaccine candidate material. In this study, experimental animals used male balb/c mice aged 6-8 weeks. After acclimation for 1 week, the treatment group was

vaccinated orally with a 49.8 kDa hemagglutinin molecule that was conjugated with CTB for 28 days, ie on days 7, 14, 21 and 28. 7 days after the last vaccine dose, mice were then sacrificed according to protocol ethics. Furthermore, surgery was performed to take samples of intestinal mucosal scrapings to measure s-Ig A levels and blood collection from the heart to measure IL-17 levels by the ELISA method. The results were carried out statistical analysis.

Based on the Mann Whitney test results for measurement data IL-17 levels found that there were significant differences between the control group and the treatment group ($p < 0.001$). As for the T-independent test results for the measurement data of s-Ig A levels also found a significant difference between the control group and the treatment group ($p < 0.001$). These results indicate that administration of the 49.8 kDa hemagglutinin molecule subunit of pili *Shigella flexneri* as a vaccine candidate can trigger an important immune response in the mucosal immune system which shows a significant increase in s-Ig A levels in the intestinal mucosa of mice and IL-17 levels in blood serum of mice. However, from this conclusion further research is still needed to determine the effectiveness of the 49.8 kDa hemagglutinin molecule in the *Shigella flexneri* pili subunit as a vaccine candidate by the MLIL method and the test for the protection of the *Shigella sp.* another for the development of homologous vaccines.



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	iii
KATA PENGANTAR	iv
RINGKASAN	vii
SUMMARY	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Akademik	5
1.4.2 Manfaat Praktis	5

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 <i>Shigella flexneri</i>	6
2.1.1 Taksonomi <i>Shigella flexneri</i>	6
2.1.2 Morfologi dan Identifikasi <i>Shigella flexneri</i>	6
2.1.3 Struktur Antigenik <i>Shigella flexneri</i>	7
2.1.4 Peran Pili sebagai Adhesi	8
2.1.5 Patogenesis <i>Shigellosis</i>	10
2.1.6 Manifestasi Klinis <i>Shigella flexneri</i>	12
2.2 Vaksinasi.....	13
2.3 Perkembangan Vaksin Shigella.....	15
2.4 Molekul Hemagglutinin Sebagai Kandidat Vaksin.....	17
2.5 Cholerae Toxin B Sebagai Ajuvan	18
2.6 Respon Imun Mukosa.....	21
2.5.1 <i>Secretory Ig A</i>	22
2.5.2 Interleukin-17.....	24
2.6 Kerangka Teori.....	27

BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep.....	30
3.2 Deskripsi Kerangka Konsep.....	31
3.3 Hipotesis Penelitian.....	31

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian	32
4.2 Jumlah Sampel.....	32

4.3 Kriteria Sampel Hewan Coba	33
4.3.1 Kriteria Inklusi	33
4.3.2 Kriteria Eksklusi	34
4.4 Variabel Penelitian	34
4.4.1 Variabel Bebas	34
4.4.2 Variabel Tergantung	34
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian	34
4.6 Definisi Operasional	34
4.7 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian	35
4.7.1 Alat dan Bahan Kultur Bakteri <i>Shigella flexneri</i>	35
4.7.2 Alat dan Bahan untuk Isolasi Protein Pili	36
4.7.3 Alat dan Bahan Deteksi Molekul Hemagglutinin <i>Shigella flexneri</i>	36
Metode SDS Page	36
4.7.4 Alat dan Bahan untuk Konjugasi Ajuvan CTB	36
4.7.5 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Mencit	36
4.7.6 Alat dan Bahan untuk Persiapan Mukus	37
4.7.7 Alat dan Bahan Pengukuran s-Ig A Metode ELISA	37
4.7.8 Alat dan Bahan Pengukuran IL-17 Metode ELISA	37
4.8 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data	37
4.8.1 Prosedur Kultur Bakteri <i>Shigella flexneri</i>	37
4.8.2 Prosedur Isolasi Protein Pili	38
4.8.3 Prosedur SDS PAGE	38
4.8.4 Prosedur Konjugasi adjuvan CTB	40
4.8.5 Vaksinasi Molekul Adhesin 49,8 <i>Shigella flexneri</i>	41
4.8.6 Prosedur Pembedahan Mencit	41

4.8.7 Prosedur Untuk Persiapan Mukus.....	41
4.8.8 Prosedur Pengukuran Kadar s-Ig A Metode ELISA.....	42
4.8.9 Prosedur Pengukuran IL-17 Metode ELISA.....	43
4.9 Pengumpulan Data dan Analisis Data.....	44
4.10 Alur Penelitian.....	45

BAB 5. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian.....	46
5.1.1 Hasil <i>Profiling</i> Pili <i>Shigella flexneri</i> dengan SDS PAGE	46
5.1.2 Hasil Purifikasi Protein 49,8 kDa Subunit Pili <i>Shigella flexneri</i>	46
5.1.3 Hasil Pengukuran Kadar IL-17 di Serum Darah Mencit.....	47
5.1.4 Hasil Pengukuran Kadar s-Ig A di Mukosa Usus Mencit	48
5.2 Hasil Analisis Data	49
5.2.1 Uji Normalitas dan Uji Homogenitas.....	49
5.2.2 Uji Hipotesis.....	50

BAB 6. PEMBAHASAN

6.1 Vaksin Molekul Hemagglutininn 49,8 kDa Subunit Pili <i>Shigella flexneri</i> Meningkatkan Kadar s-Ig A pada Mukosa Usus Mencit Balb/c.....	54
6.2 Vaksin Molekul Hemagglutininn 49,8 kDa Subunit Pili <i>Shigella flexneri</i> Meningkatkan Kadar IL-17 Pada Serum Darah Mencit Balb/c.	57
6.3 Keterbatasan Penelitian	61

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan	62
----------------------	----

7.2 Saran

62

DAFTAR PUSTAKA

64

LAMPIRAN-LAMPIRAN

76



DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1 Perkembangan Status Kandidat Vaksin Shigella.....	16
Tabel 2.5 Perbandingan Karakteristik Ajuvan Vaksinasi.....	20
Tabel 4.1 Deskripsi Kelompok Perlakuan.....	33
Tabel 4.2 <i>Timeline</i> perlakuan hewan coba.....	33
Tabel 5.1 Hasil Uji <i>Nanodrop</i>	47
Tabel 5.2 Rerata Kadar IL-17.....	47
Tabel 5.3 Rerata Kadar s-Ig A.....	48



DAFTAR GAMBAR

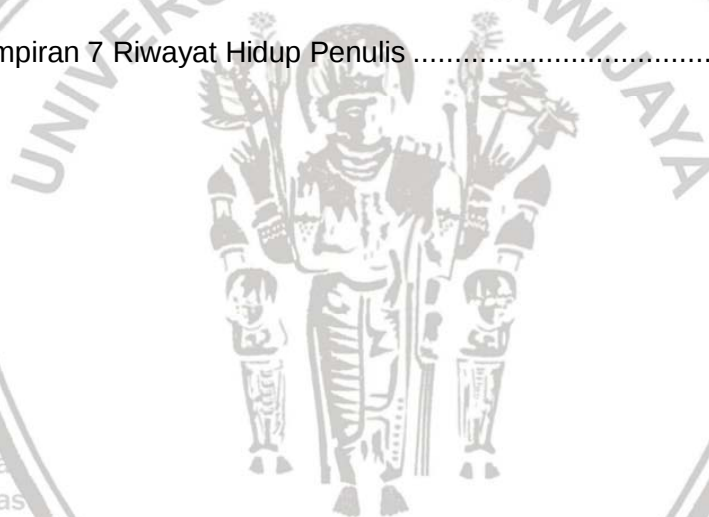
Halaman

Gambar 2.1 Gambaran Koloni dan Mikroskopis <i>Shigella flexneri</i>	7
Gambar 2.2 Struktur Antigenik <i>Shigella sp.</i>	8
Gambar 2.3 Patogenesis Shigellosis.....	11
Gambar 2.4 Pengaturan dan Isu Keamanan Vaksin.....	14
Gambar 2.5 Mekanisme Adhesi Bakteri.....	18
Gambar 2.6 Representasi Skematis IgA.....	23
Gambar 2.7 Fungsi Sitokin IL-17 di Permukaan Epitel Mukosa.....	25
Gambar 2.8 Kerangka Teori.....	27
Gambar 3.1 Kerangka Konsep.....	30
Gambar 4.1 Alur Penelitian.....	45
Gambar 5.1. Hasil Profiling Pili <i>Shigella flexneri</i>	46
Gambar 5.2 Grafik Rerata Kadar IL-17.....	48
Gambar 5.3 Grafik Rerata Kadar s-Ig A.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1 Surat Keterangan Kelaikan Etik.....	76
Lampiran 2 Data Hasil Pengukuran	77
Lampiran 3 Output SPSS.....	79
Lampiran 4 Dokumentasi Penelitian.....	82
Lampiran 5 Surat Keterangan Orisinalitas.....	84
Lampiran 6 Keterangan Submit Jurnal.....	85
Lampiran 7 Riwayat Hidup Penulis	86



DAFTAR SINGKATAN

ASI	: Air Susu Ibu
ADCC	: Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
APC	: Antigen Presenting Cell
Balb/c	: Galur B albino clone
BCG	: Bacille Calmette-Guérin
BHI	: Brain Heart Infusion
CTB	: Cholerae Toxin B
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMBA	: Eosin Methyglene Blue Agar
FHA	: Filamen Hemagglutinin
GALT	: Gut Associated Lymphoid Tissue
GM-CSF	: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HBD	: Human Beta Defensin
Hib	: Haemophilus influenzae tipe B
IL	: Interleukin
IPV	: Inactivated Polio Virus
Ipa	: Invasion Plasmid Antigen
kDa	: Kilo Dalton
LAV	: Live Attenuated Vaccine
LPS	: Lipopolisakarida
LTi	: Lymphoid Tissue Inducer
MALT	: Mucosal Associated Lymphoid Tissue
NF-κB	: Nuclear Factor Kappa Beta
NO	: Nitric Oxide
MAP Kinase	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MMP	: Matriks Metalloproteinase

Mxi	: Membrane Excretion Protein
OMP	: Outer Membrane Protein
OPV	: Oral Polio Vaccine
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PD3I	: Penyakit Yang Dapat Dicegah Dengan Imunisasi
pH	: Power of Hydrogen
RSB	: Reducing Sample Buffer
SDS PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
ShET	: Shigella Enterotoxin
s-Ig A	: secretory Immunoglobulin A
Spa	: Surface presentation antigen
SPSS	: Statistical Product Service Solution
SSA	: Salmonella Shigella Agar
TCA	: Trichloroacetic Acid
TCG	: Thioproline Carbonate Glutamate
TGF-β	: Transforming Growth Factor β
TT	: Tetanus Toxoid
Vir	: Virulence proteins
WHO	: World Health Organization

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Penyakit diare saat ini masih menjadi masalah yang cukup serius di negara berkembang termasuk di Indonesia, hal ini dapat dilihat dari angka kesakitan yang selalu ada tiap tahun dan tingginya angka morbiditas dan mortalitas (Kemenkes, 2011). Pada tahun 2016, diare termasuk ke dalam 10 penyakit penyebab kematian terbanyak di dunia yang mengakibatkan 1,4 juta orang meninggal (WHO, 2016).

Diare dapat disebabkan oleh adanya infeksi virus, parasit, jamur maupun bakteri penyebab diare yang memang sejak awal bersifat patogenik, maupun yang semula bersifat oportunistik. Shigellosis merupakan infeksi akut yang disebabkan oleh bakteri *Shigella sp.* yang dapat sangat mudah menular melalui sanitasi air bersih dan makanan yang terkontaminasi, oleh karena itu, infeksi bakteri Shigellosis dapat menyebabkan kejadian luar biasa seperti epidemik dan pandemik luas pada abad ke-19 (Bakhtiar, 2016).

Angka kejadian Shigellosis mencapai 188 juta kasus di seluruh dunia dengan *case fatality rate* sekitar 0,09% tiap tahunnya (Kotloff, 2018). Walaupun saat ini, jarang bersifat fatal, diare Shigellosis berkaitan dengan kejadian *stunting* dan peningkatan resiko mortalitas dari penyakit infeksi lain. Survei yang dilakukan oleh Anderson di tahun 2015, di 79 negara dengan *low income countries* (LICs) dan *lower middle income countries* (LMICs) menunjukkan peningkatan mortalitas penyakit infeksi karena *stunting* hingga 28% pada anak dengan riwayat episode Shigellosis (Anderson et al., 2019). Di negara berkembang termasuk Indonesia, Shigellosis merupakan penyebab diare berdarah terbanyak pada anak usia di bawah lima tahun dan penyebab kedua terbanyak dari diare secara keseluruhan. Proporsi *Shigella sp.* sebagai penyebab diare berdarah dari hasil survey pada

balita di rumah sakit di Indonesia menunjukkan *Shigella dysenteriae* 5,9%, *Shigella flexneri* 70,6%, *Shigella boydii* 5,9% dan *Shigella sonnei* 17,6 % (Santoso et al., 2004). Penelitian serupa, di Rumah Sakit Mampang di Jakarta Selatan juga menunjukkan, *Shigella flexneri* (63,2%) merupakan spesies yang paling sering diisolasi dari genus *Shigella sp.* dari feses penderita dan ditemukannya beberapa kasus yang resisten terhadap beberapa antibiotik seperti ampicilin (86,1%), chloramphenicol (83,3%), tetracycline (94,4%), dan trimethoprim-sulfamethoxazole (66,7%) juga menjadi tantangan baru dalam penanganan Shigellosis (Herwana et al., 2010). Namun untuk data epidemiologi Shigellosis di Indonesia yang terbaru sulit diketahui secara pasti, karena pemeriksaan laboratorium yang masih terbatas dan tersamarkannya dengan sebutan diare secara umum.

Pencegahan maupun eradikasi penyakit infeksi yang paling efektif saat ini adalah dengan melakukan vaksinasi, oleh karena itu vaksinasi dianggap salah satu pencapaian yang luar biasa dalam sejarah kedokteran (WHO, 2013). Salah satu contoh keberhasilan vaksinasi dalam pencegahan penyakit infeksi adalah vaksin pertusis, dan salah satu komponen yang paling poten dalam vaksin pertusis adalah *filamentous hemagglutinin* yang merupakan molekul adhesin (Inatsuka et al., 2005). Namun saat ini belum ada vaksin berlisensi dan efektif yang tersedia untuk *Shigella sp.* dikarenakan banyaknya diversitas strain *Shigella sp.*, oleh karena itu beberapa jenis kandidat vaksin Shigellosis yang masih dalam tahap penelitian dan perkembangan terus digencarkan. Vaksin Shigellosis tersebut menjadi penting untuk dikembangkan untuk daerah dengan resiko infeksi yang tinggi, selain lima kunci keamanan pangan yang terus ditingkatkan.

Dalam perjalanan penyakitnya, *Shigella sp.* harus melakukan perlekatan ke sel inang yang diperankan oleh suatu molekul adhesin. Molekul ini berperan penting dalam faktor virulensi untuk mencegah bakteri patogen tereliminasi oleh

sistem pertahanan tubuh. Kemampuan suatu protein bakteri dalam melakukan adhesi tersebut dapat diketahui dari uji hemaglutinasi. Hemaglutinin merupakan kemampuan suatu protein dalam menggumpalkan eritrosit mencit, yang berkorelasi langsung dengan kemampuan adhesi dan kolonisasi dari suatu bakteri dan terdapat persamaan karakteristik reseptor (Mitra, *et al.*, 2012). Pada penelitian yang dilakukan oleh Anam pada tahun 2016, telah mengidentifikasi molekul hemaglutinin *Shigella sp.* dari subunit pili dengan berat molekul 7,9 kDa; 11,2 kDa; 27,3 kDa; 49,8 kDa; dan 85 kDa (Anam *et al.*, 2016). Pada penelitian tersebut juga menunjukkan diantara berat molekul tersebut, molekul 49,8 kDa memiliki titer hemaglutinin yang paling tinggi sehingga ideal dapat dijadikan sebagai bahan kandidat vaksin (Anam *et al.*, 2016).

Pada penelitian lain, yang dilakukan Sumarno pada tahun 2015 telah membuktikan bahwa pemberian molekul hemaglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella dysenteriae* protektif untuk mencegah diare pada mencit dengan metode *Mice Ligated Ileal Loop* (MLIL) (Sumarno *et al.*, 2015). Namun pada penelitian tersebut, belum dibuktikan, apakah pemberian molekul hemaglutinin, mampu menginduksi respon imun, yang ditandai bangkitnya berbagai efektor imun seperti *secretory Ig A* yang merupakan efektor utama dalam sistem imun mukosa. Di penelitian lain, juga telah diketahui bahwa terdapat perbedaan epitop antara molekul hemaglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella dysenteriae* dengan molekul hemaglutinin 49,8 kDa *Shigella flexneri* maupun *Shigella sonnei* tapi terdapat persamaan dengan *Shigella boydii* berdasarkan perbedaan reaksi imunologis dari pemeriksaan western blot dan dot blot (Anam *et al.*, 2016). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* untuk membuktikan apakah pemberian vaksin molekul hemaglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* mampu memberikan protektifitas yang ditunjukkan dengan bangkitnya sel-sel efektor imun.

Respon imun adaptif yang penting bagi mukosa usus utamanya diperankan oleh antibodi *secretory Ig A*. Mekanisme imun mukosa ini sangatlah penting untuk mencegah masuknya mikroorganisme patogen, alergen maupun karsinogen (Brandtzaeg, 1983). Beberapa *secretory Ig A* dapat melakukan *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) dan meningkatkan kapasitas fagositosis melalui reseptor Fc α . Adanya *secretory Ig A* sebagai sistem pertahanan spesifik “*first line*” yang utama menunjukkan bahwa kelenjar eksokrin dan mukosa sekretorius mengandung sebagian besar sel B yang teraktivasi (Brandtzaeg *et al.*, 1989; Killian dan Russell, 1994). Interleukin 17 sebagai sitokin proinflamasi banyak ditemukan disekresikan oleh sel T yang teraktivasi. IL-17R akan mengaktifkan NF- κ B dan jalur MAP kinase untuk memproduksi sitokin proinflamasi dan perekrutan mieloid ke area yang mengalami inflamasi (Jin dan Dong, 2013). Di mukosa, IL-17 berperan sebagai mediator protektif dengan beberapa mekanisme yaitu menjaga integritas pelapis pelindung, memproduksi faktor antimikroba yang akan menahan patogen pada pelindung dan perekrutan neutrofil (Perez-Lopez, 2016). Di penelitian lain juga diketahui, IL-17 berperan penting dalam meningkatkan ekspresi reseptor pIgR yang penting dalam komponen *secretory immunoglobulin A* (Kumar *et al.*, 2013).

Oleh karena itu peneliti ingin membuktikan apakah pemberian vaksin molekul hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* mampu memberikan protektifitas yang ditunjukkan dengan bangkitnya sel-sel efektor imun seperti s-Ig A pada mukosa usus dan IL-17 pada serum darah mencit.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang tersebut, maka dapat dibuat rumusan masalah sebagai berikut: Apakah terdapat peningkatan respon imun yang ditandai peningkatan kadar s-Ig A pada mukosa usus mencit dan peningkatan kadar IL-17

pada serum darah mencit yang divaksinasi dengan molekul hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri*.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Membuktikan adanya peningkatan respon imun pada mencit yang divaksinasi dengan molekul hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri*.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Membuktikan adanya peningkatan kadar s-Ig A pada mukosa usus mencit yang divaksinasi dengan molekul hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri*.
2. Membuktikan adanya peningkatan kadar IL-17 pada serum darah mencit yang divaksinasi dengan molekul hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri*.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Akademik

Sebagai dasar teori untuk menambah wawasan ilmu pengetahuan peneliti dan referensi untuk pengembangan penelitian selanjutnya, khususnya molekul hemagglutinin *Shigella flexneri* sebagai kandidat untuk vaksin.

1.4.2. Manfaat Praktis

Pengembangan molekul hemagglutinin sebagai kandidat vaksin untuk pengembangan vaksin yang efektif dan efisien untuk mencegah diare yang disebabkan oleh *Shigella sp.*

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Shigella flexneri*

2.1.1 Taksonomi *Shigella flexneri*

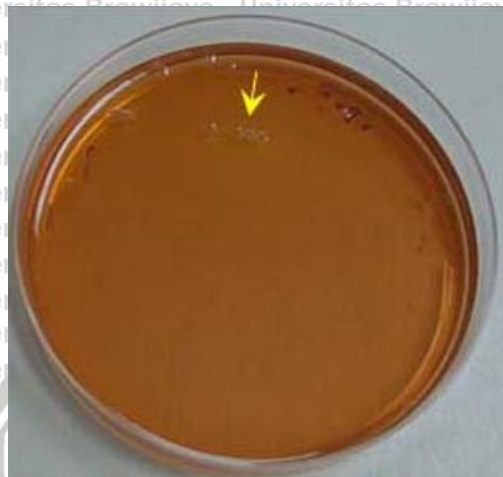
Shigella flexneri pertama kali diisolasi oleh Castellani & Chalmers pada tahun 1919. Taksonomi *Shigella flexneri* adalah sebagai berikut (ITIS, 2012) :

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Shigella</i>
Spesies	: <i>Shigella flexneri</i>

2.1.2 Morfologi dan Identifikasi *Shigella flexneri*

Shigella flexneri merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang dengan ukuran diameter 0,3 - 1 µm dan panjang 1 - 6 µm. Bakteri ini tidak berspora dan bersifat non motil. *Shigella sp.* tergolong ke dalam organisme anaerob fakultatif, tumbuh optimal pada suhu 37°C dan pH 6,4-7,8. Beberapa media yang dapat digunakan untuk isolasi bakteri diantaranya *Salmonella Shigella Agar (SSA)*, *MacConkey*, *Eosin Methylene Blue Agar (EMBA)*. Pada medium *SSA*, *Shigella sp.* tidak memfermentasi laktosa ataupun menghasilkan gas, hidrogen sulfida, sehingga akan tampak koloni tak berwarna, sedangkan *Salmonella sp.* tidak akan

memfermentasi laktosa, tetapi menghasilkan gas hidrogen sulfida (H_2S) sehingga akan tampak koloni tak berwarna dengan hitam ditengahnya. Dari hasil reaksi biokimia lain, *Shigella flexneri* memberikan hasil Catalase (+) Citrate (-) H_2S (-) Indol (bervariasi) Oksidase (-) Urease (-) Voges-Proskauer (-) Lysin (-), Ornithin (-), Arginine (-) ONPG (-) Mannitol (+) Xylose (-) Mannose (+) (Aryal, 2019).



(a)



(b)

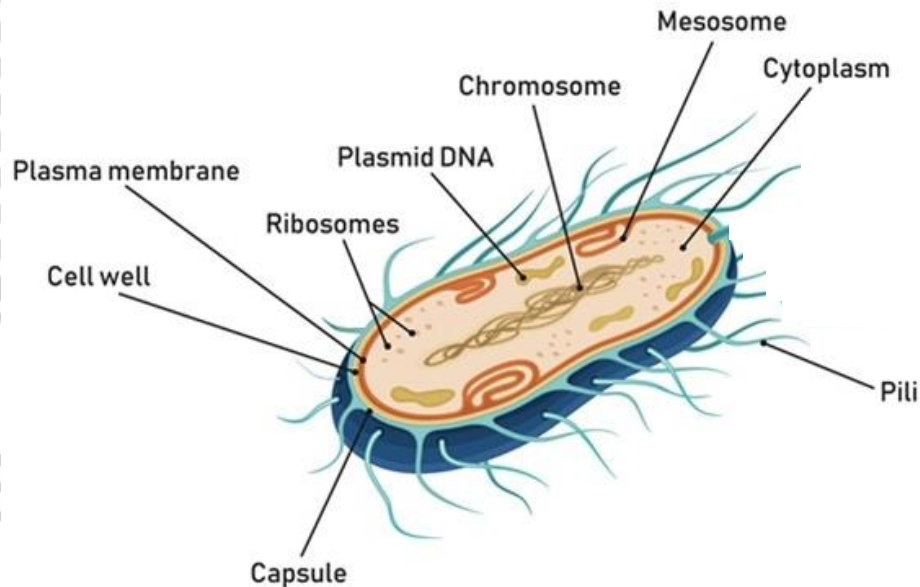
Gambar 2.1 (a) Koloni *Shigella flexneri* Pada Medium *Salmonella Shigella* Agar (Aryal, 2019) dan (b) Gambaran Mikroskopis *Shigella flexneri* dengan pewarnaan gram perbesaran 100x (Microbe-canvas, 2019)

Keterangan : (a) Koloni bakteri *Shigella flexneri*, tampak berwarna pucat karena tidak memfermentasi laktosa; (b) bakteri *Shigella flexneri* berbentuk batang Gram negatif dengan ukuran diameter 0,3 - 1 μm dan panjang 1 - 6 μm dan berwarna merah.

2.1.3 Struktur Antigenik *Shigella flexneri*

Shigella memiliki struktur antigen yang sangat kompleks. Sebagian besar *Shigella* memiliki antigen flagella H dan antigen somatik O yang juga dimiliki oleh bakteri enterik patogen lain. Struktur antigen O (somatik) *Shigella flexneri* merupakan suatu liposakarida yang terdapat pada *outer membrane protein* (OMP) bakteri. Variasi dan spesifisitas serologik antigen O merupakan dasar utama perbedaan serotipe bagi hampir semua bakteri gram negatif, khususnya *Shigella* karena kurangnya antigen H dan K (Liu, 2008).

Berdasarkan antigen O (somatik) tersebut, *Shigella* dapat dibedakan menjadi empat subkelompok dan kemudian dibedakan lebih dalam lagi tergantung serotipe. *S. dysenteriae* (Grup A) terdiri 15 serotipe antigen yang berbeda, *S. flexneri* (Grup B) terdiri dari 6 serotipe, *S. boydii* (Grup C) terdiri dari 20 serotipe dan *S. sonnei* (Grup D) hanya mengandung 1 serotipe antigen (SMIs, 2013).



Gambar 2.2 Struktur Antigenik *Shigella* sp. (Viva, 2019)

2.1.4 Peran Pili sebagai Adhesi

Sebagai tahap pertama dalam perlekatan bakteri terhadap inang, pili memegang peranan penting dalam awal proses infeksi. Pili merupakan protein tipis berbentuk tabung yang berasal dari membran sitoplasma yang banyak ditemukan pada bakteri Gram negatif. Pada pili terdapat poros yang terdiri dari protein yang disebut pilin. Pada ujung poros tersebut terdapat suatu perekat yang memiliki bentuk yang sesuai dengan reseptor glikoprotein atau glikolipid spesifik pada sel inang. Ikatan yang terbentuk antara pili dengan reseptor sel inang membentuk suatu ligan intermolekuler yang bersifat spesifik dan komplementer.

Karena bakteri dan sel inang sama-sama memiliki muatan negatif, memungkinkan

pili untuk berikatan dengan reseptor bakteri tanpa harus cukup dekat untuk didorong menjauh oleh tolakan elektrostatis. Setelah menempel pada sel inang, pili dapat me-depolimerisasi dan memungkinkan adhesi pada dinding sel bakteri untuk membuat kontak yang lebih intim (Kaiser, 2019).

Protein yang terdapat pada pili bakteri dikenali sebagai antigen oleh tubuh dan dapat menginisiasi respon imun adaptif. Bagian atau fragmen dari antigen protein yang terdapat pada pili dapat bereaksi dengan antibodi dan reseptor limfosit B dan limfosit T. Epitop tersebut merupakan sekelompok 5-15 asam amino dengan bentuk unik yang membentuk sebagian protein antigen, atau 3-4 residu gula bercabang dari antigen polisakarida (Kaiser, 2019). Pili bakteri *Shigella* sp. juga telah diketahui yaitu dengan berat molekul, 7,9 kDa; 11,2 kDa; 27,3 kDa; 49,8 kDa; dan 85 kDa (Anam *et al.*, 2016).

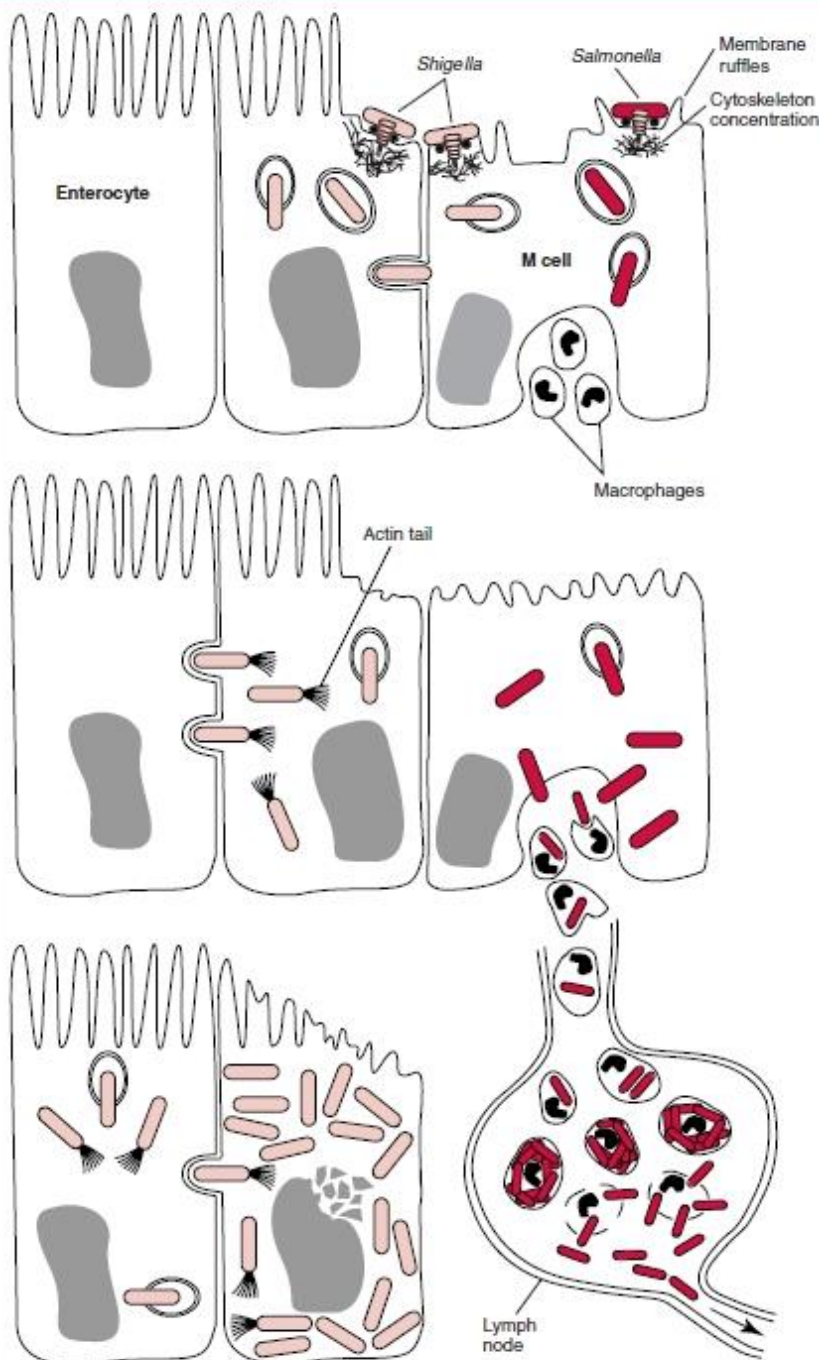
Penelitian lain yang dilakukan Zumsteg *et al.* (2014), berhasil mengidentifikasi protein IcsA sebagai protein adhesin dari *Shigella flexneri*. IcsA sebagai protein adhesin diregulasi oleh sistem sekresi tipe 3 yang teraktivasi sebagai respons terhadap *bile salt deoxycholate*. IcsA diekspresikan oleh baik itu strain *Shigella* adhesif dan non-adhesif, walaupun belum diketahui bagaimana *IcsA-dependent adhesion* diatur pada tingkatan molekuler. Reseptor sel inang IcsA pun juga belum diketahui secara pasti walau diperkirakan reseptor target IcsA didistribusikan secara luas. *IcsA-dependent adhesion* menunjukkan dapat berikatan pada sel epitel, makrofag, dan PMN maupun protein sel inang (N-WASP, ATG5, dan vinculin). Selain sebagai protein adhesin, IcsA juga diketahui berperan dalam menghindari respon inang melalui *actin-based motility* yang dimediasi autotransporter protein IcsA (VirG) (Zumsteg *et al.*, 2014).

2.1.5 Patogenesis Shigellosis

Secara umum, perjalanan suatu bakteri dalam menimbulkan penyakit terdiri dari dua tahap. Tahap pertama diawali dengan adanya perlekatan bakteri yang diperankan oleh pili, perlekatan tersebut bersifat sebagai *anchoring*, yang kemudian dilanjutkan melalui *outer membrane protein* (OMP) yang bersifat *docking*. Setelah terjadi perlekatan, bakteri patogen akan melakukan kolonisasi dan sekresi metabolit yang merugikan *host* (Salyer, 2002). Tingkat virulensi suatu bakteri patogen sangatlah dipengaruhi oleh jumlah inokulum bakteri, *port de entry*, sistem imun *host* dan faktor virulensi bakteri patogen tersebut. Karena sifatnya yang tahan asam, *Shigella sp.* mampu melewati asam lambung sehingga ingesti 10-100 bakteri saja sudah dapat mencetuskan gejala penyakit. Infeksi Shigellosis ditandai dengan adanya degenerasi epitel dan radang pada lamina propria yang menyebabkan deskuamasi dan ulserasi mukosa sehingga terjadi kebocoran darah, elemen inflamasi dan lendir ke dalam lumen usus (Philpott, 2000).

Tingkat virulensi *Shigella sp.* juga dipengaruhi kemampuan bakteri dalam menghindari degradasi oleh enzim lisosom. DNA bakteri mengkode sejumlah protein plasmid dan kromosom berupa *invasion plasmid antigens* (Ipa), *surface presentation antigens* (Spa), *membrane excretion proteins* (Mxi), and *virulence proteins* (Vir). VirF akan menginduksi ekspresi protein VirB yang akan mengaktifkan promotor Ipa, Mxi dan Spa sehingga akan terbentuk protein kompleks *Mxi-Spa translocon*. Ketika bakteri melakukan kontak dengan membran sel epitel, protein kompleks *Mxi-Spa translocon* akan teraktivasi dan menyekresikan protein Ipa yang telah disintesis sebelumnya. Protein IpaB, IpaC dan IpaA akan membentuk kompleks yang akan berinteraksi dengan membran sel epitel *host* untuk menginduksi kaskade sinyal seluler sehingga terjadi fagositosis. Setelah terjadi fagositosis, bakteri *Shigella sp.* mampu menginduksi terjadinya degradasi diperantarai *plasmid-encoded contact hemolysin* yang merupakan

komponen hemolitik yang membutuhkan kontak dengan membran sel inang (Todar, 2012).



Gambar 2.3 Patogenesis Shigellosis (Ryan et al., 2004)

Shigella sp. juga mengeluarkan toksin berupa *Shigella enterotoxin* (ShET1 dan 2), *Shigatoxin* dan *endotoxin*. *Shigella enterotoxin* 1 (ShET1) dan ShET2, yang diproduksi oleh beberapa *strain* *Shigella*, menginduksi sekresi cairan ke dalam usus, sehingga menyebabkan fase diare encer sedangkan *Shigatoxin*, yang hanya diproduksi oleh *Shigella dysenteriae* serotipe 1, bersifat sitotoksik yang memicu kerusakan vaskular di usus besar, ginjal, dan sistem saraf pusat (Schroeder, 2008).

2.1.6 Manifestasi Klinis Shigellosis

Manifestasi klinis diare Shigellosis dapat berkisar dari diare ringan hingga diare disentri basil yang berat yang ditandai dengan kram perut yang kuat, demam, dan feses yang mengandung darah dan lendir. Penyakit ini biasanya bersifat *self-limiting* sehingga dapat sembuh sendiri namun dapat juga mengancam jiwa jika pasien *immunocompromised* atau jika perawatan medis yang memadai tidak tersedia. Kerusakan jaringan yang terjadi akibat invasi dan toxin *Shigella* sp. Mengakibatkan adanya gangguan absorpsi air, nutrisi, dan zat terlarut yang dapat menyebabkan diare cair hingga diare berlendir dan berdarah. Gangguan homeostasis elektrolit dan perubahan dalam proses transportasi membran, seperti sekresi cairan dan ion yang tidak terkontrol memberikan gambaran dehidrasi pada Shigellosis (Schroeder, 2008).

Dehidrasi yang terjadi memberikan gambaran turgor kulit menurun, mata cekung, mukosa kering, gelisah dan kaki tangan keriput seperti terendam lama di air (*washer woman's hands*) hingga nadi perifer tidak teraba dan tekanan darah tidak dapat diukur. Syok hipovolemik yang drastis menyebabkan pasien mengalami hipokalemia dan mengakibatkan kram otot yang nyeri dan pada kasus yang parah dapat mengakibatkan nefropati hipokalemik dan nekrosis miokard fokal. Asidosis laktat dan hilangnya bikarbonat feses yang diakibatkan dehidrasi,

menyebabkan penurunan pH darah, bikarbonat plasma, dan peningkatan serum anion gap (Sharmila, 2018).

2.2 Vaksin

Salah satu pencapaian yang luar biasa dalam sejarah kedokteran dalam pencegahan dan eradikasi penyakit infeksi adalah vaksinasi. Vaksinasi merupakan suatu proses yang merangsang respons imun adaptif yang protektif terhadap mikroba melalui paparan terhadap bentuk yang tidak patogen atau komponen dari mikroba (Abbas *et al.*, 2016). Edward Jenner, seorang dokter asal Inggris, dianggap sebagai orang yang pertama kali memperkenalkan konsep vaksinasi modern setelah pada tahun 1796, ia berhasil melakukan inokulasi dengan bahan yang didapatkan dari *pustule cowpox* (cacar sapi) kepada seorang pasien. Ia juga dikenal sebagai “bapak imunologi” (WHO, 2013). Sampai saat ini terdapat lebih dari 20 jenis vaksin untuk penyakit menular yang dapat dicegah dengan imunisasi (PD3I) diantaranya polio, difteri, campak, dll

Saat ini terdapat berbagai jenis vaksin berdasarkan antigen yang digunakan diantaranya *live attenuated vaccine* (LAV), *inactivated vaccine*, subunit (antigen yang dimurnikan) dan toksoid (toksin tidak aktif). Formulasi yang terkandung di dalam vaksin akan mempengaruhi cara pemakaian dan cara penyimpanan vaksin tersebut. Vaksin dengan bahan antigen *live attenuated vaccine* (LAV) menggunakan mikroba yang dilemahkan dengan menghilangkan kemampuan infeksi dan patogenesitasnya, sementara tetap mempertahankan antigenisitasnya. Beberapa vaksin yang menggunakan tipe ini diantaranya tuberkulosis (BCG), vaksin polio peroral (OPV), measles dan yellow fever. Bila antigen yang digunakan untuk memicu respon imun tubuh adalah mikroba yang sudah dimatikan, vaksin tersebut termasuk ke dalam tipe *inactivated vaccine*.

Contoh dari vaksin tipe ini adalah *pertussis whole-cell* (wP) dan *inactivated polio virus* (IPV). Terdapat juga vaksin dengan bahan antigen berupa subunit yang sudah dimurnikan, contohnya adalah pertusis (aP), *Haemophilus influenzae* tipe b (Hib) dan Hepatitis B (HepB). Sedangkan contoh vaksin yang menggunakan antigen berupa toksin adalah tetanus (TT) dan difteri (WHO, 2013).

		1955 Polio (IPV) 1962 Polio (OPV) 1963 Measles 1967 Mumps 1969 Meningitis A		
	1923 Diphtheria	1970 Rubella	1981 Hepatitis B	
1798 Smallpox	1923 Tuberculosis	1972 <i>Haemophilus influenzae</i>	1986 Meningitis B	
1885 Cholera	1924 Tetanus	1976 Viral influenza	1989 Hepatitis A	
1885 Rabies	1926 Pertussis	1976 Pneumococcal polysaccharide	1995 Varicella zoster	2000 Pneumococcal conjugate
1891 Anthrax	1927 Tetanus	1977 Meningitis C (polysaccharide)	1998 Rotavirus	2006 Human papilloma virus
1896 Typhoid	1935 Yellow fever		1999 Meningitis C (conjugate)	
1897 Plague	1943 Typhus			
1800 – 1899	1900 – 1949	1950 – 1979	1980 – 1999	2000

Gambar 2.4 Pengaturan dan Isu Keamanan Vaksin Sebelum dan Setelah Lisensi (WHO, 2013)

Vaksinasi bekerja dengan cara memicu respon sistem imun tubuh sehingga terbentuk kekebalan jangka panjang yang biasanya hanya akan didapat setelah infeksi alamiah, sehingga apabila mikroba penyebab tersebut menginfeksi kembali, reaksi imunitas yang lebih kuat akan muncul. Antigen yang terdapat pada vaksin akan dipresentasikan oleh *antigen presenting cell* (APC) dan dikenali oleh limfosit T *helper*, yang berperan dalam aktivasi sel B. Respon antibodi yang terbentuk dapat melalui sel T (*T-dependent antibody response*) maupun tanpa melalui sel T (*T-independent antibody response*). Antibodi yang terbentuk melalui sel T terjadi perubahan isotype rantai berat yang lebih banyak serta maturasi afinitas sehingga memori yang terjadi lebih baik dibandingkan antibodi yang terbentuk tanpa melalui sel T (Siegrist, 2008). Vaksinasi melalui mukosa dapat menginduksi imunitas mukosa yang penting untuk mencegah perlekatan dan

terbentuknya kolonisasi bakteri patogen enterik seperti *Shigella sp.*, *Vibrio cholerae* dan *Helicobacter pylori* di mukosa (Holmgren, 2005).

2.3 Perkembangan Vaksin Shigella

Agar strategi pengendalian penyakit diare menjadi efektif perlu dilakukan langkah pencegahan dan pengobatan yang tepat. Langkah tersebut diantaranya adalah peningkatan sanitasi, ASI eksklusif, jamban sehat dan vaksinasi. Namun saat ini tidak ada vaksin berlisensi dan efektif yang tersedia untuk *Shigella sp.*. Saat ini terdapat beberapa jenis kandidat vaksin shigella yang masih dalam tahap penelitian dan perkembangan.

Vaksin Shigella dengan bahan antigen *live attenuated vaccine* (LAV) pertama kali dikembangkan oleh Mel *et.al* pada tahun 1965 dari *Military Medical Institute* (Belgrade) dengan menggunakan beberapa strain *streptomycin-resistant* dan *streptomycin-dependent* yang dikombinasikan ke dalam satu vaksin. *Live attenuated vaccine* (LAV) Shigella lain diantaranya, vaksin *Shigella flexneri* 2a strain T32-Istrati dari *Lanzhou Institute of Biological*, vaksin SC602 yang menggunakan strain *Shigella flexneri* 2a dari *Pasteur Institute*, vaksin WRSS1 dan WRAIR, dari *Walter Reed Army Institute of Research* yang menggunakan strain *Shigella sonnei* Mosley dan *Shigella dysenteriae* 1 dan vaksin 2457T strain *Shigella flexneri* 2a dari *University of Maryland Center for Vaccine Development* (Kweon, 2008).

Vaksin Shigella dengan bahan antigen terkonjugasi diantaranya vaksin yang dikembangkan oleh *The National Institutes of Health's National Institute of Child Health and Human Development* yang terdiri dari O-polysaccharides *Shigella dysenteriae* type I LPS yang dikonjugasikan dengan tetanus toxoid dan *Shigella*

flexneri dan *Shigella sonnei* LPS yang dikonjugasikan dengan eksotoksin A *Pseudomonas aeruginosa* rekombinan (rEPA), GlycoVaxyn dari *Institute of Pasteur* yang dikonjugasikan dengan toksin labil dari enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) (Mani, 2016).

Tabel 2.1 Perkembangan Status Kandidat Vaksin Shigella (Mani, 2016)

Candidate Name/Identifier	Preclinical	Phase I	Phase II	POC	Phase III
Cellular candidates					
GuaBA-based live attenuated (CVD1208S) [UMB]		X			
VirG-based live attenuated (WRSS1, WRSs3, WRSf3) [WRAIR]			X		
Ty21a typhoid vaccine expressing <i>Shigella</i> LPS [Protein Potential]	X				
Inactivated trivalent <i>Shigella</i> whole cell [PATH]		X			
Glycoconjugate candidates					
Chemically prepared glycoconjugate [NICHHD/LDMI]					X
Recombinant glycoconjugate [GlycoVaxyn]		X			
Synthetic glycoconjugate [Institut Pasteur]	X				
Novel antigen candidates					
InvaplexAR [WRAIR]	X				
GMMA [NVGH]			X		
OMV [University of Navarra]	X				
Subunit candidates					
DB Fusion [PATH]	X				
PSSP1 [International Vaccine Institute]	X				
34kDa OMP [National Institute of Cholera and Enteric Diseases]	X				

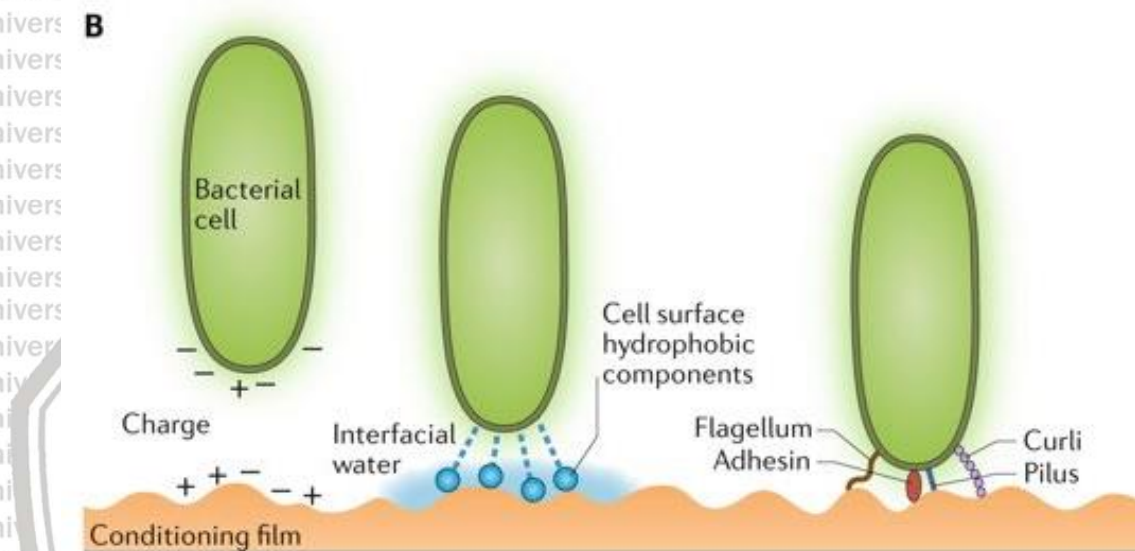
Vaksin *Shigella* berbahan lain yang juga sedang dikembangkan diantaranya, *Shigella ribosomal subunit vaccines* (SRV) dari *International Vaccine Institute Seoul* yang terdiri dari O-antigen dan ribosom yang juga bertindak sebagai

ajuvan, vaksin *formalin-inactivated whole Shigella sonnei* yang dikembangkan dari media *brain heart infusion* (BHI) untuk meningkatkan immungenitas vaksin, vaksin *Shigella invasion complex* (Invaplex) yang terdiri dari *invasion plasmid antigens* B dan C (IpaB, IpaC) dan LPS, vaksin *recombinant noninvasive Shigella mutant* yang mengekspresikan Yersinia invasin (Δ ipa β /inv) (Kweon, 2008).

2.4 Molekul Hemagglutinin Sebagai Kandidat Vaksin Berbasis Molekul Adhesin

Tujuan utama adanya vaksinasi berbahan hemagglutinin adalah menghasilkan respons imun tubuh perlindungan jangka panjang terhadap patogen dengan menghalangi adanya perlekatan bakteri dengan reseptor sel inang dan kolonisasi pada permukaan mukosa, mungkin menjadi strategi yang paling efektif untuk mencegah infeksi (Wizemann, 1999). Perlekatan bakteri tersebut diperankan oleh suatu molekul adhesin. Adanya perlekatan tersebut mencegah bakteri patogen tersingkirkan secara mekanis. Perlekatan bakteri gram negatif maupun positif diperankan oleh suatu bakterial lectin, yang merupakan tipe adhesin yang paling umum. Pada bakteri *Shigella*, perlekatan tersebut diperankan oleh pili yang bersifat sebagai *anchoring*, dan dilanjutkan dengan perlekatan melalui *outer membran protein* (OMP) yang bersifat sebagai *docking* (Salyer, 2002). Kemampuan suatu protein bakteri dalam melakukan adhesi tersebut dapat diketahui dari uji hemagglutinasinya. Hemagglutinin merupakan kemampuan suatu protein dalam menggumpalkan eritrosit mencit, yang berkorelasi langsung dengan kemampuan adhesi dan kolonisasi dari suatu bakteri (Mitra, et al., 2012). Pada penelitian yang dilakukan oleh Anam pada tahun 2016, telah mengidentifikasi molekul hemagglutinin *Shigella sp.* dari subunit pili dengan berat molekul 7,9 kDa; 11,2 kDa, 27,3 kDa; 49,8 kDa; dan 85 kDa (Anam et al., 2016)

Subunit vaksin berupa molekul adhesin yang sudah dimurnikan contohnya terdapat pada vaksin pertusis (aP). Pada vaksin pertusis aselular (aP) terkandung molekul adhesin berupa *filamen hemagglutinin* (FHA) dan *pertactin* yang penting dalam patogenesis *Bordetella pertussis* (Wizemann, 1999). Subunit nonpilus adhesin lain yang telah diidentifikasi dan dimurnikan berasal dari *Helicobacter*



pylori. Adhesin *Leb-binding* memediasi perlekatan bakteri terhadap *fucosylated Lewis b* (Leb), kelompok antigen *histoblood*, yang diekspresikan sepanjang permukaan mukosa epitel lambung (Ilver, 1998).

Gambar 2.5 Mekanisme Adhesi Bakteri (Berne et al., 2018)

2.5 Cholerae Toxin B Sebagai Ajuvan

Pada era penemuan awal vaksinasi, banyak digunakan pendekatan vaksinasi berbahan patogen hidup atau hidup yang dilemahkan dengan tujuan menginduksi imunitas adaptif, namun pendekatan tersebut beresiko terjadi re-aktivasi, oleh karena itu, pengembangan vaksinasi berbahan material non-patogenik seperti toksin yang diinaktivasi, peptide sintesis, dan protein sub-unit

rekombinan banyak diteliti. Namun, pendekatan vaksin berbahan non-patogenik tersebut memiliki kelemahan berupa imunogenisitas yang kurang baik, degradasi material saat melewati sistem pertahanan tubuh, dan modulasi imunitas mukosa sehingga toleransi tidak terbentuk, sehingga perlu diberikan material tambahan untuk meningkatkan potensi kapasitas vaksinasi yaitu ajuvan. Ajuvan memiliki fungsi stimulator sistem imun, diantaranya dengan cara berikatan molekul reseptor intraseluler seperti *Toll-like receptor* (TLR), *Nod-like receptor*, dan reseptor RIG-1-like dan sensor DNA sitosolik sehingga terjadi modulasi respons imun.

Pada awal pengembangan ajuvan, digunakan material seperti aluminium dan emulsi minyak dalam air untuk meningkatkan imunogenitas vaksin dan seiring dengan pemahaman pengetahuan interaksi sistem imun dengan patogen, maka peran ajuvan dalam vaksinasi serta penyesuaiannya dalam formulasi vaksin modern terus dikembangkan. Fungsi kunci penggunaan ajuvan adalah untuk meningkatkan pengenalan patogen dan meningkatkan respons imun yang menyerupai infeksi oleh patogen sebenarnya. Ajuvan yang efektif mampu meningkatkan durabilitas respons imun saat hanya dipapar oleh antigen sub-unit saja (Di Pasquale et al., 2015; Kim dan Jang, 2017).

Pada mukosa yang terus menerus terpapar oleh antigen yang bervariasi dan microbiota, maka diperlukan penambahan material ajuvan sebagai imunostimulator. Salah satunya adalah ctxB, ctxB merupakan bagian non-toksik toksin kolera yang memiliki afinitas kuat terhadap monosialotetrahexosylganglioside (GM1) yang diekspresikan oleh berbagai jenis sel termasuk sel epitel saluran cerna dan sel APC seperti makrofag, sel dendritik dan sel B. Interaksi antara ctxB dan GM1 diperoleh berdasarkan struktur pentasakaridanya. Setiap monomer ctxB berinteraksi dengan satu pentasakarida dan seterusnya, sehingga semakin terjadi peningkatan interaksi antara keduanya. Keunggulan lain yang ditemukan pada ctxB adalah kemampuannya meningkatkan

IgA sekretori (sIgA) paling tinggi dibandingkan dengan *adjuvant* lainnya. Produksi sIgA diperoleh berdasarkan proses yang diawali oleh uptake antigen dari sel M yang kemudian terjadi transfer antigen secara transitis pada sel APC, termasuk sel dendritik yang kemudian berinteraksi dengan sel T naïve di zona interfolikuler sehingga se T kemudian mengaktifasi sel B yang berada di *germinal centers* (GCs). Dengan pembentukan sIgA maka terbentuk imunitas adaptif yang bersifat spesifik dan memberikan pertahanan dalam jangka waktu yang lebih lama. Tabel 2.5 memperlihatkan perbedaan kemampuan stimulasi imun antara berbagai macam adjuvan untuk imunisasi mukosa (Lycke, 2012; Di Pasquale et al., 2015).

Tabel 2.5 Perbandingan Karakteristik Ajuvan Vaksinasi Mukosa (Lycke, 2012)

Komposisi	Target	Respon Imun Termediasi Sel T				IgA Mukosal
		Th1	Th2	Th17	CTL	
MDP	TLR-2	+	+	-	-	+
MPL	TLR-4	+	-	-	+	+
Flagellin	TLR-5	+	-	-	+	++
CT	GM1	-	+	+	+	+++++
CTA1-DD	Rantai Berat Ig	+	+	+	+	+++++
Fraksi <i>Quilaja saponins</i>	DCs	+	+	-	+	++
DDA Kationik	ND	+	-	-	+	++
Chitosan	<i>Tight junctions</i>	-	+	-	-	++
IL-1	IL-1R	+	+	-	-	+++
IL-2	IL-2R	+	-	-	+	+

MDP: *muranyl dipeptide*; MPL: *monophosphoryl lipid A*; CT: *cholera toxin*; DDA: *dimethyldiocta-decylammonium*; IL: *interleukin*; ND: *not-determined*; CTL: *cytotoxic T lymphocyte*.

2.6 Respon Imun Mukosa

Sistem imun mukosa merupakan bagian dari sistem imun tubuh yang memberikan perlindungan dan respon terhadap mikroba patogen yang masuk melalui mukosa, seperti saluran nafas dan cerna. Sistem imun mukosa juga mempertahankan toleransi terhadap mikrobiota komensal yang ada. Sistem imun mukosa tersusun atas *mucosal associated lymphoid tissue* (MALT) yang terorganisir, seperti plak peyer dan sel-sel di dalam lamina propia (Abbas, 2016).

MALT sendiri terdiri dari kumpulan-kumpulan sel limfoid pada parenkim organ mukosa dan kelenjar eksokrin dimana tempat efektor imun akan bermanifestasi.

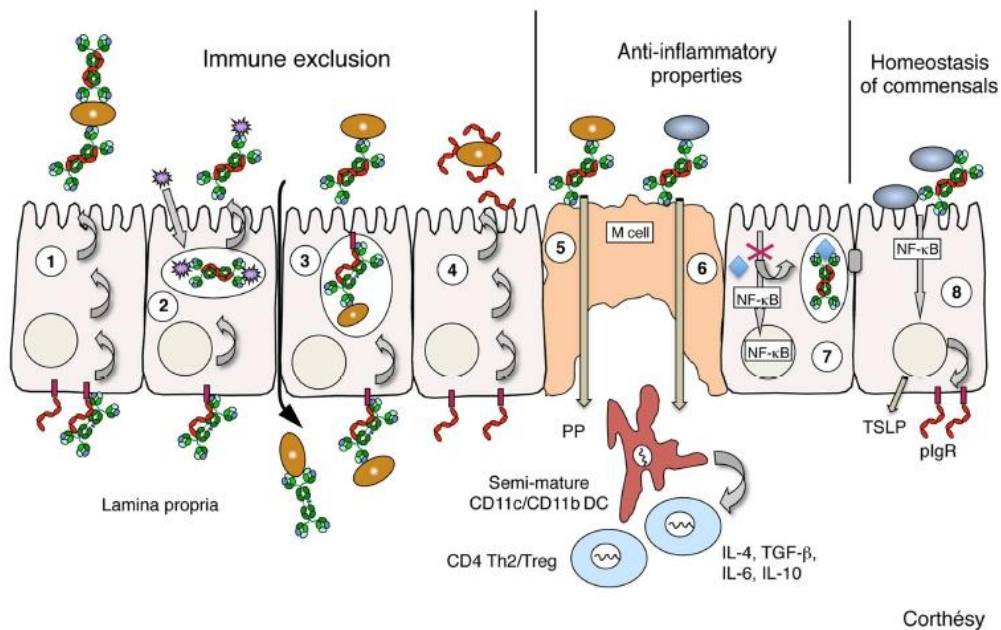
Bila terdapat antigen yang masuk ke dalam mukosa, sel epitel absorptif dan terspesialisasi (sel membran "M") akan mengambil antigen tersebut dan kemudian akan disajikan oleh *antigen presenting cell* (APC) pada sel T CD4 dan CD8 naif. Aktivasi sel T menyebabkan generasi sel T helper efektor yang berbeda termasuk Th1, Th2 dan Th17. Secara umum, subset Th1 akan mengatur imunitas yang tergantung IFN γ terhadap sebagian besar patogen intraseluler, sedangkan subset Th2 menghasilkan IL-4, IL-5 dan IL-13 dan diperlukan untuk perlindungan terhadap infeksi cacing dan sitokin efektor subset Th17 terutama IL-17A, IL-17F dan IL-22 sangat penting untuk pertahanan inang terhadap infeksi bakteri dan jamur (Kumar, 2013). Setelah terdiferensiasi menjadi sel efektor, sebagian besar sel tersebut keluar dari organ limfoid, masuk ke dalam sirkulasi dan bermigrasi ke tempat infeksi, utamanya tempat asal dicetuskannya respon imun. Sel lain yang berdiferensiasi yang disebut T helper folikular akan tetap berada di organ limfoid dan membantu sel B menghasilkan antibodi yang kuat (Abbas, 2016).

2.6.1 Secretory Ig A

Efektor respons imun adaptif diperankan oleh antibodi, yang memediasi imunitas humoral dengan menetralkan dan mengeliminasi mikroba ekstraseluler dan toksin mikroba. Setelah terjadi pengenalan stimulasi oleh antigen dan limfosit *T helper*, klon limfosit B spesifik antigen berkembang dan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang menghasilkan antibodi. Pemaparan berulang pada antigen akan menyebabkan maturasi afinitas, sehingga afinitas antibodi yang diproduksi akan meningkat. Molekul antibodi secara umum tersusun atas empat rantai—dua polipeptida rantai berat yang identik dan dua rantai ringan yang identik yang diikat dengan ikatan disulfida (Abbas *et al.*, 2016).

Respon imun adaptif pada mukosa usus terutama diperankan oleh antibodi IgA sekretori (s-Ig A) yang berfungsi sebagai garis pertahanan pertama dalam melindungi epitel usus dari mikroorganisme patogen dan toksinnya. Pada individu sehat, dua per tiga dari antibodi yang diproduksi tiap hari merupakan s-Ig A. Di mukosa, s-Ig A banyak diproduksi oleh sel plasma yang terdapat pada lamina propria dan secara aktif ditranspor melalui sel epitel oleh suatu reseptor Fc yang spesifik Ig A. Perubahan isotype rantai (*switching*) yang terjadi disebabkan oleh sitokin interleukin-4, *transforming growth factor*- β , IL-5, IL-6 dan IL-10. Sel B yang teraktivasi akan mengekspresikan reseptor kemokin dan molekul adhesin sehingga terjadi migrasi sel B ke lamina propria (Mantis, 2011). Pada tikus hanya terdapat satu jenis molekul Ig A, namun pada manusia molekul Ig A dibagi menjadi subkelas Ig A1 dan Ig A2. Ig A1 dominan terdapat dalam serum, sedangkan Ig A2 yang tahan terhadap degradasi proteolitik ditemukan terutama dalam sekresi mukosa. Secara struktur, s-Ig A yang ada di sirkulasi dapat berupa polimerik Ig A maupun monomerik Ig A (Boyaka, 2019).

s-Ig A bekerja dengan menghalangi perlekatan bakteri patogen pada sel epitel dengan mengenali dan mengikat domain *receptor-recognition* secara langsung. Melalui proses *immune exclusion*, mikroba patogen akan teraglutinasi, terperangkap di dalam mukus dan dibersihkan melalui peristaltik dan aktivitas mukosiliar. Interaksi antara s-Ig A dengan bakteri komensal usus melalui Fab dan *Fc-independent* juga memfasilitasi kolonisasi usus dan pengenalan antigen terkait (Mathias, 2011). s-Ig A juga berperan dalam homeostatis mikrobiota usus, pada bayi baru lahir, s-Ig A pada air susu ibu (ASI) mampu berikatan dengan bakteri komensal sehingga terjadi transisi dari lingkungan steril. Sebaliknya mikrobiota akan menstimulasi maturasi *gut-associated lymphoid tissue* (GALT) menghasilkan produksi Ig A dengan afinitas terbatas dan repertoar untuk epitop pada mikrobiota usus (Sekirov, 2010; Walter, 2011).



Gambar 2.6 Representasi Skematis IgA Berkontribusi pada Perlindungan Permukaan Mukosa (Corthesy, 2013)

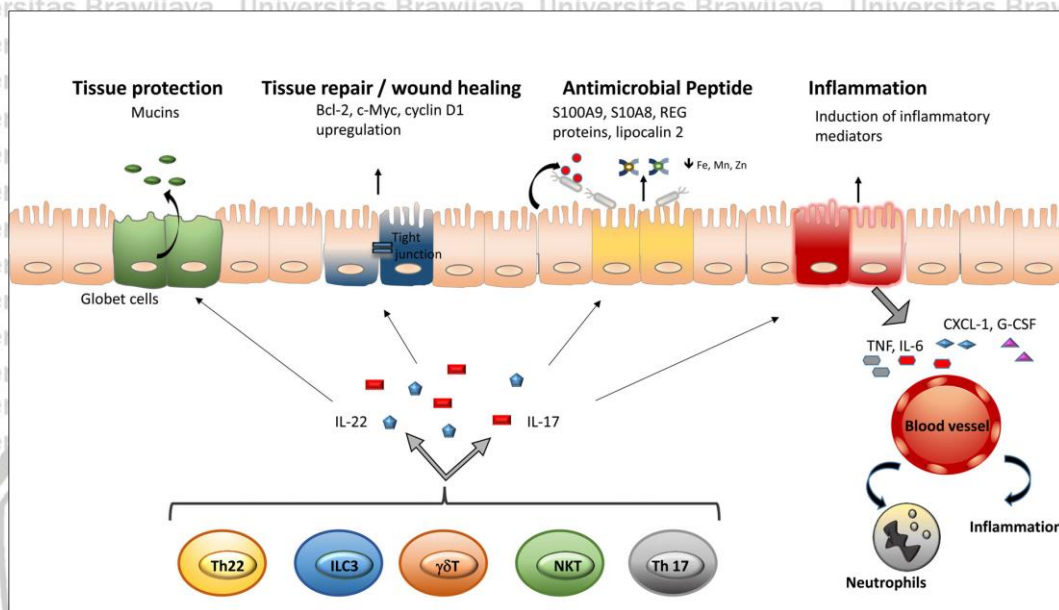
2.6.2 Interleukin-17

Interleukin-17 merupakan *leukocyte-derived* sitokin yang terutama berdampak pada sel epitel usus, paru dan kulit. Sitokin merupakan protein yang disekresikan oleh sel dan memegang peranan penting dalam komunikasi antar sel dengan mengikat bagian ekstraseluler dari protein reseptor transmembran spesifik pada *outer membrane* dari sel. Pengikatan ini memicu *signaling pathway*, yang mengarah pada perubahan fungsional dalam sel. Sitokin dikelompokkan berdasarkan persamaan lokasi genom, struktur gen, struktur protein yang disekresikan dan reseptor yang terlibat. (Qu et al. 2013).

Saat ini terdapat enam anggota keluarga dari sitokin IL-17 yang diketahui yaitu IL-17A (umumnya disebut sebagai IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (juga dikenal sebagai IL-25) dan IL-17F, sedangkan menurut reseptor dan *sequence homology*, sitokin IL-17 terdiri dari IL-17RA, RB, RC, RD, dan RE. Reseptor IL-17 bekerja melalui jalur *ACT1s-dependent* (juga disebut sebagai CIKS) dan mengaktifkan NF- κ B dan MAP Kinase untuk menginduksi mediator proinflamasi seperti IL-6, IL-8 *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), beberapa kemokin (CXCL1, CXCL10, CCL2, CCL7, CCL20) dan matriks metalloproteinase-3 (MMP3) dan MMP13 (Gaffen, 2009). IL-17 *signalling* juga dapat mengaktivasi faktor transkripsi CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) yang penting untuk ekspresi target gen tertentu (Patel et al., 2007).

Sitokin IL-17 pertama kali ditemukan disekresikan oleh subset dari sel T CD4 + yang disebut sel Th17, yang juga mensekresikan sitokin IL-22 dan IL-21. Namun dari penelitian-penelitian terbaru, IL-17 juga diketahui diproduksi oleh CD4+ T cells, CD8+ T cells, *natural killer* (NK) cells, NKT cells, *lymphoid tissue inducer* (LTi) cells, $\gamma \delta$ cells, makrofag dan neutrofil (Valeri, 2016). Selain proses

infeksi, IL-17 juga berkaitan dengan penyakit inflamasi kronis dan penyakit autoimun, seperti rheumatoid arthritis, psoriasis, multiple sklerosis, imun thrombocytopenic purpura (ITP), ankylosing spondylitis dan inflammatory bowel disease (IBD) (Tabarkiewicz, 2015).



Gambar 2.7 Fungsi Sitokin IL-17 di Permukaan Epitel Mukosa (Valeri, 2016)

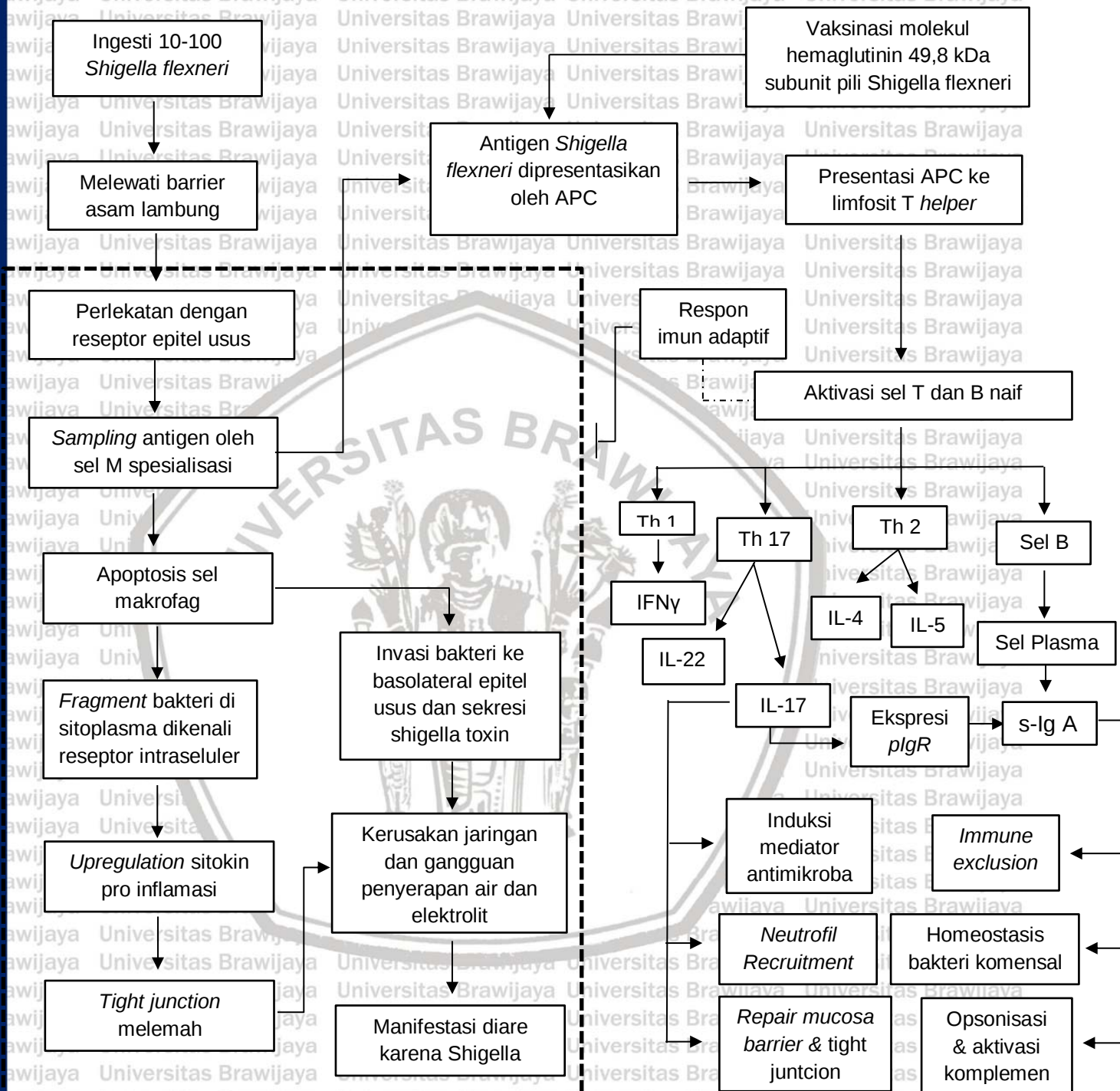
Fungsi efektor sitokin IL-17 secara *in vivo* sangat penting dalam menjaga kekebalan mukosa terhadap patogen spesifik dengan menginduksi protein antimikroba, pengerahan neutrofil ke lokasi invasi bakteri dan peningkatan repair dari *mucosa barrier* dengan merangsang proliferasi sel epitel dan produksi *tight junction protein* (Valeri, 2016). IL-17 menstimulasi sel target untuk menghasilkan kemoatraktan neutrofil seperti kemokin CXC IL-8 (CXCL8), CXCL1 dan CXCL2, serta faktor pertumbuhan, termasuk G-CSF dan GM-CSF. IL-17 juga bersinergi dengan sitokin lain, seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α , yang akan mengaktifasi infiltrasi neutrofil jaringan sehingga efektif mengeliminasi patogen ekstraseluler (Valeri, 2006). Pada penelitian dengan menggunakan hewan coba tikus mutan, interupsi pada sitokin IL-17 atau reseptornya menyebabkan kerentanan terhadap infeksi *C. rodentium* yang disebabkan gagalnya induksi CXC kemokin dan pengerahan

neutrofil (Mangan, 2006). Sitokin IL-17 juga menargetkan sel epitel untuk menginduksi respon antimikroba terhadap patogen ekstraseluler dan mempromosikan remodeling jaringan sehingga mempertahankan integritas dari epitel usus sehingga mencegah adanya translokasi bakteri patogen. IL-17 menstimulasi epitel usus untuk menyekresikan claudin 1 dan claudin 2, protein yang terlibat dalam pembentukan *tight junctions* sel-sel usus (Dungan, 2011).

IL-17 bersama dengan IL-22 juga menginduksi produksi dari mediator antimikroba seperti β -defensins (HBD), *regenerating* (ReG) *proteins*, S100 *proteins*, *cathelicidins*, *lipocalins* dan *lactoferrins*. Penelitian dengan hewan coba mencit mutan yang kehilangan gen IL-17A dan IL-17F, rentan terhadap infeksi *C.rodentium* sebagai akibat dari penurunan induksi peptida antimikroba seperti β -defensin 1, 3 dan 4. Pasien dengan sindrom hiper-IgE yang memiliki gangguan dalam diferensiasi sel Th17 karena adanya mutasi pada gen STAT3 juga menunjukkan kerentanan terhadap infeksi bakteri dan jamur (Abusleme, 2016).

Di penelitian terbaru, juga telah menunjukkan peran IL-17 dalam aktivasi respon antibodi sel B dan pembentukan pusat germinal. Blokade *signalling* IL-17 menyebabkan inhibisi *switching* dari kelas antibodi. Di penelitian lain, IL-17 juga berperan penting dalam meningkatkan ekspresi reseptor imunoglobulin polimer (pIgR) pada basolateral epitel usus yang mengatur translokasi IgA dan IgM ke dalam lumen usus. Reseptor tersebut penting dalam menjaga imunoglobulin agar tidak terdegradasi oleh protease di lumen (Kumar, 2013)

2.7 Kerangka Teori



Gambar 2.8 Kerangka Teori

Proses patogenesis shigellosis dimulai ketika ingesti 10-100 bakteri dan terjadi perlekatan bakteri ke epitel usus. Perlekatan tersebut terdiri dari dua tahap, anchoring sebagai tahap pertama diperankan oleh pili, dan docking sebagai tahap kedua yang diperankan oleh outer membrane protein (OMP). Setelah terjadi perlekatan, bakteri *Shigella sp.* mampu mencetuskan uptake dirinya pada sel *Microfold* (sel M) yang dibantu oleh sejumlah protein plasmid plasmid, seperti *invasion plasmid antigens* (Ipa), *surface presentation antigens* (Spa), *membrane excretion proteins* (Mxi), and *virulence proteins* (Vir). *Shigella sp.* juga mampu menghindari degradasi dengan apoptosis sel makrofag yang diperantarai *plasmid-encoded contact hemolysin* sehingga bakteri dapat lolos dari respon imun sel host. Setelah lolos dari makrofag, bakteri *Shigella* akan melanjutkan proses invasi melalui basolateral epitel usus dengan melakukan aktin polimerisasi. Fragmen bakteri di sitoplasma juga akan dikenali oleh reseptor intraseluler sehingga terjadi upregulasi dari sitokin pro inflamasi yang akan melemahkan tight junction serta destruksi epitel usus. Hal tersebut semakin mempermudah bakteri dalam melakukan invasi tanpa melalui transitosi sel M. Hal tersebut menyebabkan degenerasi epitel dan radang pada lamina propria sehingga terjadi deskuamasi dan ulserasi mukosa sehingga terjadi kebocoran darah, elemen inflamasi dan lendir ke dalam lumen usus yang merupakan manifestasi dari diare karena *Shigella sp.*

Ditinjau dari aspek imunitas inang, antigen yang terdapat pada *Shigella flexneri* akan dipresentasikan oleh *antigen presenting cell* (APC) dan dikenali oleh limfosit T *helper*, yang berperan dalam aktivasi sel B. Aktivasi sel T menyebabkan generasi sel T *helper* (Th) efektor yang berbeda termasuk Th1, Th2 dan Th17. Sel B teraktivasi akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang menghasilkan immunoglobulin A dan efektor subset Th17 terutama IL-17A, berperan penting

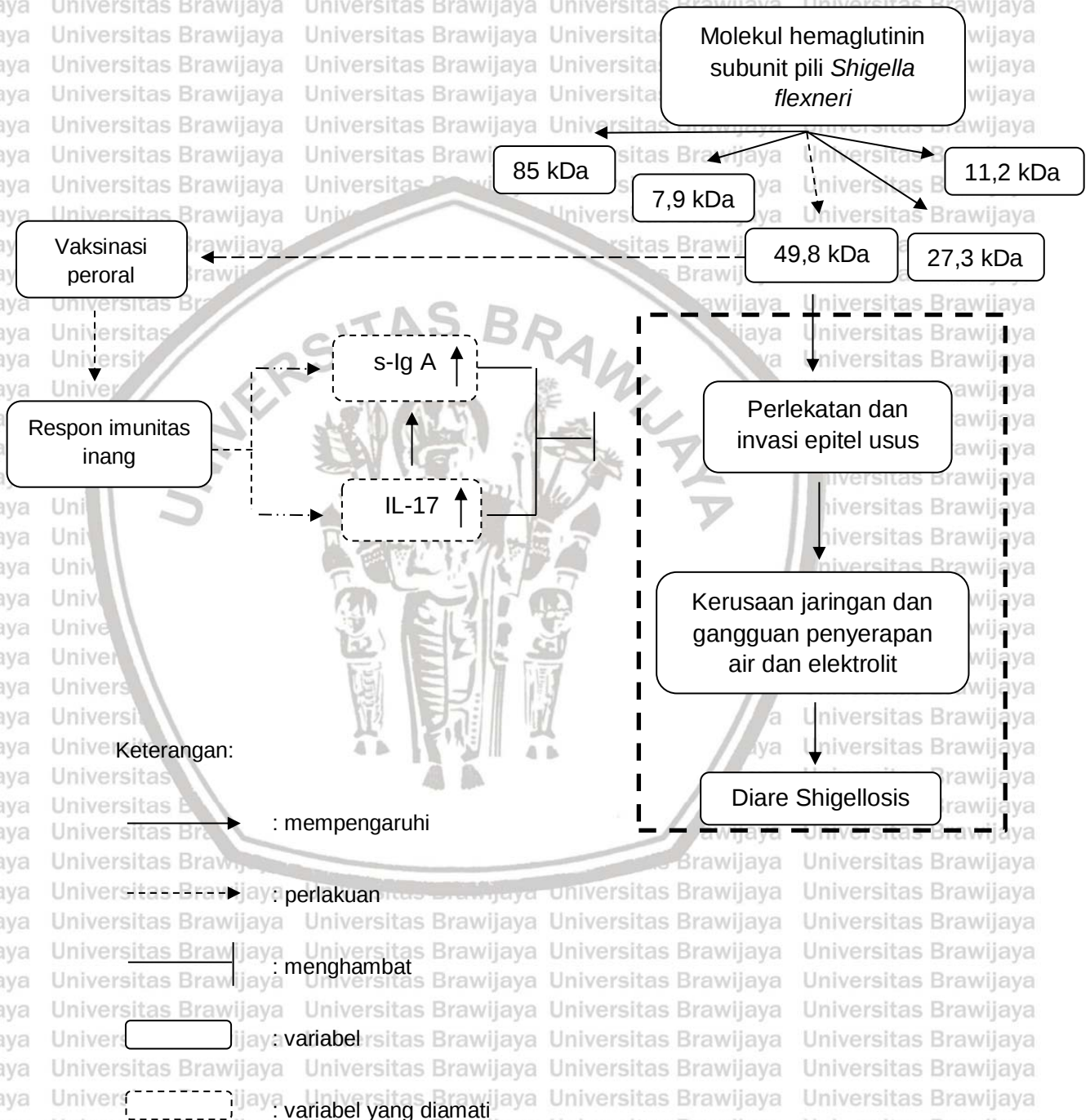
dalam sistem imun mukosa untuk pertahanan inang terhadap infeksi bakteri dan jamur. Melalui mekanisme *immune exclusion*, s-Ig A mampu mencegah terjadinya perlekatan bakteri. s-Ig A juga bekerja dengan melakukan netralisasi toxin, opsonisasi dan aktivasi komplemen. s-Ig A juga berperan dalam homeostasis mikrobiota usus. Sedangkan IL-17 menginduksi produksi dari mediator antimikroba seperti β -defensins (HBD), *regenerating* (ReG) *proteins*, S100 *proteins*, *cathelicidins*, *lipocalins* dan *lactoferrins*. IL-17 juga mampu mengerahkan neutrofil ke lokasi invasi bakteri dan meningkatkan *repair* dari *mucosa barrier* dengan merangsang proliferasi sel epitel dan produksi *tight junction protein*. IL-17 juga diketahui berperan penting dalam meningkatkan ekspresi *plgR* yang merupakan komponen penting *secretory immunoglobulin A*.



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

3.2 Deskripsi Kerangka Konsep

Sebagai tahap pertama dalam perlekatan bakteri terhadap inang, bakteri patogen *Shigella flexneri* memiliki molekul adhesin yang diperankan oleh pili yang juga merupakan molekul hemagglutinin. Pada penelitian sebelumnya telah diidentifikasi molekul hemagutinin dari subunit pili *Shigella flexneri* dengan berat molekul 7,9 kDa; 11,2 kDa; 27,3 kDa; 49,8 kDa dan 85 kDa dan diantara berat molekul tersebut, molekul 49,8 kDa memiliki titer hemagglutinin yang paling tinggi sehingga ideal untuk dijadikan sebagai bahan kandidat vaksin berbasis molekul adhesin. Setelah terjadi perlekatan, bakteri patogen *Shigella flexneri* akan melakukan kolonisasi dan invasi mukosa usus serta mengeluarkan toksin-toksin yang merugikan host, yang akan menyebabkan manifestasi berupa diare. Imunitas inang sangat berperan dalam mencegah progresifitas diare yang disebabkan oleh bakteri tersebut, dan vaksinasi dapat menginduksi respons imun tubuh untuk memberikan perlindungan jangka panjang terhadap patogen, dengan menghalangi adanya perlekatan bakteri dengan reseptor sel inang dan kolonisasi pada permukaan mukosa. Respon imunitas inang yang terjadi terhadap pemberian vaksin dapat dinilai dari bangkitnya berbagai efektor imun seperti s-IgA pada mukosa usus dan kadar IL-17 pada darah. Respon imun tersebut sangat berperan dalam melawan patogen di dalam mukosa usus, sehingga tidak terjadi manifestasi diare.

3.3 Hipotesis Penelitian

Terdapat peningkatan respon imun yang ditandai peningkatan kadar s-Ig A pada mukosa usus mencit dan peningkatan kadar IL-17 pada serum darah mencit yang divaksinasi dengan molekul hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vitro* dan *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Group Post Test Only Design* dengan menggunakan hewan coba mencit jantan Balb/c. Penelitian ini telah disetujui Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (terlampir).

4.2 Jumlah Sampel

Perhitungan pengulangan sampel menggunakan rumus:

$$p(n - 1) \geq 15 \quad (\text{Federer, 1967})$$

Dimana p = jumlah perlakuan dan n = jumlah pengulangan. Pada penelitian ini $p = 2$ sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$2(n - 1) \geq 15$$

$$2n - 2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5$$

Dari rumus tersebut didapatkan, setiap perlakuan dilakukan 9 kali pengulangan sehingga total sampel yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah 18 ekor mencit.

Tabel 4.1 Deskripsi Kelompok Perlakuan

Kelompok	Jumlah Sampel	Induksi dan Perlakuan
Kontrol	9	Tidak dilakukan vaksinasi dengan molekul hemagglutinin subunit pili 49,8 kDa <i>Shigella flexneri</i> .
Perlakuan	9	Dilakukan vaksinasi dengan molekul hemagglutinin subunit pili 49,8 kDa <i>Shigella flexneri</i> .

Tabel 4.2 Timeline Perlakuan Hewan Coba

Perlakuan	Tanggal
Pemberian vaksin pertama	1 Oktober 2018
Pemberian booster pertama	8 Oktober 2018
Pemberian booster kedua	15 Oktober 2018
Pemberian booster ketiga	21 Oktober 2018
Mencit dikorbankan	28 Oktober 2018

4.3 Kriteria Sampel Hewan Coba

4.3.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dalam pemilihan hewan coba diantaranya yaitu: mencit balb/c berjenis kelamin jantan, berumur kurang lebih 6-8 minggu, dengan berat badan kurang lebih 20-30 gram, dalam kondisi sehat dan tidak terdapat kelainan anatomis.

4.3.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi dalam pemilihan hewan coba diantaranya yaitu: mencit yang mati ataupun mengalami diare selama masa perlakuan dan mencit yang tidak mau makan selama perlakuan.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian vaksin molekul hemagglutinin subunit pili 49,8 kDa *Shigella flexneri*.

4.4.2. Variabel Tergantung

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar s-Ig A di mukosa usus mencit dan kadar IL-17 di serum darah mencit.

4.5 Lokasi dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Laboratorium Mikrobiologi FKUB dan Laboratorium Biomedik FKUB. Waktu penelitian mulai dari tanggal 28 September 2018 saat persiapan kultur bakteri hingga tanggal 2 November 2018 saat analisis data selesai dikerjakan.

4.6 Definisi Operasional

- a. **Mencit Balb/c:** Mencit jantan spesies *mus musculus* galur B albino *clone* (Balb/c) berumur kurang lebih 6-8 minggu dengan berat badan kurang lebih 20-30 gram.
- b. **Bakteri *Shigella flexneri*:** Diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, kemudian dikultur untuk diisolasi proteinnya.

c. **Molekul hemagglutinin 49,8 kDa:** Protein pili yang memperantarai perlekatan bakteri pada sel enterosit yang diisolasi dari subunit pili *Shigella flexneri* melalui SDS-PAGE setelah dilakukan pemotongan dengan *pili cutter* desain Sumarno di laboratorium Biomedik FKUB.

d. **Hemagglutinin:** Kemampuan suatu protein dalam mengagglutinasikan eritrosit mencit yang dapat diketahui dari uji hemagglutinin. Aktivitasnya berkorelasi dengan kemampuan adhesi suatu bakteri.

e. **Vaksinasi molekul hemagglutinin 49,8 kDa:** Diberikan secara peroral pada mencit pada hari ke 7, 14, 21, dan 28, dimana proses konjugasinya menggunakan *Cholerae toxin B* (CTB) dengan dosis 250 µg/0.1 mL.

f. **Ajuvan:** Substansi yang ditambahkan ke dalam vaksin untuk meningkatkan imunogenitas vaksin sehingga induksi respon imun inang menjadi lebih efektif. Adjuvan yang digunakan pada penelitian ini adalah *Cholerae toxin B* (CTB).

g. **S-Ig A:** Efektor utama pada sistem imun mukosa yang dihasilkan oleh sel plasma. Diperoleh dari sampel kerokan mukosa usus mencit dan kadarnya diperiksa dengan metode ELISA dengan satuan µg/mL.

h. **IL-17:** *Leukocyte-derived* sitokin yang terutama berdampak pada sel epitel usus, paru dan kulit yang disekresi terutama dari subset Th17. Diperoleh dari sampel serum darah mencit dan kadarnya diperiksa dengan metode ELISA dengan satuan ng/mL.

4.7 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.7.1 Alat dan Bahan untuk Kultur Bakteri *Shigella flexneri*

Alat dan bahan yang diperlukan untuk kultur bakteri adalah *plate agar*, *scrap*, *botol*, *water bath*, inkubator, *Salmonella-Shigella* agar, *phosphate-buffered saline*

(PBS) (pH 7.4), *brain heart infusion* (BHI) dan medium *Thioprolin Carbonate Glutamate* (TCG) yang terdiri dari 0,02% *thioprolin*, 0,3% NaHCO_3 , 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).

4.7.2 Alat dan Bahan untuk Isolasi Protein Pili

Alat dan bahan yang diperlukan untuk isolasi protein pili adalah botol *roux*, medium TCG, *pili cutter* desain Sumarno, sentrifugator, tabung wadah pili, vortex, refrigerator 4°C, *Trichloroacetic acid* (TCA) dan PBS.

4.7.3 Alat dan Bahan untuk Deteksi Molekul Hemaglutinin *Shigella flexneri*

Metode SDS PAGE

Alat dan bahan yang diperlukan adalah pipet, mikropipet, alat elektroforesis, vortex, inkubator, alat elektroelusi, ddH₂O, *acrylamide* 30%, gel buffer, SDS 10 %, TEMED, APS 10%, RSB, *bromophenol blue*.

4.7.4 Alat dan Bahan untuk Konjugasi Ajuvan CTB

Alat dan bahan yang diperlukan adalah mikropipet, tabung Eppendorf, stirrer, inkubator, dan lemari pendingin, PBS, 2% glutaraldehyde, glycine pH 7,2, protein subunit pili 49,8 kDa, dan cholera toxin B (CTB).

4.7.5 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Mencit

Alat dan bahan yang diperlukan adalah gunting bedah, pinset, jarum pentul, *styrofoam*, penggaris, kertas label, termos es, kapas, spuit insulin 1 mL, *vacuotainer*, kloroform, formalin 10% dan alkohol.

4.7.6 Alat dan Bahan Untuk Persiapan Mukus

Alat dan bahan yang diperlukan adalah PBS *cold*, PBS steril, spatel, tabung wadah organ, protease *inhibitor* dan sentrifugator.

4.7.7 Alat dan Bahan Pengukuran s-Ig A Metode ELISA

Alat dan bahan yang digunakan adalah *microplate reader* 450 nm, *well plate*, sentrifugator, pipet, blue tip, mikrotube, inkubator, kertas tisu, air suling, PBS, PBS-Tween-20, *sodium azide* dan kit deteksi *mouse s-Ig A ELISA* dari Elabscience (E-EL-M1040).

4.7.8 Alat dan Bahan Pengukuran IL-17 Metode ELISA

Alat dan bahan yang digunakan adalah *microplate reader* 450 nm, *well plate*, sentrifugator, pipet, blue tip, mikrotube, inkubator, kertas tisu, air suling, PBS, PBS-Tween-20, *sodium azide* dan kit deteksi Mouse IL-17A dari BioLegend (cat #432507).

4.8 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.8.1 Prosedur Kultur Bakteri *Shigella flexneri*

1. Bakteri *Shigella flexneri* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. *Salmonella-Shigella* agar digunakan sebagai media selektif *Shigella flexneri*.
2. *Salmonella-Shigella* agar kemudian dilarutkan dalam 10 mL *phosphate-buffered saline* (PBS) (pH 7.4) dan dilakukan *scrapping* pada suspensi untuk mengambil bakteri.
3. Kemudian dimasukkan ke dalam botol yang berisi *brain heart infusion* (BHI) dan dikocok selama 30 menit pada *water bath* pada suhu 37°C.

4. 10 mL suspensi bakteri dari botol kemudian ditanam pada medium *thioprolin carbonate glutamate* (TCG) untuk memperkaya pertumbuhan pili bakteri dan diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu 37°C. (Anam *et al.*, 2016)

4.8.2 Prosedur Isolasi Protein Pili

1. Kultur bakteri dari medium TCG dikumpulkan ke dalam botol roux.
2. Kemudian diresuspensi dengan TCA hingga mencapai konsentrasi 3%.
3. Suspensi kemudian dikocok menggunakan vortex selama 30 detik dan didiamkan pada suhu ruang selama 1 jam.
4. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C dan diambil endapannya.
5. Hasil endapan kemudian diencerkan menggunakan 6 mL PBS pH 7,4 sehingga terbentuk suspensi baru dan diletakkan ke dalam mesin *pili cutter* dan dilakukan pemotongan dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 detik pada suhu 4°C.
6. Hasil pemotongan pertama kemudian dimasukkan ke dalam tabung falcon dan disentrifugasi pada kecepatan 12,000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk kaya akan protein pili dipisahkan dari endapannya dan disimpan pada suhu 4°C. (Sumarno *et al.*, 2011)

4.8.3 Prosedur SDS PAGE dan Elektroelusi

- Pembuatan gel
 1. Dilakukan pembuatan *stacking gel* 12% dengan formula 3.4 mL ddH₂O, 4.0 mL Acrylamide Bis, 2.5 mL Gel Buffer (1.5 M Tris HCl pH 8.8), 0.1 mL 10% w/v SDS dan *separating gel* 4% dengan formula 3.05 mL ddH₂O, 0.65 mL Acrylamide Bis, 1.25 mL Gel Buffer (0.5 M Tris HCl pH 6.8), 0.05 mL 10% w/v SDS.

2. *Separating monomer solution* dituang ke dalam gel cassette dan didiamkan hingga gel mengeras.
 3. *Stacking monomer solution* kemudian dituang ke dalam gel cassette yang telah terisi *separating monomer solution*, ddH₂O ditambahkan untuk menyesuaikan volume.
 4. Cetakan (*comb*) kemudian dipasang ke dalam gel cassette hingga *stacking gel* mengeras.
 5. Gel cassette dilepas dari gel casting, dan dimasukkan ke dalam chamber.
 6. Running buffer kemudian dituang hingga gel cassette terendam sempurna.
- Persiapan sampel
 1. Siapkan sampel yang akan digunakan. RSB (*Reducing Sample Buffer*) ditambahkan ke dalam sampel dengan perbandingan 1:1 lalu dipanaskan selama ± 5 menit.
 - Running gel
 1. 10 μ l marker protein dimasukkan ke dalam tiap well.
 2. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing well yang telah tercetak ($\pm 15-20$ μ l/well).
 3. Dilakukan *running gel* selama 35 menit dengan tegangan 200V, *constant voltage*.
 4. Perhatikan pergerakan marker protein dan *tracking dye* (berwarna biru).
 5. Jika *tracking dye* sudah mencapai garis hijau dari gel cassette, proses running dapat dihentikan.

- **Staining gel**

1. Gel dari *gel cassette* dilepas secara perlahan dan dimasukkan ke dalam *staining box*.
2. Larutan *staining buffer* kemudian dituang hingga gel terendam sempurna dan diinkubasi selama ± 4 jam - *overnight* dalam *shaker incubator*.
3. Larutan *staining buffer* diganti dengan larutan *de-staining buffer* dan diinkubasi dalam *shaker incubator* hingga pita-pita protein tampak jelas.
4. Setelah pita-pita protein tampak jelas, pita dengan berat molekul 49,8 kDa kemudian dipurifikasi menggunakan elektroelusi.

- Hasil elektroelusi kemudian didialisa selama 24 jam dalam *beaker glass* dengan PBS steril dan diaduk dalam suhu 4°C selama 24 jam.
- Protein yang didapatkan kemudian diendapkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 12,000 rpm dalam suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan kemudian dibuang dan endapan dikeringkan. Protein kemudian diresuspensi dengan menggunakan PBS. Untuk mengetahui kadarnya dalam setiap mL dilakukan uji nanodrop (Anam *et al.*, 2016).

4.8.4 Prosedur Konjugasi Ajuvan CTB

Protein yang telah dikumpulkan sebanyak 35 mg (14,5 mL) kemudian ditambahkan dengan PBS 1,5 mL dan CTB sebanyak 7 mg kemudian ditambahkan 3 mL 2% glutaraldehyde yang diaduk pada temperatur 4°C selama 1 jam. Setelah itu, ditambahkan glisin pH 7,2 2,24 mL sambil diaduk perlahan dan diinkubasi selama 1 jam. Kemudian proses ini dilanjutkan dengan dialisa dengan PBS sebanyak 4 kali selama semalam dan produk disimpan dalam suhu -20°C (Strasmann *et al.*, 2015).

4.8.5 Prosedur Vaksinasi Molekul Hemaglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri*

Vaksin diberikan peroral pada mencit dengan menggunakan sonde sebanyak 4 kali pada hari 7, 14, 21, 28. Pada hari ke 35, mencit dikorbankan sesuai dengan protokol etik. Dosis vaksin yang diberikan adalah 250 µg/ 0,1 mL protein 49,8 kDa yang telah dikonjugasikan dengan CTB (Sumarno *et al.*, 2011).

4.8.6 Prosedur Pembedahan Mencit

1. Pembedahan mencit dilakukan setelah satu minggu seluruh dosis vaksinasi diberikan.
2. Dilakukan anestesi per inhalasi pada mencit dengan kloroform diwadahi tertutup.
3. Setelah teranestesi, mencit ditempatkan pada meja dialasi dengan streofoam dan difiksasi keempat ekstremitas dengan jarum pentul.
4. Bagian dada dan perut mencit dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median sehingga organ-organ dalam rongga perut dan dada terlihat.
5. Kemudian dilakukan pengambilan darah melalui jantung mencit menggunakan spuit 5cc.
6. Darah yang diambil dimasukkan ke dalam *vacutainer* dan diberi label untuk dilakukan pengukuran kadar IL-17.
7. Usus mencit juga diambil untuk dilakukan pengukuran kadar s-Ig A (Setyorini *et al.*, 2013)

4.8.7 Prosedur Untuk Persiapan Mukus

1. Potongan usus mencit dicuci menggunakan PBS *cold* kemudian dibuka longitudinal hingga lapisan mukosanya terlihat.

2. Lapisan mukosa usus mencit kemudian dilakukan *scrapping* secara longitudinal dengan spatel dan diletakkan pada tabung yang berisi PBS steril dan *protease inhibitor*.
3. Suspensi yang terbentuk disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm pada 40°C selama 10 menit dan diambil supernatannya.
4. Supernatan kemudian dilarutkan dengan PBS dan siap digunakan sebagai sampel untuk mengukur kadar s-Ig A dengan metode ELISA. (Sumarno et al., 2011)

4.8.8 Prosedur Pengukuran Kadar s-Ig A Metode ELISA

1. Sebelum digunakan, semua reagen dibiarkan pada suhu ruang (18-25°C) kemudian dilakukan persiapan semua reagen. *Microplate reader* dinyalakan terlebih dahulu 15 menit sebelum digunakan.
2. Tambahkan *standard solutions* dengan konsentrasi yang berbeda sesuai instruksi kit pada *standard well* (100 µL tiap *well*) dan sampel kerokan mukosa usus pada sampel *well* (100 µL tiap *well*), kemudian tutup dengan *plate sealer* dan diinkubasi 90 menit pada suhu 37°C.
3. Buang cairan di tiap *well* kemudian tambahkan 100µL larutan *Biotinylated Detection Ab*. Tutup dengan *plate sealer* dan campur dengan hati-hati kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
4. Larutan dari masing-masing *well* diaspirasi atau dituang kemudian tambahkan 350µL *wash buffer* di tiap *well*. Rendam selama 1-2 menit lalu diaspirasi dan tepuk-tepuk hingga kering menggunakan kertas tisu. Ulangi proses ini sebanyak 3 kali.
5. Kemudian tambahkan 100µL larutan HRP conjugate pada tiap *well*. Tutup dengan *plate sealer* kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.

6. Aspirasi larutan dari *well*, kemudian ulangi proses pencucian sebanyak 5 kali sesuai dengan langkah nomor 4.
7. Kemudian 90uL reagen substrat ditambahkan pada masing-masing *well*. Tutup dengan *plate sealer* dan diinkubasi selama ± 15 menit pada suhu 37°C . Jauhkan plate dari cahaya.
8. Tambahkan 50uL larutan Stop pada tiap *well* untuk menghentikan reaksi.
9. Dilakukan pembacaan nilai absorbansi (OD) menggunakan *microplate reader* pada 450 nm (Instruksi kit ELISA Elabscience).

4.8.9 Prosedur Pengukuran IL-17 Metode ELISA

Sebelumnya dilakukan persiapan sampel dari darah mencit. Darah diambil menggunakan tabung kemudian dibiarkan mengendap selama 30 menit dan dilakukan sentrifugasi selama 10 menit. Sampel siap digunakan atau simpan pada suhu $< -70^{\circ}\text{C}$. Hindari *freeze-thaw cycles*. Pengukuran kadar IL-17 menggunakan metode ELISA dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Sebelum digunakan, semua reagen dibiarkan pada suhu ruang ($18-25^{\circ}\text{C}$) kemudian dilakukan persiapan semua reagen. *Microplate reader* dinyalakan terlebih dahulu 15 menit sebelum digunakan.
2. Tambahkan *standard solutions* dengan konsentrasi yang berbeda sesuai instruksi kit pada standard well (50 μL tiap well) dan sampel serum darah pada sampel well (50 μL tiap well), kemudian tutup dengan *plate sealer* dan diinkubasi 120 menit pada suhu ruang.
3. Buang cairan di tiap well kemudian tambahkan 100uL larutan *mouse IL-17A detection antibody*. Tutup dengan *plate sealer* dan campur dengan hati-hati kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang.
4. Larutan dari masing-masing well diaspirasi atau dituang kemudian dicuci sebanyak 4x menggunakan 300uL *wash buffer* di tiap well. Rendam selama

1-2 menit lalu diaspirasi dan tepuk-tepuk hingga kering menggunakan kertas tisu.

5. Kemudian tambahkan 100 μ L larutan Avidin-HRP A pada tiap well. Tutup dengan *plate sealer* kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang.

6. Aspirasi larutan dari well, kemudian ulangi proses pencucian sebanyak 4 kali sesuai dengan langkah nomor 4

7. Kemudian 100 μ L reagen substrat ditambahkan pada masing-masing well. Tutup dengan *plate sealer* dan diinkubasi selama ± 30 menit pada suhu 37°C. Jauhkan *plate* dari cahaya.

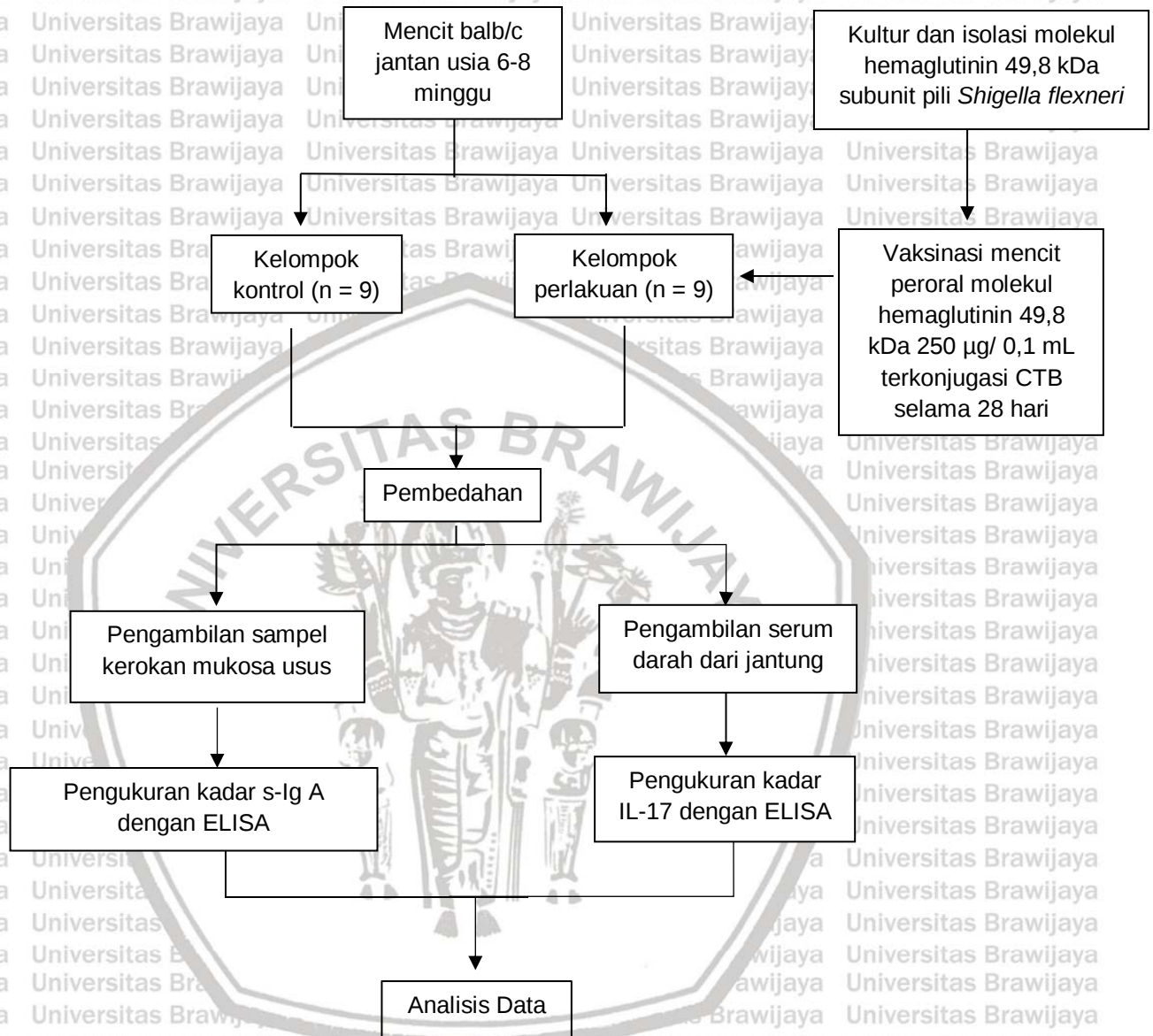
8. Tambahkan 100 μ L larutan Stop pada tiap well untuk menghentikan reaksi.

9. Dilakukan pembacaan nilai absorbansi (OD) menggunakan microplate reader pada 450 nm (Instruksi kit ELISA BioLegend).

4.9 Pengumpulan Data dan Analisis Data

Data hasil kadar s-Ig A dan IL-17 yang telah diperoleh dianalisis menggunakan program *Statistical Product Service Solution* (SPSS). Pertama data yang diperoleh dilakukan uji normalitas untuk mengetahui persebaran data normal atau tidak. Jika tidak, maka diupayakan untuk dilakukan transformasi data. Bila persebaran data normal dilakukan uji T tidak berpasangan, namun bila variabel hasil transformasi tetap tidak terdistribusi normal, maka dipilih uji non parametrik *Mann Whitney*. Penelitian ini dianggap bermakna bila $p < 0,05$.

4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

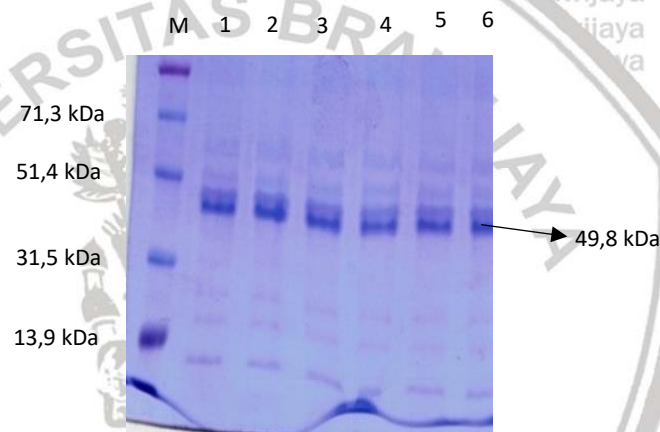
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Profiling Pili *Shigella flexneri* dengan SDS PAGE

Setelah dilakukan pemotongan pili menggunakan *pili cutter* desain Sumarno, dilakukan *profiling* protein berdasarkan perbedaan berat molekul dengan metode SDS PAGE. Hasilnya adalah sebagai berikut :



Gambar 5.1 Hasil Profiling Pili *Shigella flexneri*. Untuk mendapatkan protein pili dengan berat molekul 49,8 kDa, dilakukan *profiling* berdasarkan perbedaan berat molekul dengan metode SDS-PAGE. Gel stacking dengan formula 3.4 mL ddH₂O, 4.0 mL Acrylamide Bis, 2.5 mL Gel Buffer (1.5 M Tris HCl pH 8.8), 0.1 mL 10% w/v SDS dan separating gel 4% dengan formula 3.05 mL ddH₂O, 0.65 mL Acrylamide Bis, 1.25 mL Gel Buffer (0.5 M Tris HCl pH 6.8), 0.05 mL 10% w/v SDS. Keterangan : M: marker; Lane 1-6 : antigen subunit pili *Shigella flexneri*.

Pada gambar 5.1 didapatkan adanya penebalan pita dominan dan konsisten dengan berat molekul 49,8 kDa sebagai protein subunit pili *Shigella flexneri* yang akan digunakan sebagai kandidat bahan vaksin.

5.1.2 Hasil Purifikasi Protein 49,8 kDa Subunit Pili *Shigella flexneri*

Pita protein dengan berat molekul 49,8 kDa yang telah didapat kemudian dipotong untuk dipurifikasi menggunakan elektroelusi. Selanjutnya dilakukan uji

nanodrop untuk mengidentifikasi konsentrasi protein dalam setiap mL suspensi.

Dari hasil uji *nanodrop*, diketahui didapatkan konsentrasi protein adalah 2,4 mg/mL (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 Hasil Uji Nanodrop

Sample ID	Date	Time	mg/mL
<i>Shigella flexneri</i>	9/21/2018	10.40 AM	2,4

5.1.3 Hasil Pengukuran Kadar IL-17 di Serum Darah Mencit

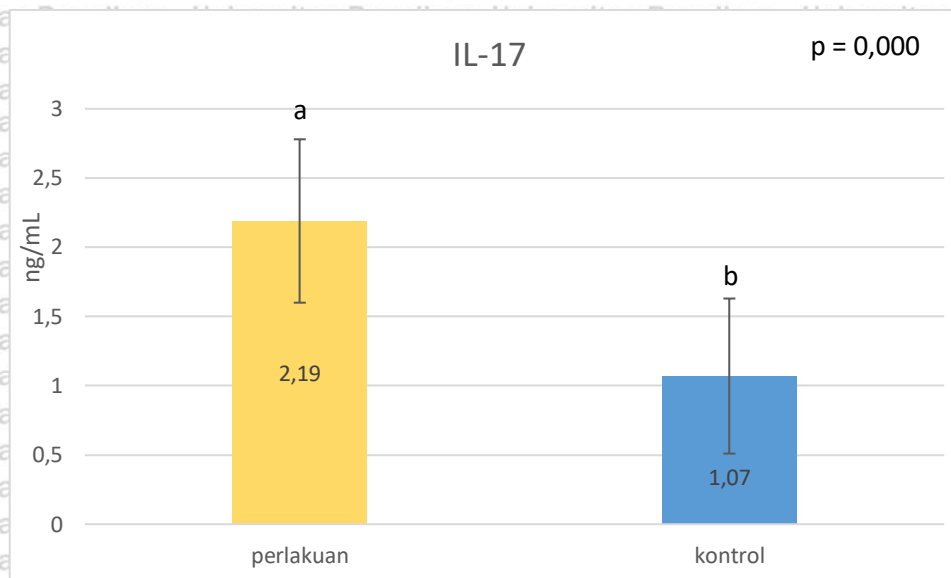
Setelah 7 hari, dosis vaksin terakhir diberikan, seluruh mencit kemudian dikorbankan sesuai protokol etik. Setelah dilakukan pembedahan, dilakukan pengambilan darah melalui jantung dengan menggunakan spuit 5cc untuk diperiksa kadar IL-17 pada serumnya. Hasilnya adalah sebagai berikut :

Tabel 5.2 Rerata Kadar IL-17

Kelompok	Rerata (ng/mL) $\pm$ SD	Nilai p
Kontrol	1,07 $\pm$ 0,56 ^b	0,000
Perlakuan	2,19 $\pm$ 0,59 ^a	

Pada tabel 5.2, ditunjukkan untuk rerata kadar IL-17 untuk kelompok perlakuan adalah 2,19 ng/mL sedangkan rerata untuk kelompok kontrol adalah 1,07 ng/mL.

Bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, terdapat peningkatan kadar IL-17 hingga 104 %. Untuk rerata juga disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.2



Gambar 5.2 Grafik Rerata Kadar IL-17 7 hari setelah dosis vaksin terakhir diberikan, mencit kemudian dikorbankan sesuai protokol etik dan dilakukan pembedahan untuk pengambilan sampel serum darah mencit untuk diukur kadar IL-17 dengan metode ELISA. Grafik sebelah kiri merupakan hasil pengukuran kadar IL-17 untuk kelompok perlakuan dan grafik sebelah kanan untuk kelompok kontrol.

5.1.4 Hasil Pengukuran Kadar s-Ig A di Mukosa Usus Mencit

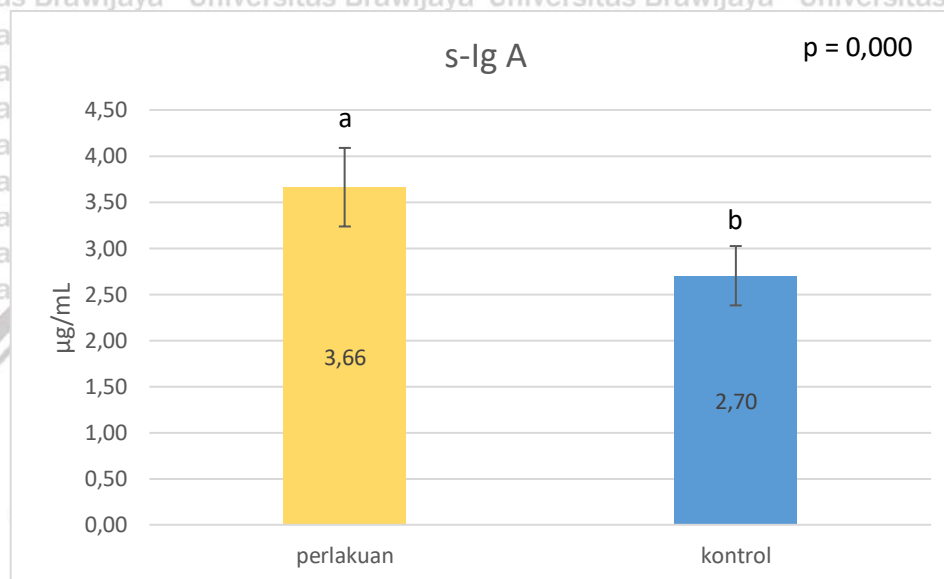
Selain pengukuran kadar IL-17 pada serum darah mencit, juga dilakukan pengukuran kadar s-Ig A pada mukosa usus mencit. Setelah dicuci dengan PBS *cold*, usus mencit kemudian dibuka longitudinal hingga lapisan mukosa terlihat. Lapisan mukosa usus kemudian dikerok menggunakan spatel untuk dilakukan pengukuran kadar s-Ig A dengan metode ELISA. Hasilnya adalah sebagai berikut:

Tabel 5.3 Rerata Kadar s-Ig A

Kelompok	Rerata ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ SD	Nilai p
Kontrol	$2,70 \pm 0,32^b$	0,000
Perlakuan	$3,66 \pm 0,42^a$	

Pada tabel 5.3, ditunjukkan untuk rerata kadar s-Ig A untuk kelompok perlakuan adalah 3,66 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan rerata untuk kelompok kontrol adalah 2,70 $\mu\text{g/mL}$.

Bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, terdapat peningkatan kadar s-Ig A hingga 35,5 %. Untuk rerata juga disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.3



Gambar 5.3 Grafik Rerata Kadar s-Ig A. 7 hari setelah dosis vaksin terakhir diberikan, mencit kemudian dikorbankan sesuai protokol etik dan dilakukan pembedahan untuk pengambilan sampel sekret usus untuk diukur kadar s-Ig A dengan metode ELISA. Grafik sebelah kiri merupakan hasil pengukuran kadar s-Ig A untuk kelompok perlakuan dan grafik sebelah kanan untuk kelompok kontrol.

5.2. Hasil Analisis Data

5.2.1. Uji Normalitas dan Uji Homogenitas

Hasil pengukuran kadar s-Ig A dan IL-17 kemudian dianalisis menggunakan analisis statistik SPSS for windows versi 20. Pertama dilakukan uji normalitas dan homogenitas data untuk menentukan uji beda menggunakan parametrik atau non parametrik. Pada penelitian ini uji normalitas menggunakan uji Saphiro-Wilk karena jumlah sampel penelitian yang kurang dari 50 ($n \leq 50$) dan data dinyatakan memiliki persebaran normal bila $p > 0,05$. Hasil uji Saphiro-Wilk

menunjukkan data hasil pengukuran kadar IL-17 untuk kelompok kontrol memiliki persebaran data normal dengan nilai signifikansi $p=0,342$ ($p>0,05$) sedangkan untuk kelompok perlakuan didapatkan persebaran data yang tidak normal dengan nilai signifikansi $p=0,004$ ($p<0,05$). Oleh karena, tidak memenuhi syarat dilakukan uji parametrik, variabel hasil pengukuran kadar IL-17 dilakukan uji non parametrik yaitu Mann Whitney.

Uji Saphiro-wilk untuk hasil pengukuran kadar s-Ig A menunjukkan persebaran data yang normal dengan nilai signifikansi $p=0,108$ ($p>0,05$) untuk kelompok kontrol dan $p=0,104$ ($p>0,05$) untuk kelompok perlakuan. Oleh karena itu, selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene*. Suatu data dinyatakan memiliki varians homogen dengan nilai signifikansi $p>0,05$. Hasil uji *Levene* menunjukkan data hasil pengukuran kadar s-Ig A homogen dengan nilai signifikansi $p=0,534$ ($p>0,05$). Oleh karena memenuhi syarat untuk dilakukan uji parametrik, maka untuk variabel s-Ig A dilakukan uji hipotesis parametrik yaitu uji T-independent.

Pada penelitian ini, dilakukan juga uji korelasi untuk mengetahui adak tidaknya hubungan serta arah hubungan dari dua variabel yang diteliti yaitu, IL-17 dengan s-Ig A. Besaran koefisien -1 dan 1 merupakan hubungan yang sempurna dengan nilai koefisien 0 atau mendekati 0 dianggap tidak berhubungan antara dua variabel yang diuji. Suatu hubungan dianggap positif bila nilai koefisien 0 s/d 1 dan dianggap korelasi negatif bila nilai koefisien 0 s/d -1. Suatu hubungan dinyatakan bermakna bila didapatkan nilai $p<0,05$. Pada penelitian ini, digunakan uji korelasi *spearman*, karena data hasil pengukuran kadar IL-17 memiliki persebaran data yang tidak normal.

5.2.2. Uji Hipotesis

Untuk hasil pengukuran kadar s-Ig A dilakukan uji T-independent sedangkan hasil pengukuran kadar IL-17 dilakukan uji Mann Whitney. Uji ini

dilakukan untuk menentukan perbedaan antara dua kelompok yang tidak berpasangan. Perbedaan dinyatakan bermakna bila didapatkan nilai $p < 0,05$.

Berdasarkan hasil uji Mann Whitney untuk data pengukuran kadar IL-17 didapatkan terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ($p < 0,001$). Hasil uji T-independent untuk hasil data pengukuran kadar s-Ig A juga didapatkan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ($p < 0,001$). Dari hasil uji korelasi *spearman*, menunjukkan terdapat korelasi kuat positif antara kadar IL-17 terhadap kadar s-Ig A (koefisien korelasi = 0.728) dengan nilai signifikansi $p = 0,026$ ($p < 0,05$).

Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian molekul hemaglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* dapat memicu respon imun yang penting dalam sistem imun mukosa yang ditunjukkan adanya peningkatan yang bermakna untuk kadar s-Ig A pada mukosa usus menciit dan kadar IL-17 pada serum darah menciit sehingga potensial untuk dijadikan sebagai kandidat vaksin untuk diare yang disebabkan oleh *Shigella flexneri*.

BAB 6

PEMBAHASAN

Tujuan utama dalam penelitian ini adalah untuk membuktikan protektivitas molekul hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* sebagai kandidat vaksin, dinilai dari bangkitnya efektor imun s-Ig A pada mukosa usus dan IL-17 pada serum darah mencit. Penelitian dan pengembangan vaksin *Shigella sp.* saat ini menjadi penting dan terus digencarkan karena belum adanya vaksin yang terlisensi dan direkomendasi oleh WHO, hal itu disebabkan oleh banyaknya diversitas strain dari *Shigella sp.*, oleh karena itu perlu dikembangkan vaksin yang homolog dan efektif untuk semua spesies *Shigella*. Pengembangan vaksin yang efektif harus didasarkan pada patogenesis mikroba penyebab, dan sebagai tahap pertama dalam perjalanan penyakit, *Shigella sp.* harus mampu melakukan adhesi atau perlekatan yang diperankan oleh pili dan OMP. Bakteri yang tidak mampu melakukan adhesi akan dikeluarkan dari tubuh oleh cairan mukus dan gerakan peristaltik tubuh. Kemampuan adhesi suatu protein tertentu dapat diuji dengan uji hemagglutinasi, karena adanya persamaan karakteristik antara molekul kemampuan adhesi bakteri intestinal dengan hemagglutinasi (Mitra *et al.*, 2012).

Penelitian terdahulu, telah berhasil mengidentifikasi molekul hemagglutinin dari subunit pili *Shigella flexneri* yaitu dengan berat molekul 7,9 kDa; 11,2 kDa; 27,3 kDa; 49,8 kDa dan 85 kDa dan dari subunit OMP *Shigella flexneri* dengan berat molekul 23 kDa dan 27 kDa (Anam *et al.*, 2016 dan Fitrianiingsih *et al.*, 2017).

Pada penelitian Anam juga menunjukkan diantara berat molekul tersebut, molekul 49,8 kDa subunit pili memiliki titer hemagglutinin yang paling tinggi sehingga ideal untuk dijadikan sebagai bahan kandidat vaksin (Anam *et al.*, 2016). Pemilihan molekul hemagglutinin dari subunit pili dibandingkan OMP sebagai kandidat vaksin, juga didasarkan pada diversitas strain *Shigella*, yang berdasarkan antigen O

polisakarida yang terdapat pada OMP, sehingga apabila vaksin berbahan molekul hemagglutinin dari OMP, diperkirakan hanya mampu memberi protektivitas terhadap satu atau sedikit dari strain *Shigella sp.*, walau perlu dilakukan penelitian lanjutan. Pemilihan spesies *Shigella flexneri* sebagai kandidat vaksin, didasarkan epidemiologi etiologi yang menunjukkan di Indonesia, proporsi *Shigella flexneri* sebagai penyebab diare berdarah yang paling tinggi (Santoso *et al.*, 2004).

Shigella flexneri sendiri terdiri dari 6 serotipe yang berbeda, walaupun pada penelitian ini tidak dilakukan *serotyping* untuk mengetahui serotipe *Shigella flexneri* yang digunakan.

Pada penelitian ini dilakukan vaksinasi peroral sebanyak 4 kali dengan interval 1 minggu, pemilihan vaksinasi melalui rute per oral didasarkan kemampuannya dalam mencetuskan imunitas mukosa yang penting untuk mencegah infeksi patogen yang melibatkan mukosa seperti *Shigella sp.*, *Vibrio cholerae* dan *Helicobacter pylori* (Ramirez *et al.*, 2018). Selain itu, vaksinasi peroral dinilai lebih ekonomis, tidak invasif dan minimum resiko infeksi akibat penggunaan jarum suntik serta memiliki profil keamanan yang tinggi sehingga cocok diterapkan di negara berkembang seperti di Indonesia (Holmgren *et al.*, 2005). Adanya barrier alami dalam tubuh seperti pH rendah di gaster dan enzim protease di usus, *mucosal tolerance* yang dimediasi oleh Treg untuk mencegah respon berlebihan terhadap antigen yang terdapat pada makanan atau bakteri komensal menjadi tantangan tersendiri vaksinasi melalui rute peroral (Holmgren *et al.*, 2005), oleh karena itu dibutuhkan ajuvan yang kuat, yang dapat meningkatkan imunogenitas vaksin sehingga respon imun inang menjadi lebih efektif. Pada penelitian ini digunakan ajuvan Cholera Toxin B. CTB merupakan toksin cholerae non-toksik yang memiliki afinitas kuat terhadap *monosialotetrahexosylganglioside* (GM 1), reseptor yang banyak diekspresikan oleh sel epitel cerna. CTB juga dinilai paling kuat sebagai immunomodulator sistem imun mukosa dibandingkan dengan

ajuvan lain (Lycke *et al.*, 2012). Pada penelitian Sumarno (2011), telah dibuktikan pemberian molekul adhesin *Vibrio Cholerae* 37,8 kDa terkonjugasi CTB sebagai ajuvan mampu meningkatkan kadar s-Ig A secara bermakna bila dibandingkan dengan kelompok CTB saja maupun kelompok molekul adhesin 37,8 kDa saja. Walaupun telah dibuktikan, alangkah lebih baik terdapat kelompok perlakuan pemberian CTB saja sehingga tidak terdapat faktor perancu dan dapat diketahui respon yang terjadi akibat pemberian vaksin, spesifik atau tidak.

Respon imun yang terjadi di mukosa tergantung pada sifat antigen, jenis APC yang terlibat, dan lingkungan mikro setempat. Antigen nonpatogen seperti protein makanan atau bakteri komensal, secara 'default', sel DC mukosa akan menghasilkan respon Th 2 dan berbagai jenis sel T regulator sehingga terjadi supresi aktif imunitas sistemik (*mucosa tolerance*). Berbeda dengan respon antigen patogen (termasuk antigen vaksin dan ajuvan), yang dikenali oleh APC sebagai 'danger signals' (reseptor TLR, NOD1, dll) sehingga terjadi up regulasi sitokin proinflamasi dan mendukung pengembangan respon imun yang lebih kuat dan lebih luas yang melibatkan efektor humoral-sekretori dan imunitas seluler (Holmgren *et al.*, 2005).

6.1. Vaksin Molekul Hemagglutininn 49,8 kDa Subunit Pili *Shigella flexneri* Meningkatkan Kadar s-Ig A pada Mukosa Usus Mencit Balb/c.

Secretory Ig A merupakan efektor antibodi utama dalam sistem imun mukosa. Ig A secretory diproduksi oleh sel plasma pada lamina propia. Setelah aktivasi dan difenresiasi, Ig A-expressing B lymphoblast akan mengekspresikan reseptor kemokin integrin $\alpha 4:\beta 7$ dan CCR9 yang memungkinkan untuk sel B melakukan *homing*. Ketika di lamina propia, terjadi perubahan isotipe rantai berat (switching) yang dimediasi oleh sitokin terutama TGF β dan IL 5. Untuk mencapai

antigen target yang terdapat di dalam lumen usus, Ig A harus ditransport melewati epitel usus oleh *polymeric Ig receptor* (pIgR). pIgR terletak pada permukaan basolateral sel epitel dan akan berikatan ke bagian Fc reseptor dari Ig A dimerik maupun Ig M pentamerik. Setelah di permukaan lumen epitel usus, ikatan tersebut dipecah oleh protease usus dan bagian pIgR yang masih berikatan dengan Ig A disebut sebagai komponen sekretori (Janeway *et al.*, 2016).

Pada infeksi alamiah *Shigella sp.*, perlindungan yang dimediasi oleh antibodi baru muncul setelah beberapa episode infeksi, dengan durasi yang singkat dan kurang efisien dalam menanggulangi infeksi yang terjadi, terutama pada anak-anak (Raqib *et al.*, 2002). Hal tersebut diperkirakan, dalam beberapa studi, *Shigella sp.* mampu mengeluarkan sitokin immunosuppressive dan menginduksi apoptosis sel imun di lamina propia (Sperandio *et al.*, 2008; Sellge *et al.*, 2010). Hasil biopsi rektal pada beberapa individu yang terinfeksi, juga menunjukkan adanya sel B yang ter-apoptosis (Nothelfer *et al.*, 2014). Interaksi antara *Shigella sp.* dengan respons imun adaptif, baik sel B maupun sel T, belum diketahui secara menyeluruh akibat kurangnya model hewan coba. Di penelitian lain terbaru dengan *human CL-01 B cell line* in vitro dan *mouse B lymphocytes* in vivo menunjukkan, induksi kematian sel B dimediasi faktor virulensi IpaD melalui TLR2, signaling receptor yang penting untuk aktivasi sel B. Yang menarik *IpaD-dependent B cell apoptosis* hanya akan aktif bila terdapat *co-signal* bakteri yang ada hanya pada bakteri *Shigella sp.* intak. Walaupun identifikasi *co-signal* tersebut belum dijabarkan lebih lanjut (Nothelfer *et al.*, 2014). Hasil tersebut menunjukkan vaksin Shigellosis menjadi sangat penting untuk dikembangkan, untuk mencegah perjalanan penyakit bakteri.

Paparan berulang dari antigen yang terdapat dalam vaksin akan meningkatkan produksi Ig A dengan afinitas yang tinggi. Respon awal terhadap adanya paparan antigen vaksin akan meningkatkan titer antibodi secara cepat oleh

sel plasma yang berumur pendek dalam <24 jam pertama dan secara bertahap kembali ke *baseline level* (disebut juga *extrafollicular response*). Ig A yang dibentuk pada *germinal center* yang dibantu oleh sel T, diawali upregulasi ekspresi CXCR5 sehingga terjadi migrasi ke folikel sel B. Maturasi afinitas yang terjadi disebabkan oleh proses hipermutasi somatik. Respon tersebut terjadi dalam beberapa hari setelah vaksin primer. Paparan berulang antigen melalui booster juga akan me-reaktivasi sel imun memori sehingga terbentuk sel plasma berumur panjang yang menghasilkan antibodi dengan afinitas yang tinggi (Siegrist, 2008).

Melalui mekanisme *immune exclusion*, s-Ig A mampu melakukan netralisasi patogen dan toksin yang ada di lumen, maupun yang sudah menembus sel epitel usus dan lamina propia ketika bersamaan ditransport oleh plgR. Kandungan karbohidrat yang tinggi pada bagian Fc rantai berat Ig A, bertindak sebagai “*decoy*” reseptor bakteri patogen usus. s-Ig A juga berperan dalam homeostasis mikrobiota usus. Jika dibandingkan dengan antibodi lain, s-Ig A memiliki kapasitas yang lebih kecil dalam mengaktivasi komplemen jalur klasik sehingga tidak menginduksi inflamasi. Uptake Ig A-antigen kompleks oleh sel dendrit juga menginduksi pelepasan sitokin anti-inflamasi sehingga dapat mencegah penetrasi mikroba tanpa resiko kerusakan jaringan akibat inflamasi yang berlebih (Janeway *et al.*, 2016).

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran kadar s-Ig A setelah pemberian vaksinasi peroral sebanyak 4x selama 28 hari. Hasilnya (gambar 5.3) menunjukkan pemberian molekul hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* sebagai kandidat vaksin, mampu meningkatkan secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p < 0,001$). Hasil tersebut linier dengan penelitian lain yang menggunakan protein adhesin sebagai kandidat vaksin. Czinn (1991) berhasil membuktikan pemberian vaksin intragastrik *Helicobacter pylori* yang dikonjugasikan dengan toksin kolera (CT) mampu meningkatkan konsentrasi

s-IgA dalam lambung menciit (Czinn *et al.*, 1991). Penelitian lain oleh Sumarno, menunjukkan pemberian molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio Cholerae*, protektif mencegah diare ditandai peningkatan s-Ig A (Sumarno *et al.*, 2011). Penelitian yang dilakukan Homenta, juga menunjukkan pemberian molekul adhesin 38,8 kDa *Acinetobacter baumannii* mampu mengaktivasi produksi s-Ig A (Homenta, 2014).

6.2. Vaksin Molekul Hemaglutinin 49,8 kDa Subunit Pili *Shigella flexneri* Meningkatkan Kadar IL-17 Pada Serum Darah Menciit Balb/c.

IL-17 merupakan salah satu sitokin yang terutama berdampak pada sistem imun mukosa. IL-17 disekresi terutama oleh Th 17. Perkembangan sel Th 17 dari sel CD4+ naif dipicu oleh sitokin yang disekresikan oleh sel dendritik dan makrofag sebagai respon terhadap bakteri ekstraseluler maupun jamur. Respon imun alami pada sel dendritik menstimulasi sekresi beberapa sitokin, seperti IL-1, IL-6 dan IL-23. Sitokin-sitokin tersebut akan mengaktifkan faktor transkripsi ROR γ t dan Stat3, yang akan mencetuskan diferensiasi dari Th 17. Sitokin lain, TGF- β yang merupakan inhibitor respon imun yang kuat juga ikut berperan dalam proses tersebut, TGF- β jika muncul bersama IL-6 atau IL-1 akan menyebabkan perkembangan sel Th 17 (Abbas *et al.*, 2016). Di usus, sel Th 17 paling banyak ditemukan pada *effector site* di lamina propia yang perkembangannya juga bergantung pada bakteri komensal khususnya bakteri *segmented filamentous* (Ivanov *et al.*, 2009). Fungsi efektor sitokin IL-17 berperan penting dalam menjaga kekebalan mukosa terhadap patogen spesifik. IL-17 bersama IL-22 mampu menginduksi produksi mediator antimikroba seperti β -defensins (HBD), *regenerating* (ReG) *proteins*, *S100 proteins*, *cathelicidins*, *lipocalins* dan *lactoferrins*. Selain itu, IL-17 juga mampu mencetuskan respon inflamasi dengan mengerahkan neutrofil ke lokasi invasi bakteri dan meningkatkan *repair* dari

mucosa barrier dengan merangsang proliferasi sel epitel dan produksi *tight junction protein* (Valeri, 2016).

Respon *Shigella-specific* T cell pada infeksi alamiah dan bagaimana kontribusinya terhadap proteksi invasi patogen, pada beberapa studi disebutkan, belum dijabarkan secara baik akibat kurangnya model hewan coba *Shigellosis* (Islam *et al.*, 1996; Samandari *et al.*, 2000; Sellge *et al.*, 2010). PBMC yang diisolasi dari sukarelawan yang di vaksinasi kandidat vaksin *S. dysenteriae* 1 telah menunjukkan produksi IFN- γ , tetapi tidak IL-4 dan IL-5 (Samandari *et al.*, 2000).

Peningkatan proporsi sel T yang mengekspresikan marker aktivasi dan memori dan ekspansi *TCR V β family* juga telah dilaporkan pada pasien dengan infeksi alamiah (Islam *et al.*, 1996). Di penelitian lain dengan hewan coba tikus model infeksi infeksi paru, respon sel T yang diinduksi pada infeksi *Shigella* sp. menunjukkan dominasi kuat Th17 atas Th1, berbeda dengan respon sel T terhadap kebanyakan patogen yang didominasi Th1. Pada penelitian yang sama, juga diketahui sitokin IL-17 yang dihasilkan Th17 tidak berperan pada eliminasi *S. flexneri* pada infeksi primer, dari hasil observasi kadar produksinya yang rendah.

Namun sebaliknya, pada infeksi ulang (*reinfection*), IL-17 yang dihasilkan oleh aktivasi sel *Shigella-specific* Th17 membatasi pertumbuhan bakteri (Sellge *et al.*, 2010). Hasil tersebut diperkirakan di penelitian terbaru, *Shigella* sp. mampu menginvasi sel T CD4⁺ teraktivasi dan menghambat migrasi *chemoattractant-mediated T cell* melalui IpgD dengan menurunkan konsentrasi PIP2 pada membran plasma, sehingga menonaktifkan protein ERM (protein membrane cytoskeleton crosslinkers yang penting untuk migrasi sel T) (Ashida *et al.*, 2015).

Pada penelitian ini, dilakukan pengukuran kadar IL-17 dalam serum darah, hal tersebut didasarkan peningkatan kadar IL-17 dalam mencit berkolerasi dengan peningkatan kadar IL-17 yang ada di dalam mukosa usus karena pada dasarnya sel-sel efektor imun usus akan tetap menuju sirkulasi sistemik dan melakukan

homing ke usus tempat dimana sel tersebut diaktifkan. Walaupun berkorelasi, terdapat beberapa faktor yang mungkin mempengaruhi kadar IL-17 dalam serum darah, diantaranya, usia, gender, genetik, kondisi inflamasi baik sistemik maupun lokal, disregulasi sitokin terkait, dll. Studi Kleiner (2013) pada 37 anak-anak dan 35 orang dewasa, menunjukkan terdapat hubungan antara konsentrasi beberapa sitokin dengan usia menggunakan *multiplex bead-based immunoassays* dengan sampel serum. Kadar eotaxin dan IL-17 lebih rendah signifikan pada kelompok anak-anak dibandingkan dengan kelompok dewasa, berbeda dengan sitokin lain seperti, *growth-related oncogene* (GRO)- α , IL-18, *macrophage migration inhibitory factor* (MIF), *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 β , *stem cell factor* (SCF), dan *stem cell growth factor* (SCGF)- β yang kadarnya lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok dewasa (Kleiner *et al.*, 2013). Pada beberapa studi disebutkan produksi IL-17 yang tinggi dihubungkan dengan insidensi penyakit autoimun multiple sclerosis atau rheumatoid arthritis yang lebih tinggi pada wanita (Gaffen, 2004; Gold dan Lüder, 2008). Pada studi lain, produksi IL-17 yang tinggi pada wanita disebutkan mungkin hanya merupakan cermin dari adanya kolonisasi *Candida* pada mukosa vagina (Horst, *et al.*, 2016). Selain di sistem imun mukosa, produksi IL-17 yang tinggi juga dipengaruhi respon inflamasi di tempat lain, seperti kartilago sendi, meniscus, otak, jaringan hematopoiesis, ginjal, dan kulit (Moseley *et al.*, 2003). Disregulasi sitokin-sitokin lain yang berperan dalam upregulasi dari IL-17 maupun differensiasi sel T CD4⁺ naif seperti IL-23, IL-1 β , IL-6, IL-21 dan TGF β juga mempengaruhi kadar IL-17 pada serum darah mencit (Bunte dan Beikler, 2019). Akibat adanya faktor-faktor perancu tersebut, mungkin perlu penelitian lanjutan untuk memeriksa kadar IL-17 dari mukosa usus mencit.

Pada penelitian ini, hasilnya (gambar 5.3) menunjukkan pemberian molekul hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* sebagai kandidat vaksin mampu meningkatkan secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol

($p < 0,001$). Hasil tersebut linier dengan penelitian lain yang dilakukan oleh Rully yang menunjukkan pemberian molekul hemagglutinin 49,8 kDa mampu meningkatkan ekspresi sel Th 17 pada lien mencit Balb/c. Pada penelitian itu juga diketahui bahwa pemberian molekul hemagglutinin 49,8 kDa, meningkatkan ratio Th17/Treg dengan nilai >1 yang menunjukkan paparan antigen dalam kandungan vaksin memberikan efek protektif ditandai dengan lebih dominan respon imun efektor jika dibandingkan dengan respon imun regulator (Rully, 2019). Respon molekul adhesin sebagai kandidat vaksin terhadap peningkatan kadar IL-17 juga dijelaskan dalam penelitian lain. Indraswari (2019) membuktikan pemberian molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* mampu meningkatkan kadar IL-17 pada serum mencit Balb/c (Indraswari, 2019). Peningkatan kadar IL-17 juga diketahui mampu mencegah kolonisasi *Streptococcus pneumoniae* pada mencit yang divaksin (Lu, *et al.*, 2008).

Pada penelitian ini pemberian molekul hemagglutinin 49,8 subunit pili *Shigella flexneri* mampu meningkatkan baik itu kadar IL-17 maupun kadar s-Ig A, dan dari hasil uji korelasi menggunakan uji spearman, menunjukkan terdapat korelasi positif kuat antara kadar s-Ig A dengan kadar IL-17 (koefisien korelasi = 0.728). Hal tersebut sesuai dengan teori, bahwa IL-17 berperan penting dalam meningkatkan ekspresi pIgR yang penting untuk komponen secretory immunoglobulin A. Pada hewan coba mencit mutan T cell-deficient TCR β $\times$ δ $-/-$, terjadi penurunan ekspresi pIgR dan s-Ig A. Kemudian replasi dengan sel Th17 dari mencit transgenic CBir1 flagellin TCR, dapat meningkatkan pIgR dan s-Ig A (Cao *et al.*, 2012). Pada hewan coba yang kekurangan Ig A saja memiliki fenotipe normal sedangkan hewan coba yang kekurangan pIgR rentan terhadap infeksi mukosa dan peningkatan penetrasi bakteri komensal ke jaringan. Walaupun defek genetik pIgR belum pernah dilaporkan pada manusia, menunjukkan defek genetik tersebut bersifat fatal (Janeway *et al.*, 2016).

Dengan demikian, molekul hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* potensial untuk dijadikan sebagai kandidat vaksin untuk diare yang disebabkan oleh *Shigella flexneri*.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Terdapat beberapa keterbatasan dalam penelitian ini. Molekul hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* perlu dilakukan uji adhesin untuk mengonfirmasi suatu molekul adhesin. Respon imun yang terbentuk akibat pemberian vaksin peroral sulit diketahui apakah spesifik untuk molekul hemagglutinin 49,8 kDa atau karena efek CTB sebagai adjuvan, oleh karena itu perlu desain penelitian dengan kelompok perlakuan pemberian CTB saja. Pada penelitian ini, metode pengukuran kadar s-Ig A tidak spesifik untuk antibodi s-Ig A-*specific hemagglutinin*, sehingga perlu digunakan kit deteksi s-Ig A yang telah dilapisi antigen hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri*. Walaupun peningkatan kadar IL-17 pada serum darah berkorelasi dengan peningkatan kadar IL-17 pada mukosa usus, untuk menyingkirkan faktor-faktor perancu, alangkah lebih baik bila dilakukan pengukuran kadar IL-17 dengan sampel kerokan mukosa usus. Selain itu sebaiknya dilakukan *serotyping* untuk mengetahui serotipe *Shigella flexneri* yang digunakan sebagai kandidat vaksin dan efek protektivitas terhadap *Shigella sp.* lain untuk pengembangan vaksin yang homolog dan efektif.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah:

1. Terdapat peningkatan kadar s-Ig A yang bermakna pada mukosa usus menciit yang divaksinasi dengan molekul hemaglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri*.
2. Terdapat peningkatan kadar IL-17 yang bermakna pada serum darah menciit yang divaksinasi dengan molekul hemaglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri*.

7.2. Saran

Saran yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Perlu dilakukan uji adhesin, untuk mengonfirmasi molekul hemaglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* sebagai molekul adhesin.
2. Perlu kelompok perlakuan yang hanya diberikan ajuvan CTB, sehingga dapat diketahui respon imun yang muncul apakah spesifik terhadap molekul hemaglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri*.
3. Perlu digunakan kit deteksi s-Ig A yang telah dilapisi antigen hemaglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* sehingga spesifik untuk antibodi s-Ig A-spesifik hemaglutinin.
4. Perlu dilakukan pengukuran kadar IL-17 dengan sampel mukosa usus, untuk menyingkirkan faktor perancu.

5. Perlu dilakukan uji serotyping untuk menentukan strain bakteri *Shigella* yang digunakan dan uji protektifitas terhadap spesies *Shigella* sp. lain.

6. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui protektifitas molekul hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* sebagai kandidat vaksin dengan metode MLIL.



DAFTAR PUSTAKA

Abbas, A. K., & Lichtman, A. H. 2016. *Imunologi Dasar* Abbas: Fungsi dan Kelainan Sistem Imun. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders. Edisi Indonesia Kelima.

Abusleme, L., & Moutsopoulos, N. M. 2017. IL-17: Overview and Role In Oral Immunity and Microbiome. *Oral diseases*, 23(7), 854-865.

Agtini, M. D., Soeharno, R., Lesmana, M., Punjabi, N. H., Simanjuntak, C., Wangsasaputra, F., ... & Pujarwoto, H. 2005. The Burden of Diarrhoea, Shigellosis, and Cholera in North Jakarta, Indonesia: Findings from 24 Months Surveillance. *BMC infectious diseases*, 5(1), 89.

Agustina, W., Fitri, L., Yudani, T., Siswanto, B., & Sumarno, R. P. 2012. Antibody Protein Hemagglutinin Subunit Pili With MW 49, 8 kDa *Shigella dysenteriae* Can Inhibit *Shigella dysenteriae* Adhesion on Mice Enterocyte. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2(5), 13-20.

Anam, Khoirul., Nurdiana, Nurdiana., Hernowati, Tinny Endang., Hidayat, Suyuti., & Sumarno. 2016. Cross Immunity among the 49.8 KDa Pili Subunit Hemagglutinin Proteins and 7.9 KDa Pili Subunit Anti Hemagglutinin Proteins of *Shigella spp.* *Ijppr.Human*, 2016; Vol. 7 (2): 19-30.

Anderson IV, J. D., Bagamian, K. H., Muhib, F., Amaya, M. P., Laytner, L. A., Wierzba, T., & Rheingans, R. 2019. Burden of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Shigella* Non-fatal Diarrhoeal Infections in 79 Low-income and Lower Middle-income Countries: a Modelling analysis. *The Lancet Global Health*, 7(3), e321-e330.

Aryal, Sagar. 2019. Biochemical Test and Identification of *Shigella flexneri*. Online. <https://microbiologyinfo.com/biochemical-test-and-identification-of-shigella-flexneri/>. Diakses tanggal 21 September 2019 pukul 13.01.

Ashida, H., Mimuro, H., & Sasakawa, C. 2015. *Shigella* Manipulates Host Immune Responses by Delivering Effector Proteins with Specific Roles. *Frontiers in Immunology*, 6, 219.

Bakhtiar, T., 2016, January. Optimal Intervention Strategies for Cholera Outbreak by Education and Chlorination. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 31, No. 1, p. 012022). IOP Publishing.

Berne, C., Ellison, C. K., Ducret, A., & Brun, Y. V. 2018. Bacterial Adhesion at the Single-cell Level. *Nature Reviews Microbiology*, 16(10), 616-627.

Boyaka, P. N. 2017. Inducing Mucosal IgA: a Challenge for Vaccine Adjuvants and Delivery Systems. *The Journal of Immunology*, 199(1), 9-16.

Brandtzaeg, P. 1983. The Secretory Immune System of Lactating Human Mammary Glands Compared With Other Exocrine Organs. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 409: 353-382. doi:10.1111/j.1749-6632.1983.tb26883.x

Brandtzaeg, P. 1989. Overview of The Mucosal Immune System. New Strategies for Oral Immunization. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 146. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-74529-4_2

Bunte, K., & Beikler, T. 2019. Th17 Cells and The IL-23/IL-17 Axis in The Pathogenesis of Periodontitis and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3394.

Cao, A. T., Yao, S., Gong, B., Elson, C. O., & Cong, Y. 2012. Th17 Cells Upregulate Polymeric Ig Receptor and Intestinal IgA and Contribute to Intestinal Homeostasis. *The Journal of Immunology*, 189(9), 4666-4673.

Corthésy, B. 2013. Multi-faceted Functions of Secretory IgA at Mucosal Surfaces. *Frontiers in Immunology*, 4, 185.

Czinn, S. J., & Nedrud, J. G. (1991). Oral Immunization Against *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, 59(7), 2359-2363.

Faruque, S. M., Albert, M. J., & Mekalanos, J. J. 1998. Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(4), 1301-1314.

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.

Gaffen, S. L. 2004. Biology of recently discovered cytokines: interleukin-17—a unique inflammatory cytokine with roles in bone biology and arthritis. *Arthritis Res Ther*, 6(6), 240.

Gaffen, S. L. 2009. Structure and Signalling in The IL-17 Receptor Family. *Nature Reviews Immunology*, 9(8), 556.

Gold, R., & Lühder, F. 2008. Interleukin-17—extended Features of a Key Player in Multiple Sclerosis. *The American journal of pathology*, 172(1), 8-10.

Herwana, E., Surjawidjaja, J. E., Salim, O. C., Indriani, N., Bukitwetan, P., & Lesmana, M. 2010. *Shigella*-associated Diarrhea in Children in South

- Jakarta, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 41(2), 418-25.
- Holmgren, J., & Czerkinsky, C. 2005. Mucosal Immunity and Vaccines. *Nature medicine*, 11(4s), S45.
- Homenta, H., Prawiro, S.R., Sardjono, T.W. and Noorhamdani, A.S., 2014. The 38.8 kDa Pili Subunit Hemagglutinin Protein of *Acinetobacter baumannii* is an Adhesin Protein that can activate s-IgA Production. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*. E-ISSN, pp.2278-3008.
- Horst, R., Jaeger, M., Smeekens, S. P., Oosting, M., Swertz, M. A., Li, Y., ... & Toenhake-Dijkstra, H. 2016. Host and Environmental Factors Influencing Individual Human Cytokine Responses. *Cell*, 167(4), 1111-1124.
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ögren, J., Frick, I. M., Kersulyte, D., Incecik, E. T., ... & Boren, T. 1998. *Helicobacter Pylori* Adhesin Binding Fucosylated Histo-Blood Group Antigens Revealed by Retagging. *Science*, 279(5349), 373-377.
- Inatsuka, Carol, Steven M. Julio and Peggy A. Cotter. 2005. Bordetella Filamentous Hemagglutinin Plays a Critical Role In Immunomodulation, Suggesting a Mechanism For Host Specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Dec 2005, 102 (51) 18578-18583; DOI: 10.1073/pnas.0507910102.
- Indraswari, Genitri. 2019. *Pengaruh Pemberian Molekul Adhesi 37,8 kDa Subunit Pili Vibrio cholerae terhadap Kadar IL-17A, Kadar secretory-IgA, dan Jumlah Koloni Bakteri pada Mencit Balb/c dengan Metode Mice Ligated Ileal Loop (MLIL)*. Thesis. Universitas Brawijaya.

Integrated Taxonomic Information System. 2012. *Shigella flexneri* : Taxonomic Serial No.: 966035. Online. Diakses tanggal 19 Oktober 2019 pukul 10.10. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=966035#null.

Islam, D., Wretling, B., Lindberg, A. A., & Christensson, B. 1996. Changes in The Peripheral Blood T-Cell Receptor V Beta Repertoire in Vivo and in Vitro During Shigellosis. *Infection and immunity*, 64(4), 1391-1399.

Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., ... & Tanoue, T. 2009. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell*, 139(3), 485-498.

Janeway, C., Murphy, K.P., Travers, P. dan Walport, M. 2016. *Janeway's immunobiology*. Garland Science.

Jin, W. and Dong, C., 2013. IL-17 Cytokines in Immunity and Inflammation. *Emerging Microbes & Infections*, 2(9), p.e60.

Kaiser, Gary. 2019. Fimbriae and Pili. Online. Diakses tanggal 8 Desember 2019. [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3AMicrobiology_\(Kaiser\)/Unit_1%3A_Introduction_to_Microbiology_and_Prokaryotic_Cell_Anatomy/2%3A_The_Prokaryotic_Cell_-_Bacteria/2.5%3A_Structures_Outside_the_Cell_Wall/2.5C%3A_Fimbriae_and_Pili](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3AMicrobiology_(Kaiser)/Unit_1%3A_Introduction_to_Microbiology_and_Prokaryotic_Cell_Anatomy/2%3A_The_Prokaryotic_Cell_-_Bacteria/2.5%3A_Structures_Outside_the_Cell_Wall/2.5C%3A_Fimbriae_and_Pili)

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2011. Situasi Diare di Indonesia. ISSN 2088 – 270X Triwulan II.

Killian, M., Russell, M. W. 1994. Function of Mucosal Immunoglobulins. IN *Handbook of Mucosal Immunology*.

Kim, S. H., & Jang, Y. S. 2017. The Development of Mucosal Vaccines for Both Mucosal and Systemic Immune Induction and The Roles Played by Adjuvants. *Clinical and experimental vaccine research*, 6(1), 15-21.

Kleiner, G., Marcuzzi, A., Zanin, V., Monasta, L., & Zauli, G. 2013. Cytokine Levels in The Serum of Healthy Subjects. *Mediators of inflammation*, 2013.

Kotloff, K.L., Riddle, M.S., Platts-Mills, J.A., Pavlinac, P. and Zaidi, A.K., 2018. Shigellosis. *The Lancet*, 391(10122), pp.801-812..

Kumar, P., Chen, K., & Kolls, J. K. 2013. Th17 Cell Based Vaccines in Mucosal Immunity. *Current opinion in immunology*, 25(3), 373-380.

Kweon, M. N. 2008. Shigellosis: The Current Status of Vaccine Development. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(3), 313-318.

Lesmana, Murad. 2004. Perkembangan Mutakhir Infeksi Kolera. *J Kedokteran Trisakti*. Juli-September 2004, Vol.23 No.3.

Liu, B., Knirel, Y. A., Feng, L., Perepelov, A. V., Senchenkova, S. Y. N., Wang, Q., ... & Wang, L. 2008. Structure and Genetics of Shigella O Antigens. *FEMS microbiology reviews*, 32(4), 627-653.

Lopez, Araceli Perez, Judith Behnsen, Sean-Paul Nuccio and Manuela Raffatellu. 2016. Mucosal Immunity to Pathogenic Intestinal Bacteria. *Nature Reviews Immunology*. Volume16, pages135–148 (2016).

Lu, Y. J., Gross, J., Bogaert, D., Finn, A., Bagrade, L., Zhang, Q., ... & Thompson, C. M. 2008. Interleukin-17A Mediates Acquired Immunity to Pneumococcal Colonization. *PLoS pathogens*, 4(9), e1000159.

Lycke, N., 2012. Recent Progress in Mucosal Vaccine Development: Potential and Limitations. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), p.592.

Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., ... & Weaver, C. T. 2006. Transforming Growth Factor- β Induces Development of the Th 17 Lineage. *Nature*, 441(7090), 231.

Mani, S., Wierzba, T., & Walker, R. I. 2016. Status of Vaccine Research and Development for Shigella. *Vaccine*, 34(26), 2887-2894.

Mantis, N. J., Rol, N., & Corth sy, B. 2011. Secretory IgA's Complex Roles in Immunity and Mucosal Homeostasis in the Gut. *Mucosal immunology*, 4(6), 603.

Mathias, A., & Corth sy, B. 2011. Recognition of Gram-Positive Intestinal Bacteria by Hybridoma and Colostrum-derived secretory Immunoglobulin A is Mediated by Carbohydrates. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 17239-17247.

Mitra, S., Saha, D. R., Pal, A., Niyogi, S. K., Mitra, U., & Koley, H. 2012. Hemagglutinating activity is directly correlated with colonization ability of shigellae in suckling mouse model. *Canadian journal of microbiology*, 58(10), 1159-1166.

Moseley, T. A., Haudenschild, D. R., Rose, L., & Reddi, A. H. 2003. Interleukin-17 family and IL-17 Receptors. *Cytokine & growth factor reviews*, 14(2), 155-174.

Nothelfer, K., Arena, E. T., Pinaud, L., Neunlist, M., Mozeleski, B., Belotserkovsky, I., ... & Sansonetti, P. J. 2014. B Lymphocytes Undergo TLR2-Dependent Apoptosis Upon Shigella Infection. *Journal of Experimental Medicine*, 211(6), 1215-1229.

Pasquale, A., Preiss, S., Silva, F., & Garçon, N. 2015. Vaccine Adjuvants: From 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines*, 3(2), 320-343.

Patel, D. N., King, C. A., Bailey, S. R., Holt, J. W., Venkatachalam, K., Agrawal, A., ... & Chandrasekar, B. 2007. Interleukin-17 Stimulates C-Reactive Protein Expression in Hepatocytes and Smooth Muscle Cells Via P38 MAPK and ERK1/2-Dependent NF-Kb and C/EBP β Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), 27229-27238.

Philpott, D. J., Edgeworth, J. D., & Sansonetti, P. J. 2000. The Pathogenesis of *Shigella flexneri* Infection: Lessons From in Vitro and in Vivo Studies. In *The Activities Of Bacterial Pathogens In Vivo: Based on Contributions to a Royal Society Discussion Meeting* (pp. 63-94).

Qu, N., Xu, M., Mizoguchi, I., Furusawa, J. I., Kaneko, K., Watanabe, K., ... & Yoshimoto, T. 2013. Pivotal Roles of T-Helper 17-Related Cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in Inflammatory Diseases. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013.

Ramirez, A., Morris, S., Maucourant, S., D'Ascanio, I., Crescente, V., Lu, I.N., Farinelle, S., Muller, C.P., Whelan, M. and Rosenberg, W., 2018. A Virus-like Particle Vaccine Candidate for Influenza A Virus Based on Multiple Conserved Antigens Presented on Hepatitis B Tandem Core Particles. *Vaccine*, 36(6), pp.873-880.

Raqib, R., Qadri, F., Sarkar, P., Mia, S. M. S., Sansonetti, P. J., Albert, M. J., & Andersson, J. 2002. Delayed and Reduced Adaptive Humoral Immune Responses in Children With Shigellosis Compared With in Adults. *Scandinavian journal of immunology*, 55(4), 414-423.

Rully, Septha. 2019. *Pengaruh Pemberian Vaksin Molekul Adhesion Sub Unit Pili 49,8 kDa Shigella flexneri terhadap Ekspresi Sel T helper 17 (Th-17) dan Sel T regulator (T reg) pada Lien Mencit balb/c*. Thesis. Universitas Brawijaya

Ryan, K. J., & Ray, C. G. 2004. *Sherris Medical Microbiology 4th edition*. McGraw Hill.

Samandari, T., Kotloff, K. L., Losonsky, G. A., Picking, W. D., Sansonetti, P. J., Levine, M. M., & Sztein, M. B. 2000. Production of IFN- γ and IL-10 to *Shigella* Invasins by Mononuclear Cells from Volunteers Orally Inoculated with A Shiga Toxin-Deleted *Shigella Dysenteriae* Type 1 Strain. *The Journal of Immunology*, 164(4), 2221-2232.

Santoso, Siti Sapardiyah, I.B. Indra Gotama, Imam Waluyo. 2004. *Persepsi Masyarakat Terhadap Penyakit Shigella (Disentri) Di Jakarta Utara*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.

Salyer, AA. dan Whitt, DD. 2002. *Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach*. ASM Press Washington DC. 115-127

Schroeder, G. N., & Hilbi, H. 2008. Molecular Pathogenesis of *Shigella* sp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. *Clinical microbiology reviews*, 21(1), 134-156.

Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., & Finlay, B. B. 2010. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological reviews*, 90(3), 859-904.

Sellge, G., Magalhaes, J. G., Konradt, C., Fritz, J. H., Salgado-Pabon, W., Eberl, G., ... & Phalipon, A. 2010. Th17 Cells are The Dominant T Cell Subtype Primed by *Shigella Flexneri* Mediating Protective Immunity. *The journal of immunology*, 184(4), 2076-2085.

Setyorini, D., Yulian, D. U., Widjayanto, E., Winarsih, S., Noorhamdani, A. S., & Sumarno, R. P. 2013. Protectivity of adhesion molecules pili 49.8 kDa *Shigella dysenteriae* conjugated with ISCOM against bacterial colonization and colonic epithelial cells damage. *Int J Trop Med* 2013; 8 (1): 19, 26.

Sharmila, T., & Thomas, T. A. 2018. Pathogenesis of Cholera: Recent Prospectives in Rapid Detection and Prevention of Cholera. *Bacterial Pathogenesis and Antibacterial Control*, 129. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.74071>

Siegrist, C. A. 2008. Vaccine Immunology. *Vaccines*, 5(1), 17-36.

SMIS. 2013. UK Standards for Microbiology Investigations : Identification of *Shigella* species. *Public Health England*.

Sperandio, B., Regnault, B., Guo, J., Zhang, Z., Stanley, S. L., Sansonetti, P. J., & Pédrón, T. 2008. Virulent *Shigella Flexneri* Subverts The Host Innate Immune Response Through Manipulation of Antimicrobial Peptide Gene Expression. *Journal of Experimental Medicine*, 205(5), 1121-1132.

Sumarno. 2000. *Karakterisasi Molekuler Protein Adesi Vibrio cholerae 01 m094v dan Protein Reseptornya pada Sel Epitel Usus Halus Tikus Putih (Wistar) : Studi Patogenesis Vibrio cholerae 01 m094v*. Disertasi Thesis, Universitas Airlangga.

Sumarno, S.A. and Ismanoe, G., 2011. Combinations of Protein Subunit Pili 37.8 KDa V. Cholerae with Cholera Toxin Sub-Unit B V. cholerae Can Protect Come Out of the Solution in the Intestinal Mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 1(8), pp.154-160

Sumarno, R. P., Winarsih, S., Hidayat, S., & Utami, Y. W. 2015. *Shigella dysenteriae* pili proteins as an adhesive molecule can protect moving solution by using mice legated ilea loop model. *Int J Trop Med* 2015; 10 (1–2): 1, 4.

Stratmann, T. 2015. Cholera Toxin Subunit B as Adjuvant—an Accelerator in Protective Immunity and A Break in Autoimmunity. *Vaccines*, 3(3), 579-596.

Tabarkiewicz, J., Pogoda, K., Karczmarczyk, A., Pozarowski, P., & Giannopoulos, K. 2015. The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 63(6), 435-449.

Todar, Kenneth. 2012. *Shigella* and *Shigellosis*. Online. Diakses tanggal 3 Oktober 2019 pukul 19.25. http://textbookofbacteriology.net/Shigella_1.html

Valeri, M., & Raffatellu, M. 2016. Cytokines IL-17 and IL-22 in the Host Response to Infection. *Pathogens and disease*, 74(9), ftw111.

Viva. 2019. What Is The Structural Difference between Flagella and Pili?. *Vivadifferences*. Online. Diakses tanggal 5 Februari 2020 pukul 08.34

Walter, J., & Ley, R. 2011. The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes. *Annual review of microbiology*, 65, 411-429.

Wizemann, T. M., Adamou, J. E., & Langermann, S. 1999. Adhesins As Targets for Vaccine Development. *Emerging infectious diseases*, 5(3), 395.

WHO. 2013. Vaccine Safety Basics. Online. <https://vaccine-safety-training.org/>. Diakses tanggal 20 September 2019 pukul 20.06

WHO. 2016. The Top 10 Causes of Death. Online. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. diakses tanggal 7 September 2019 pukul 19.40.

WHO. 2018. Cholera. Online. https://www.who.int/health-topics/cholera#tab=tab_1. Diakses tanggal 19 Oktober 2019 pukul 09:56

Zumsteg, A. B., Goosmann, C., Brinkmann, V., Morona, R., & Zychlinsky, A. 2014. Icsa Is a *Shigella flexneri* Adhesin Regulated by The Type III Secretion System and Required for Pathogenesis. *Cell host & microbe*, 15(4), 435-445.



LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat Keterangan Kelaikan Etik

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (0341) 551611 Fax. 1480, 567117, 567192 - Fax. (0341) 561755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")**
No. 44 / EC / KEPK - S2 / 03 / 2018

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL : Reaksi Silang Respons Imun antara Molekul Adhesin *Shigella* dan *Vibrio Cholerae*.

PENELITI UTAMA : Septha Rully D P
Gentiri Indraswari
Elsa Larissa
Merika Soraya
Aisyah Amalia
Andrian Prasetya
Guntur Rizal H
Jaya Purna K
Safira Nur Alitha P
Dea Aninditha
Rafif Uliya Aditya

UNIT / LEMBAGA : S2 Biomedik - Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang.

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Sentral Hayati Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.

16 MAR 2018

Prof. Dr. Moch. Istiadid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr.H.
NIP. 195746683

Catatan :
Keterangan Laik Etik ini Berlaku 1 (satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Hasil Pelaksanaan Penelitian Wajib Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Pemohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).

Lampiran 2 Data Hasil Pengukuran

2.1 Hasil Pengukuran Kadar s-Ig A

Tabel Hasil Pengukuran Kadar s-Ig A

Mencit	Kontrol ($\mu\text{g/mL}$)	Perlakuan ($\mu\text{g/mL}$)
1	2,05	4,61
2	2,60	3,76
3	2,77	3,54
4	2,87	3,40
5	3,15	3,21
6	2,74	3,37
7	2,92	3,45
8	2,83	3,62
9	2,40	4,00
Rerata	2,70	3,66
$\pm\text{SD}$	0,32	0,42

2.2 Hasil Pengukuran Kadar IL-17

Tabel Hasil Pengukuran Kadar IL-17

Mencit	Kontrol (ng/mL)	Perlakuan (ng/mL)
1	0,30	3,33
2	0,41	2,15
3	1,50	1,92
4	1,31	1,85
5	1,70	1,76
6	0,82	2,07
7	1,70	1,76
8	1,37	1,84
9	0,55	3,07
Rerata	1,07	2,19
±SD	0,56	0,59

Lampiran 3 Output SPSS

3.1 Hasil Uji Normalitas

Uji Normalitas Data Rerata Kadar s-Iga dan IL-17

Kelompok		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
s-Ig A	perlakuan	.206	9	.200*	.863	9	.104
	kontrol	.249	8	.155	.855	8	.108
IL-17	perlakuan	.308	9	.014	.739	9	.004
	kontrol	.220	8	.200*	.908	8	.342

a. Lilliefors Significance Correction

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

3.2 Hasil Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
s-Ig A	Based on Mean	.405	1	16	.534
	Based on Median	.234	1	16	.635
	Based on Median and with adjusted df	.234	1	14.451	.636
	Based on trimmed mean	.321	1	16	.579
IL-17	Based on Mean	.113	1	16	.741
	Based on Median	.169	1	16	.686
	Based on Median and with adjusted df	.169	1	14.264	.687
	Based on trimmed mean	.210	1	16	.653

3.2 Hasil Uji Hipotesis

Hasil Uji T-independent Rerata Kadar s-Ig A

		Levene Test ...		t-test for Equality...						
		F	Significanc e	t	df	Sig(2- tailed)...	Mean Difference	Std. Error Diff...	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
s-Ig A	Equal variances ...	.405	.534	5.403	16	.000	.95889	.17748	.58265	1.33513
	Not Equal variances ...			5.403	14.898	.000	.95889	.17748	.58037	1.33741

Hasil Uji Mann-Whitney Rerata Kadar IL-17

	IL-17
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-3.580
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Correlations

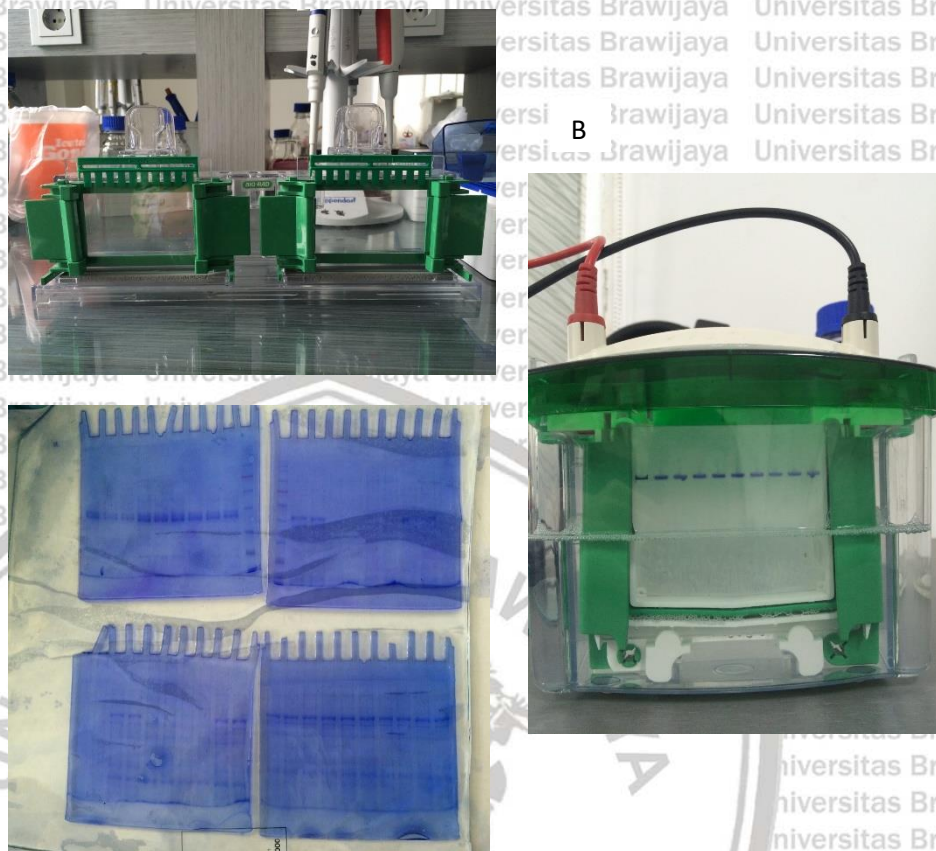
			IL17	IgA
Spearman's rho	IL-17	Correlation Coefficient	1.000	.728*
		Significance (2-tailed)	.	.026
		N	9	9
s-IgA		Correlation Coefficient	.728*	1.000
		Significance (2-tailed)	.026	.
		N	9	9

*. Corr. is significant at .05 level 2-tail...



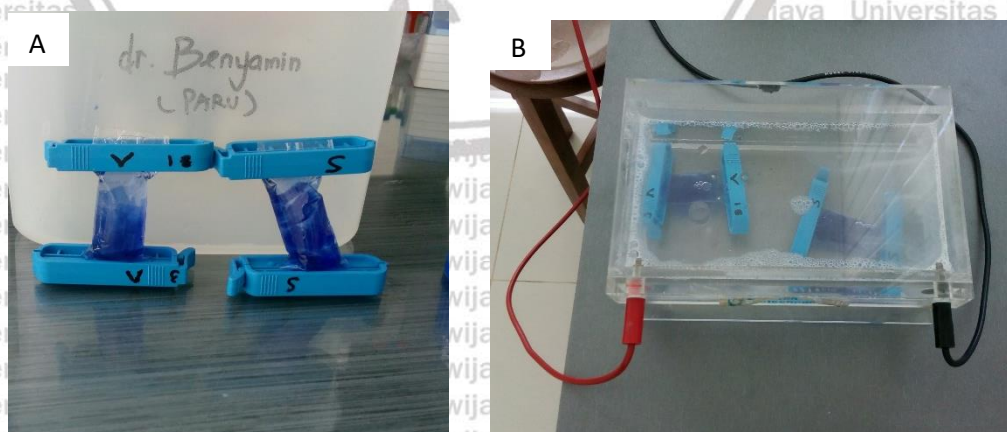
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian

4.1. Prosedur SDS PAGE



Keterangan : (A) Kaset gel elektroforesis (B) Proses running gel elektroforesis, dapat dilihat *band* protein subunit berwarna biru (*comassie blue*) (C) Hasil elektroforesis, didapatkan bahwa sampel protein subunit *S. flexneri* memiliki berat molekul 49,8 kDa dengan analisis GelDoc EZ Imager

4.2. Prosedur Purifikasi Protein dengan Elektroelusi



Keterangan: (A) *Band* protein 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* dimasukkan ke dalam kantong selofan dan dijepit di kedua ujungnya setelah ditambahkan *running buffer* (B) Kantong selofan dimasukkan kedalam *chamber* elektroelusi yang berisi *running buffer* dan dialiri listrik selama 60 menit.

4.3 Vaksinasi dan Pembedahan Hewan Coba



Keterangan: Pemberian molekul hemagglutinin 49,8 kDa subunit pili *S. flexneri* per oral menggunakan sonde selama 28 hari pada hari ke-7, 14, 21, dan 28.



Lampiran 5. Surat Keterangan Orisinalitas Tesis



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755
<http://www.fk.ub.ac.id> e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

SURAT KETERANGAN

Nomor 727 /UN10.F08.08/PP/2019

Yang bertanda tangan dibawah ini,

nama : Dr.Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes
NIP : 197511252005012001
pangkat dan golongan : Penata Muda, III/a
jabatan : Ketua Badan Penerbitan Jurnal Fakultas Kedokteran

dengan ini menerangkan bahwa,

nama : Adrian Prasetya
nim : 166070122011011
program studi : Magister Ilmu Biomedik
judul : Protein Hemaglutinin 49,8 kDa Subunit Pili *Shigella flexneri*
Sebagai Kandidat Vaksin Menginduksi Respon Imun Mukosa
Secretory Immunoglobulin Dan Serum Interleukin-17 Pada Mencit
BALB/C
jenis artikel : Tesis
jumlah halaman : 88

berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal Fakultas
Kedokteran menyatakan bahwa Artikel Ilmiah tersebut diatas memiliki kemiripan 5 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

26 DEC 2019

Ketua Badan Penerbitan Jurnal,



Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes
NIP 19751125 200501 2 001

Lampiran 6. Keterangan Submit Jurnal

INJM-D-19-00764 - Co-Author Notification - [EMID:e8cfd18ec7f8a0ea]

Inbox x



Indian Journal of Microbiology (INJM) <em@editorialmanager.com>

Oct 24, 2019, 10:18 PM



to me

Re: "49,8 kDa Sub-unit Pili of *Shigella flexneri* as Homologous Vaccine Candidate Against *Vibrio cholera*"

Full author list: Sumarno Reto Prawiro, DMM, Sp. MK (K); Sri Winarsih, Apt., M.Si; Merika Soraya, M.D.; Septha Rully Dwi Pradipto, MD; Adrian Prasetya, MD; Aisyah Amalia, MD; Genitri Indraswari, MD; Elsa Larissa Widyani, MD; Rafif Ulya Aditya, S.Ked; Dea Aninditha, S.Ked

Dear dr Prasetya,

We have received the submission entitled: "49,8 kDa Sub-unit Pili of *Shigella flexneri* as Homologous Vaccine Candidate Against *Vibrio cholera*" for possible publication in Indian Journal of Microbiology, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. dr Merika Soraya who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office

Indian Journal of Microbiology

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.



Lampiran 7. Riwayat Hidup Penulis**RIWAYAT HIDUP**

Adrian Prasetya, lahir di Serang, 22 Juni 1996 adalah putra kedua dari Tatang Sumantri dan Subur, S.H. Ia menempuh jenjang pendidikan dasar di SD Mardi Yuana Cilegon pada tahun 2002 dan lulus pada tahun 2008. Kemudian ia menempuh jenjang pendidikan kementerian di SMPN 1 Cilegon (2008-2011) dan dilanjutkan di SMAN 1 Serang (2011-2013). Selanjutnya ia menempuh kuliah di Universitas Brawijaya Malang (2013-2016) Fakultas Kedokteran Program Studi S1 Pendidikan Dokter dan Program Profesi Dokter mulai tahun 2017 hingga tahun 2019 dan dinyatakan lulus dengan predikat “cumlaude”. Pada tahun 2017, ia juga melanjutkan pendidikan S2 Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Malang, 29 Januari 2020

