

VAKINASI MOLEKUL ADHESIN 37,8 kDA SUBUNIT PILI *Vibrio cholerae* DENGAN ADJUVAN CTB TERHADAP KADAR IL-17A,

KADAR SECRETORY-IgA, DAN JUMLAH KOLONI BAKTERI PADA MENCIT MODEL DIARE *Shigella flexneri*

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Magister Biomedik



Oleh:

dr. Genitri Indraswari

NIM 166070122011001

**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
KONSENTRASI PADA MIKROBIOLOGI**

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2020

Vaksinasi Molekul Adhesin 37,8 kDa Subunit Pili *Vibrio cholerae*
dengan Adjuvan CTB terhadap Kadar IL-17A, Kadar *secretory-IgA*,
dan Jumlah Koloni Bakteri pada Mencit
Model Diare *Shigella flexneri*

Oleh:

Genitri Indraswari. Dr

Dipertahankan di depan penguji
Pada Tanggal 28 Januari 2020
dan dinyatakan memenuhi syarat
Komisi Pembimbing,

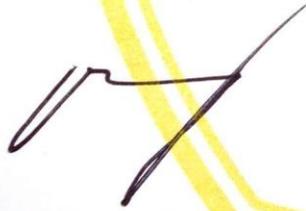


Dr.dr. Sri Poeranto, M.Kes, SpPark
Ketua



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

Penguji,



Dr.dr.Sri Andarini, M.Kes.
Penguji 1



Dr.dr.Umi Kalsum, MKes
Penguji 2



Malang,
Universitas Brawijaya
Dekan,



Dr. dr. Wisnu Baranto, Msi Med, SpA(K)
NIP. 19730726 200501 1008

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak dapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia TESIS ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU NO.20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 28 Januari 2020

Mahasiswa,



Nama : Genitri Indraswari
NIM : 166070122011001
PS : Ilmu Biomedik
Prog. : Pascasarjana
Fak : Kedokteran UB

IDENTITAS KOMITE PENGUJI TESIS

JUDUL TESIS

VAKSINASI MOLEKUL ADHESIN 37,8 kDa SUBUNIT PILI *Vibrio cholerae* DENGAN ADJUVAN CTB TERHADAP KADAR IL-17A, KADAR SECRETORY-*IgA*, DAN JUMLAH KOLONI BAKTERI PADA MENCIT MODEL DIARE *Shigella flexneri*

Nama Mahasiswa : dr. Genitri Indraswari
 NIM : 166070122011001
 Program Studi : Ilmu Biomedik

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Dr. dr. Sri Poeranto, M.Kes, Sp.ParK
 Anggota : Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM., Sp.MK (K)

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji 1 : Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes
 Dosen Penguji 2 : Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes

TIM MONITORING EVALUASI

Dr. dr. Endang Sri Wahyuni, MS

Tanggal Ujian : 28 Januari 2020

SK Penguji :

RINGKASAN

Genitri Indraswari, NIM 166070122011001. Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, 28 Januari 2020. Vaksinasi Molekul Adhesin 37,8 kDa Subunit Pili *Vibrio cholerae* dengan Adjuvan CTB terhadap Kadar IL-17A, Kadar *secretory-IgA*, dan Jumlah Koloni Bakteri pada Mencit Model Diare *Shigella flexneri*, Pembimbing: (1) Sri Poeranto, (2) Sumarno.

Diare merupakan penyebab kematian nomor dua di dunia pada anak usia di bawah lima tahun dengan angka kematian mencapai 525.000 jiwa setiap tahunnya. Prevalensi diare di Indonesia berdasarkan data Riskesdas tahun 2018 mencapai 8% dari seluruh kasus penyakit menular, dengan prevalensi pada balita mencapai 18,5%. Berdasarkan penelitian surveilans di Jakarta Selatan, Indonesia, dilaporkan terdapat 63,2% kasus *Shigellosis* pada anak usia 0-12 tahun yang disebabkan oleh *Shigella flexneri*. Sedangkan untuk kolera, terdapat sekitar 300 kasus pada tahun 2011 yang terjadi di Provinsi Banten dan Provinsi Jawa Timur, Indonesia, yang disebabkan oleh spesies *Vibrio cholerae* O1.

Eradikasi penyakit infeksi yang paling efektif adalah dengan melakukan vaksinasi dengan efektor imun utama yang dicetuskan berupa pembentukan antibodi. Komponen imun yang berperan penting dalam imunitas mukosa adalah sel Th17, karena subset sel T ini mensekresikan sitokin IL-17A yang dapat menarik sel-sel fagosit untuk menyerang mikroorganisme patogen pada mukosa. Sel Th17 memberikan kontribusi dalam mempertahankan homeostasis imunitas sel inang melawan mikroba secara khusus melalui induksi IL-17A terhadap ekspresi *polymeric immunoglobulin receptor* (pIgR) di epitel usus, sehingga terjadi peningkatan sekresi *secretory-IgA* ke dalam lumen usus.

Metode penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratorik dengan desain *Randomized Post Test Only with controlled group* secara *in vivo* dan *ex vivo*. Hewan coba yang digunakan adalah mencit balb/c jantan yang terbagi menjadi dua kelompok pada parameter IL-17A dan *secretory-IgA*, serta lima kelompok pada parameter jumlah koloni bakteri. Pada parameter IL-17A dan *secretory-IgA*, hewan coba dibagi menjadi dua kelompok penelitian, yakni kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (divaksinasi), mencit tersebut kemudian dibagi menjadi lima kelompok yang akan memasuki prosedur MLIL dan diambil sekret ususnya setelah diinfeksi *Shigella* maupun *Vibrio*, untuk dikultur pada media agar.

Hasil pemeriksaan kadar IL-17A pada darah mencit balb/c pasca vaksinasi molekul adhesin menunjukkan adanya peningkatan secara signifikan ($p=0,006$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Selain itu, hasil pengukuran kadar s-IgA pada sekret mukosa usus mencit pasca vaksinasi memiliki signifikansi $p=0,035$, yang menunjukkan terdapat beda yang signifikan antara hasil pengukuran kadar s-IgA pada mencit balb/c kontrol dan mencit balb/c yang diberi perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa vaksin molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dapat menjadi kandidat vaksin diare yang diberikan secara oral karena mampu menginduksi produksi IL-17A sebagai sitokin pro-inflamasi yang bersifat protektif dalam respon imun mukosa saluran pencernaan serta dapat meningkatkan produksi s-IgA dalam lumen usus. Selain itu, vaksinasi dengan molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* secara umum berpengaruh dalam menurunkan jumlah koloni bakteri pada sekret mukosa usus mencit balb/c yang telah diinfeksi *Shigella* maupun *Vibrio*. Meskipun, pada kelompok yang diinfeksi *Shigella flexneri* menunjukkan penurunan jumlah koloni yang tidak signifikan secara statistik.

Dapat disimpulkan bahwa vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dengan adjuvan CTB pada mencit balb/c dapat meningkatkan produksi IL-17A dan *secretory-IgA* sebagai komponen dari sistem imun di mukosa, serta berpengaruh dalam menurunkan jumlah koloni bakteri pada sekret mukosa usus mencit yang telah diinfeksi oleh *Shigella flexneri* maupun *Vibrio cholerae*.

SUMMARY

Genitri Indraswari, NIM. 166070122011001. Master Program in Biomedical Sciences Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya Malang, January 28th 2020. Vaccination of Adhesion Molecule 37.8 kDa *Vibrio cholerae* Pili Subunit with CTB Adjuvant to IL-17A Levels, Secretary-IgA Levels, and Number of Bacterial Colonies in *Shigella flexneri* Diarrhea Model Mice. Supervisor: (1) Sri Poeranto (2) Sumarno.

Diarrhea is the number two cause of death in the world in children under five years of age with a mortality rate of 525,000 people each year. The prevalence of diarrhea in Indonesia based on 2018 Riskesdas data reaches 8% of all infectious disease cases, with a prevalence in infants reaching 18.5%. Based on surveillance research in South Jakarta, Indonesia, there were reported to be 63.2% of cases of shigellosis in children aged 0-12 years caused by *Shigella flexneri*. As for cholera, there were around 300 cases in 2011 that occurred in Banten Province and East Java Province, Indonesia, which were caused by *Vibrio cholerae* O1 species.

The most effective eradication of infectious diseases is vaccination. The main immune effector-triggered as a form of vaccine response is the formation of antibodies. The immune component that plays an important role in mucosal immunity is Th17 cells because this subset of T cells secretes cytokines IL-17A which can attract phagocytic cells to attack pathogenic microorganisms in the mucosa. Th17 cells contribute to maintaining host cell immune homeostasis specifically against microbes through the induction of IL-17A to the expression of polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) in the intestinal epithelium, resulting in an increase in secretory-IgA secretion into the intestinal lumen.

This research method uses a laboratory experimental design with a Randomized Post Test Only with controlled group design *in vivo* and *ex vivo*. The experimental animals used were male balb/c mice which were grouped in parallel into two groups on the IL-17A and secretory-IgA parameters, and five groups on the parameters of the number of bacterial colonies. In the IL-17A and secretory-IgA parameters, the experimental animals were divided into two research groups, namely the control group and the vaccinated group, the mice were then divided into five groups that would enter the MLIL procedure and were taken intestinal secretions after being infected by *Shigella* and *Vibrio*, to be cultured on agar media.

The results of the examination of IL-17A levels in the blood of balb/c mice after vaccination of adhesion molecules showed a significant increase ($p = 0.006$) compared to the control group. Also besides, the results of measurement of s-IgA levels in the intestinal mucosal secretions of post-vaccination mice had a significance of $p = 0.035$, which showed that there were significant differences between the results of measurement of s-IgA levels in the control balb/c mice and treated balb/c mice. This shows that the 37.8 kDa adhesion molecule vaccine of the pili subunit *Vibrio cholerae* can be an oral diarrhea vaccine candidate because it can induce IL-17A production as a pro-inflammatory cytokine that is protective in the immune response of the digestive tract mucosa and can increase the production of s-IgA in the intestinal lumen. Also besides, vaccination with adhesion molecule 37.8 kDa pili subunit *Vibrio cholerae* affects reducing the number of bacterial colonies on intestinal mucosal secretions of balb/c mice that have been infected with *Shigella* or *Vibrio*. Although, statistically in the group infected with *Shigella flexneri* showed less significant results when compared to the positive control group *Shigella*.

It can be concluded that the adhesion molecule vaccination of 37.8 kDa pili subunit *Vibrio cholerae* with CTB adjuvant on balb/c mice can increase the production of IL-17A and secretory-IgA as components of the immune system in the mucosa, and generally can reduce the number of bacterial colonies in intestinal mucosal secretions of mice that have been infected by *Shigella flexneri* or *Vibrio cholerae*.



DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	iii
IDENTITAS KOMITE PENGUJI TESIS	iv
KATA PENGANTAR	v
RINGKASAN	viii
SUMMARY	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.3.1 Tujuan Umum	7
1.3.2 Tujuan Khusus	7
1.4 Manfaat Penelitian	8
1.4.1 Manfaat Akademik	8
1.4.2 Manfaat Praktis	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 <i>Vibrio cholerae</i>	9
2.1.1 Morfologi dan Identifikasi	9
2.1.2 Struktur Antigenik dan Klasifikasi Biologis	10
2.1.3 Patogenesis diare akibat <i>Vibrio cholerae</i>	12
2.1.4 Imunitas terhadap <i>Vibrio cholerae</i>	15
2.1.5 Molekul Adhesin <i>Vibrio cholerae</i>	16
2.2 <i>Shigella flexneri</i>	18
2.2.1 Morfologi dan Identifikasi	18
2.2.2 Struktur Antigenik dan Klasifikasi Biologis	20
2.2.3 Patogenesis diare akibat <i>Shigella flexneri</i>	22



2.3 Vaksinasi	24
2.3.1 Definisi Vaksinasi secara Umum	24
2.3.2 Jenis Rute Vaksinasi	27
2.3.3 Molekul Adhesin sebagai Target Vaksin	29
2.3.4 Respon Imun Mukosa terhadap Vaksinasi	30
2.4 Sel Th17	33
2.5 Interleukin-17A (IL-17A)	36
2.6 <i>Secretory-IgA</i> (s-IgA)	38
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	45
3.1 Kerangka Teori	45
3.2 Deskripsi Kerangka Teori	46
3.3 Kerangka Konsep	48
3.4 Deskripsi Kerangka Konsep	49
3.5 Hipotesis Penelitian	50
BAB IV METODE PENELITIAN	51
4.1 Rancangan Penelitian	51
4.2 Populasi dan Sampel	52
4.3 Kriteria Sampel	53
4.3.1 Kriteria Inklusi	53
4.3.2 Kriteria Eksklusi	53
4.4 Variabel Penelitian	54
4.4.1 Variabel Bebas	54
4.4.2 Variabel Terikat	54
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian	54
4.6 Alat dan Bahan Penelitian	54
4.6.1 Persiapan Hewan Coba	54
4.6.2 Pembuatan Vaksin Molekul Adhesin	55
4.6.2.1 Kultur Bakteri <i>Vibrio cholerae</i>	55
4.6.2.2 Isolasi Protein Pili <i>Vibrio cholerae</i>	56
4.6.2.3 Prosedur SDS-PAGE	56
4.6.2.4 Prosedur Elektroelusi dan Dialisis	57
4.6.2.5 Prosedur Penambahan Adjuvan	58
4.6.3 Pemeliharaan Hewan Coba	59
4.6.4 Pembedahan Mencit	59
4.6.5 Pengukuran Kadar IL-17A	60
4.6.6 Pengukuran Kadar <i>secretory-IgA</i>	61
4.6.7 Penghitungan Jumlah Koloni Bakteri	63
4.7 Definisi Operasional	63
4.8 Prosedur Penelitian	66
4.8.1 Pernyataan Etik	66
4.8.2 Persiapan Hewan Coba	66
4.8.3 Pembagian Kelompok Perlakuan	67
4.8.4 Pembuatan Vaksin Molekul Adhesin	67
4.8.4.1 Kultur Bakteri <i>Vibrio cholerae</i>	67
4.8.4.2 Isolasi Protein Pili <i>Vibrio cholerae</i>	68
4.8.4.3 Prosedur SDS-PAGE	69
4.8.4.4 Prosedur Elektroelusi dan Dialisis	70
4.8.4.5 Prosedur Penggabungan Subunit Pili + CTB	71
4.8.5 Vaksinasi Molekul Adhesin	72

4.8.6 Pembedahan Mencit dengan Metode MLIL	72
4.8.7 Pengukuran Kadar IL-17A	73
4.8.8 Pengukuran Kadar <i>secretory-IgA</i>	74
4.8.9 Penghitungan Jumlah Koloni Bakteri	76
4.9 Analisis Data	76
4.10 Alur Penelitian	78
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	81
5.1 Hasil Penelitian	81
5.1.1 Hasil <i>Profiling</i> Pili <i>Vibrio cholerae</i> dengan SDS-PAGE	81
5.1.2 Hasil Pengukuran Kadar IL-17A	82
5.1.3 Hasil Pengukuran Kadar <i>secretory-IgA</i>	84
5.1.4 Hasil Penghitungan Jumlah Koloni	86
5.2 Analisis Data	90
5.2.1 Analisis Data Kadar IL-17A	90
5.2.2 Analisis Data Kadar <i>secretory-IgA</i>	92
5.2.3 Analisis Data Penghitungan Jumlah Koloni	94
BAB VI PEMBAHASAN	96
6.1 Pengaruh Vaksinasi terhadap Kadar IL-17A	96
6.2 Pengaruh Vaksinasi terhadap Kadar <i>secretory-IgA</i>	97
6.3 Pengaruh Vaksinasi terhadap Jumlah Koloni Bakteri	98
6.4 Keterbatasan Penelitian	101
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	102
7.1 Kesimpulan	102
7.1.1 Kesimpulan Umum	102
7.1.2 Kesimpulan Khusus	102
7.2 Saran	103
DAFTAR PUSTAKA	105
LAMPIRAN	113

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Ringkasan Jenis Vaksinasi	25
Tabel 4.1 Alokasi Sampel untuk Setiap Kelompok	53
Tabel 5.1 Rerata Kadar IL-17A pada Kedua Kelompok	82
Tabel 5.2 Rerata Kadar <i>secretory-IgA</i> pada Kedua Kelompok	85
Tabel 5.3 Rerata Hitung Jumlah Koloni	89
Tabel 5.4 Ringkasan Hasil Uji <i>Mann Whitney</i>	95

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



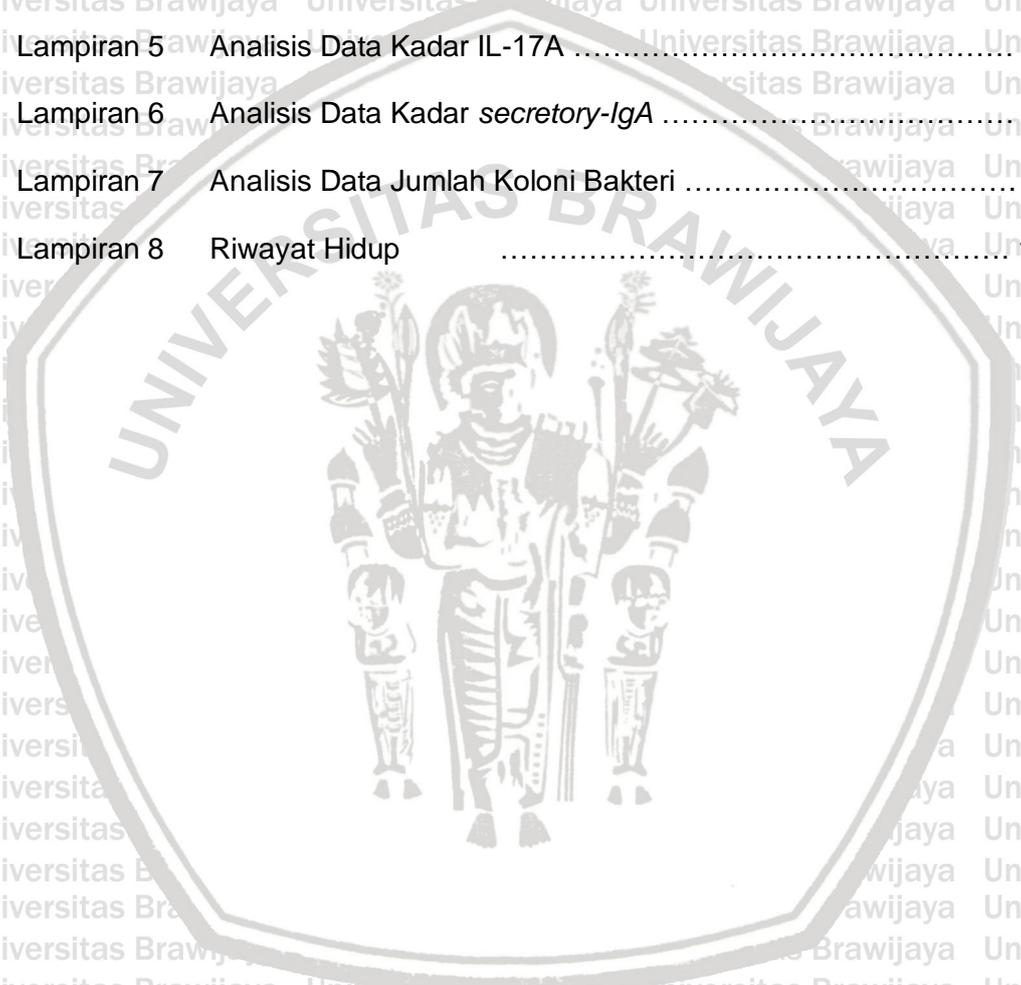
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Koloni <i>Vibrio cholerae</i> pada medium TCBS	10
Gambar 2.2 Mekanisme kerja enterotoksin kolera	14
Gambar 2.3 Visualisasi morfologi <i>Shigella flexneri</i>	19
Gambar 2.4 Genetika dan arsitektur sistem sekresi tipe III (T3SS) <i>Shigella</i>	21
Gambar 2.5 Diagram patogenesis infeksi <i>Shigella</i>	23
Gambar 2.6 Perbedaan jenis rute vaksinasi	28
Gambar 2.7 Skema inhibisi adhesi bakteri terhadap sel inang	29
Gambar 2.8 Peran imunitas mukosa secara umum	31
Gambar 2.9 Jalur <i>uptake</i> vaksin dalam usus	32
Gambar 2.10 Peran sekuensial dari sitokin dalam diferensiasi sel Th17	35
Gambar 2.11 Struktur famili reseptor IL-17	37
Gambar 2.12 Koordinasi regulasi produksi dan sekresi IgA dalam usus oleh sel Th17 dan Treg	39
Gambar 2.13 Produksi IgA melalui jalur sel T-dependen	41
Gambar 2.14 Produksi IgA melalui jalur sel T-independen	42
Gambar 3.1. Kerangka Teori	45
Gambar 3.2 Kerangka Konsep	48
Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian	80
Gambar 5.1 Hasil SDS-PAGE protein subunit pili <i>Vibrio cholerae</i>	81
Gambar 5.2 Grafik kadar serum IL-17A	83
Gambar 5.3 Grafik kadar <i>secretory-IgA</i>	86
Gambar 5.4 Hasil kultur dari sekret mukosa usus mencit	88
Gambar 5.5 Grafik hasil hitung jumlah koloni	89



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Keterangan Kelaikan Etik	113
Lampiran 2	Dokumentasi Penelitian	114
Lampiran 3	Pernyataan <i>Submitted Journal</i>	116
Lampiran 4	Surat Keterangan Bebas Plagiasi	117
Lampiran 5	Analisis Data Kadar IL-17A	118
Lampiran 6	Analisis Data Kadar <i>secretory-IgA</i>	119
Lampiran 7	Analisis Data Jumlah Koloni Bakteri	120
Lampiran 8	Riwayat Hidup	124



DAFTAR SINGKATAN

ADP	<i>Adenosine phosphate</i>
APC	<i>Antigen-Presenting Cell</i>
BCG	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CT	<i>Cholera Toxin</i>
CTA	<i>Cholera Toxin Subunit-A</i>
CTB	<i>Cholera Toxin Subunit-B</i>
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
DTPa	<i>Diphtheria, Tetanus, Pertussis acellular</i>
ETEC	<i>Enterotoxin Escherichia coli</i>
FHA	<i>filamen hemagglutinin</i>
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
GM ₁	<i>monosialosyl ganglioside</i>
Gs	<i>G stimulatif</i>
IFN-γ	<i>Interferon-γ</i>
IL-17	<i>Interleukin-17</i>
Ipa-B	<i>Invasion plasmid antigen-B</i>
kDa	<i>kilo Dalton</i>
LAV	<i>Live-attenuated vaccine</i>
MLIL	<i>Mice Ligated Ileal Loop</i>
NaCl	<i>Natrium klorida</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein</i>
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i>
OSP	<i>O-specific polysaccharide</i>
pIgR	<i>Polymeric Immunoglobulin Receptor</i>
PMN	<i>Polymorphonuclear</i>
PRN	<i>Pertactin</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
Riskedas	<i>Riset Kesehatan Dasar</i>



STAT3

Signal transducer and activator of transcription 3

SDS-PAGE

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel

TGF- β

Transforming Growth Factor- β

TCBS

Thiosulfate Citrate Bile-Salt Sucrose

TLR

Toll-like receptor

WHO

World Health Organization



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Diare merupakan penyebab kematian nomor dua di dunia pada anak usia di bawah lima tahun dengan angka kematian mencapai 525.000 jiwa setiap tahunnya. Terdapat tiga jenis diare secara klinis, yaitu *acute watery diarrhea*, misalnya kolera; *acute bloody diarrhea* atau disebut juga disentri; dan diare persisten, yang berlangsung selama lebih dari 14 hari (WHO, 2017).

Berdasarkan data CDC tahun 2019, *Shigella* menyebabkan sekitar 80-165 juta kasus diare di dunia dan kematian mencapai 600.000 jiwa setiap tahunnya.

Selain itu, terdapat sekitar 1,4 hingga empat juta kasus kolera dengan angka kematian berkisar antara 21.000 hingga 143.000 jiwa (WHO, 2019).

Hingga saat ini, penyakit diare masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di negara berkembang, termasuk Indonesia, karena pencegahan dan pengendalian infeksi yang sulit. Prevalensi diare di Indonesia berdasarkan data Riskesdas tahun 2018 mencapai 8% dari seluruh kasus penyakit menular, dengan prevalensi pada balita mencapai 18,5%. Berdasarkan penelitian surveilans di Jakarta Selatan, Indonesia, dilaporkan terdapat 63,2% kasus *Shigellosis* pada anak usia 0-12 tahun yang disebabkan oleh *Shigella flexneri* (Herwana, *et al.*, 2010). Sedangkan untuk kolera, terdapat sekitar 300 kasus pada tahun 2011 yang terjadi di Provinsi Banten dan Provinsi Jawa Timur, Indonesia, yang disebabkan oleh spesies *Vibrio cholerae* O1 (Kadim, 2011).

Shigella adalah bakteri penyebab disentri basiler atau *Shigellosis*, yang mana termasuk dalam diare tipe inflamasi. *Shigella* merupakan bakteri Gram negatif dan bersifat anaerob fakultatif, yaitu menggunakan oksigen untuk

memperoleh energi melalui respirasi, tetapi mereka juga dapat menggunakan jalur fermentasi untuk sintesis ATP bila tidak tersedia oksigen yang cukup untuk metabolisme (Murray, *et al.*, 2013). Secara taksonomi, terdapat empat spesies *Shigella* yang diketahui dapat menyebabkan disentri, yaitu *Shigella dysenteriae* (serogrup A), *Shigella flexneri* (serogrup B), *Shigella boydii* (serogrup C), dan *Shigella sonnei* (serogrup D). Bakteri ini menyebabkan diare dengan cara menginvasi sel epitel usus halus bagian distal maupun usus besar sehingga mengaktifkan proses inflamasi. Selain itu, terdapat spesies *Shigella* yang memproduksi *Shiga toxin* yang dapat memperburuk manifestasi klinis disentri.

Patogenesis *Shigella* dalam menyebabkan kondisi patologis tersebut diawali oleh proses adhesi, sehingga molekul adhesin dari *Shigella* berperan penting dalam patogenesis disentri (Brooks, *et al.*, 2013; Octavia & Lan, 2015; Kasper, *et al.*, 2016).

Kolera termasuk dalam diare tipe non-inflamasi yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae*. *Vibrio cholerae* merupakan bakteri batang Gram negatif yang berbentuk koma, bersifat anaerob fakultatif, dan terbagi ke dalam beberapa subdivisi berdasarkan antigen O somatiknya. Infeksi bakteri ini dimulai ketika bakteri masuk ke tubuh secara oral, kemudian setelah melewati sawar asam lambung, organisme tersebut akan membentuk koloni di usus halus melalui perantara berbagai macam faktor, salah satunya dengan memproduksi *cholera toxin* (CT) (Maheshwari, *et al.*, 2011; Rothenbacher, *et al.*, 2014; Kasper *et al.*, 2016).

Cholera toxin (CT) terdiri atas lima sisi pengikatan subunit B (CTB) dan satu sisi aktif subunit A (CTA). Subunit B dari *cholera toxin* (CTB) akan berikatan pada reseptornya yang spesifik, yaitu reseptor *monosialosyl ganglioside* (*GM1 ganglioside*) yang terdapat pada permukaan sel mukosa usus, kemudian CTA

akan dilepaskan ke dalam sel. Selanjutnya, ribosilat ADP subunit katalitik-A mengaktifkan protein pengikat nukleotida guanin heterotrimerik Gs, yang kemudian merangsang produksi cAMP oleh enzim adenilat siklase. Dalam sel epitel usus, cAMP akan menginduksi sekresi ion klorida, yang menyebabkan hilangnya cairan secara masif (Datta, *et al.*, 2010; Tokuhara *et al.*, 2010; Perez-lopez, *et al.*, 2016). Patogenesis penyakit kolera tersebut juga diawali oleh proses adhesi, sehingga molekul adhesin dari *Vibrio cholerae* juga berperan penting dalam patogenesis diare ini (Maheshwari, *et al.*, 2011).

Eradikasi penyakit infeksi yang paling efektif adalah dengan melakukan vaksinasi. Vaksinasi merupakan prosedur untuk meningkatkan derajat imunitas protektif terhadap patogen atau toksin tertentu dengan preparat non-virulen/non-toksik melalui induksi respon imun dengan stimulasi antibodi, imunitas seluler, maupun keduanya (Kliegman *et al.*, 2007; Baratawidjaja, *et al.*, 2010). Salah satu tanda keberhasilan vaksinasi adalah meningkatnya efektor sistem imun sebagai respon vaksinasi. Efektor imun utama yang dicetuskan sebagai bentuk respon terhadap vaksin adalah pembentukan antibodi. Komponen imun yang berperan penting dalam imunitas mukosa adalah sel Th17, karena subset sel T ini mensekresikan sitokin pro-inflamasi IL-17A yang dapat menarik sel-sel fagosit untuk menyerang mikroorganisme patogen pada mukosa. Sel Th17 memberikan kontribusi dalam mempertahankan homeostasis imunitas sel inang melawan mikroba secara khusus melalui induksi IL-17A terhadap ekspresi *polymeric immunoglobulin receptor* (pIgR) di epitel usus, sehingga terjadi peningkatan sekresi *secretory-IgA* ke dalam lumen usus (Cao, *et al.*, 2012; Wang & Yang, 2016; Lopez, 2017 (*Accepted manuscript*)).

Secretory-IgA (s-IgA) bersifat protektif untuk melawan patogen enterik dengan mengikat molekul permukaan yang diekspresikan oleh patogen dan dengan menetralkan toksinnya. Antibodi sekretori ini penting untuk mengurangi

kolonisasi pada mukosa oleh patogen non-invasif seperti *Vibrio cholerae*. Selain itu, s-IgA juga memiliki efek anti-inflamasi. Sebuah penelitian membuktikan fenomena ini menggunakan model *rabbit ileal loop* untuk infeksi *Shigella flexneri*. Pada penelitian tersebut, dilaporkan bahwa bakteri dapat dinetralkan oleh s-IgA melalui proses opsonisasi sehingga dapat menurunkan proses inflamasi dan mencegah kerusakan *barrier* usus (Longet, S., 2013; Perez-lopez, *et al.*, 2016).

Vaksin *Shigellosis* yang pernah diteliti, terbagi ke dalam dua kelompok besar, yaitu *live-attenuated vaccine* (LAV) dan *non-living vaccine*. Contoh sediaan dari LAV adalah CVD1208S (*Shigella flexneri* 2a), WRSS2 dan WRSS3 (*Shigella sonnei*), SC599 (*Shigella dysenteriae* 1), SC602 (*Shigella flexneri* 2a). Selain itu, juga terdapat produk vaksin *whole cell* yang diinaktifkan, yaitu SsWC (*Shigella sonnei*) dan Sfa2WC (*Shigella flexneri* 2a) yang diberikan secara oral (Walker, 2005; McKenzie R, 2006; Camacho, *et al.*, 2013). Jenis vaksin yang sama juga dikembangkan oleh Antex (USA) yang diberi nama ActivaxTM, yaitu suatu *combo vaccine* yang mengandung antigen dari *Campylobacter*, *Shigella*, dan *ETEC* (Keith, 2001).

Vaksin-vaksin yang telah diteliti tersebut merupakan vaksin berbahan dasar *whole cell*, yang sebagian besar dapat menimbulkan efek samping pada penggunaannya. Beberapa efek samping yang dapat ditimbulkan, di antaranya adalah demam, reaksi hipersensitivitas, penyakit progresif pada individu imunokompromais atau pada individu yang mendapat pengobatan steroid. Hal tersebut dapat terjadi karena individu tersebut tidak dapat mengontrol patogen tersebut meskipun dilemahkan, sehingga patogen tersebut dapat berubah menjadi agen yang infeksius dan menimbulkan manifestasi klinis dalam tubuh hospes (Baratawidjaja, *et al.*, 2010; Camacho, *et al.*, 2013).

Keberhasilan penggunaan vaksin difteri, tetanus, dan aselular pertusis (DTPa) pertama kali diperkenalkan pada bulan Maret 1994. Komponen pertusis

dari vaksin DTPa ini, dikembangkan oleh *Glaxo SmithKline*. Vaksin tersebut terdiri dari komponen toksoid pertusis, filamen hemaglutinin, dan pertaktin.

Vaksin ini dapat ditoleransi dengan baik, dengan insiden efek samping yang lebih rendah dibandingkan dengan pemberian vaksin berbahan dasar *whole cell*

(Capiou, *et al.*, 2003; Kitcin, *et al.*, 2011). Hal tersebut mendasari inovasi pengembangan kandidat vaksin untuk diare yang tidak berbahan dasar *whole cell*, sehingga memiliki efek samping yang lebih minimal dan efektif untuk mencegah penyakit.

Pada penelitian sebelumnya, telah ditemukan protein hemaglutinin subunit pili *Shigella dysenteriae* dengan berat molekul 49,8 kDa (Sumarno *et al.* 2015). Protein tersebut terbukti bersifat protektif untuk mencegah diare *Shigella* pada mencit. Selain protein tersebut, juga ditemukan molekul adhesin dengan berat molekul 7,9 kDa pada pili *Shigella flexneri*, yang kemudian terbukti memiliki reaksi silang dengan subunit pili berat molekul 49,8 kDa *Shigella dysenteriae* (Sumarno *et al.*, 2016). Dengan diketahuinya reaksi silang tersebut, maka dapat menambah pilihan kandidat vaksin untuk pencegahan disentri di masa depan, yang mana masih belum diketahui masing-masing keunggulannya.

Pengembangan vaksin kolera memiliki syarat ideal yang diharapkan, antara lain mengandung molekul subunit B *Cholera Toxin* dan molekul adhesin, dapat diberikan per oral, tidak menimbulkan diare, dan dapat memberikan imunitas jangka panjang (Finkelstein, *et al.*, 1983). Vaksin kolera per oral yang berkembang saat ini, seperti CVD103-HgR (*Vibrio cholerae classic Inaba*), Dukoral (*whole cell Vibrio cholerae O1* dan CTB), dan Sanchol (OSP *Vibrio cholerae O1*), merupakan vaksin yang telah diujicobakan secara klinis pada orang dewasa, namun terbukti hanya memberikan perlindungan jangka pendek dan belum terbukti memberikan imunitas protektif bila diterapkan di daerah endemis kolera (Walker, *et al.*, 2005; Czerkinsky & Holmgren; 2010; Akter, *et al.*,

2019). Oleh karena itu, salah satu inovasi kandidat vaksin yang dapat memenuhi kriteria ideal tersebut adalah protein hemagglutinin subunit pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang telah terbukti bersifat protektif untuk mencegah diare pada mencit (Sumarno, 2000; Sumarno *et al.*, 2011).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Rabbi, *et al.*, (2008), dilaporkan bahwa terdapat imunogenisitas yang kuat dan reaksi silang antigenik pada komponen permukaan antara *Vibrio cholerae* O1, *Shigella flexneri* 2a, dan *Haemophilus influenza* b. Kemudian, berdasarkan hasil uji anti-hemagglutinasipositif antara subunit pili *Shigella flexneri* dengan berat molekul 49,8 kDa dan subunit pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang telah dilakukan oleh Anindhita (2018), lebih lanjut peneliti ingin mengetahui apakah molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* juga dapat menghambat proses adhesi *Shigella flexneri* pada mukosa usus mencit balb/c, sehingga ke depannya dapat dikembangkan menjadi kandidat vaksin homolog untuk mencegah *Shigellosis* dan kolera.

Pada penelitian ini, secara lebih spesifik peneliti ingin mengetahui respon imun terhadap vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* melalui pengukuran kadar sitokin IL-17A pada darah mencit dan kadar *secretory-IgA* pada sekret mukosa usus mencit setelah divaksinasi molekul adhesin. Kemudian, untuk mengetahui apakah molekul adhesin tersebut juga dapat menghambat proses adhesi *Shigella flexneri* pada mukosa usus mencit balb/c, peneliti melakukan uji protektivitas vaksin melalui penghitungan jumlah koloni bakteri pada kultur sekret mukosa usus mencit setelah diinfeksi dengan *Shigella flexneri* dan *Vibrio cholerae* menggunakan metode *Mice Ligated Ileal Loop* (MLIL).

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Apakah vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* berpengaruh terhadap kadar IL-17A pada darah mencit yang divaksinasi molekul adhesin?

1.2.2 Apakah vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* berpengaruh terhadap kadar *secretory-IgA* pada sekret mukosa usus mencit yang divaksinasi molekul adhesin?

1.2.3 Apakah vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* berpengaruh terhadap jumlah koloni bakteri pada kultur sekret mukosa usus mencit yang telah diinfeksi *Shigella flexneri*?

1.2.4 Apakah vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* berpengaruh terhadap jumlah koloni bakteri pada kultur sekret mukosa usus mencit yang telah diinfeksi *Vibrio cholerae*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* pada mencit balb/c terhadap kadar IL-17A, kadar *secretory-IgA*, dan jumlah koloni bakteri.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Mengetahui pengaruh vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* terhadap kadar IL-17A pada darah mencit balb/c.

b. Mengetahui pengaruh vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* terhadap kadar *secretory-IgA* pada sekret mukosa usus mencit balb/c.

c. Mengetahui pengaruh vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* terhadap jumlah koloni bakteri pada mencit yang telah diinfeksi *Shigella flexneri*.

d. Mengetahui pengaruh vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* terhadap jumlah koloni bakteri pada mencit yang telah diinfeksi *Vibrio cholerae*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Peneliti mendapatkan pengalaman dan pembelajaran dalam pengembangan suatu ide penelitian yang bermanfaat bagi pengembangan profesi.

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat dijadikan sebagai bahan pertimbangan untuk menciptakan alternatif baru sehingga dapat diperoleh kandidat vaksin yang homolog untuk *Shigellosis* dan kolera.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Vibrio cholerae*

2.1.1 Morfologi dan Identifikasi

Kingdom : *Bacteria*

Filum : *Proteobacteria*

Kelas : *Gammaproteobacteria*

Ordo : *Vibrionales*

Famili : *Vibrionaceae*

Genus : *Vibrio*

Spesies : *Vibrio cholerae*

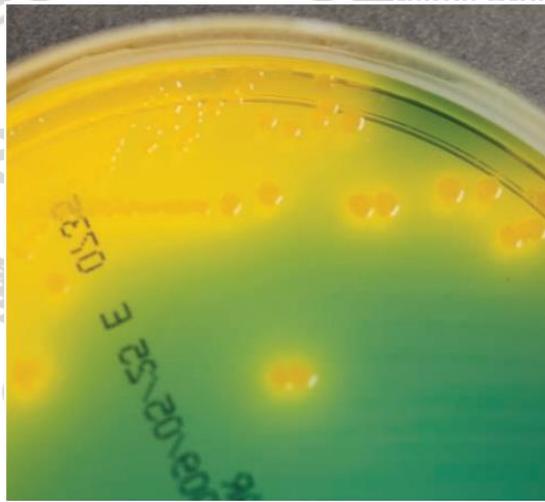
Sumber: (NCBI; WHO).

Vibrio cholerae adalah bakteri Gram negatif, berbentuk batang yang bengkok seperti koma dengan panjang 2-4 μm . Bakteri ini secara aktif bergerak dengan menggunakan *flagella* pada ujungnya. *Vibrio cholerae* tumbuh dengan baik pada medium agar *Thiosulfate Citrate Bile-Salt Sucrose* (TCBS), yang merupakan medium selektif untuk genus *Vibrio*. Pada medium ini, *Vibrio cholerae* membentuk koloni kuning (fermentasi sukrosa) yang terlihat jelas di atas latar belakang warna hijau gelap dari medium TCBS pada gambar 2.1 (Murray, *et al.*, 2013).

Vibrio secara khas tumbuh pada pH yang sangat tinggi (8,5-9,5) dan sangat cepat terbunuh dengan asam. *Vibrio* bersifat oksidase positif, yang membedakan bakteri ini dengan famili *Enterobacteriaceae* lainnya.

Adanya ciri oksidase positif ini adalah langkah kunci untuk identifikasi preliminary *Vibrio cholerae* dan spesies *Vibrio* lainnya. *Vibrio cholerae*

memfermentasi sukrosa dan manosa, namun tidak memfermentasi arabinosa. Spesies *Vibrio* rentan terhadap O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine phosphate) yang membedakannya dengan spesies *Aeromonas* yang resisten terhadap O/129. Sebagian besar dari spesies *Vibrio* bersifat halotoleran dan NaCl seringkali menstimulasi pertumbuhannya. Bahkan, beberapa spesies *Vibrio* bersifat halofilik sehingga membutuhkan NaCl untuk tumbuh (Murray, *et al.*, 2013).



Gambar 2.1 Koloni *Vibrio cholerae* pada medium *Thiosulfate Citrate Bile-Salt Sucrose* (TCBS).

2.1.2 Struktur Antigenik dan Klasifikasi Biologis

Kolera merupakan penyakit diare yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio cholerae*. Transmisi ke manusia dapat melalui perantara air maupun makanan. Reservoir alami dari organisme tersebut tidak diketahui, awalnya diduga pada manusia, namun beberapa fakta menyebutkan di air (Todar, K., 2012).

Variasi antigen berperan penting dalam epidemiologi dan virulensi kolera. Banyak spesies dari *Vibrio* yang memiliki satu antigen *flagellar* H yang sama. Antibodi terhadap antigen H nampaknya tidak terlibat dalam

proteksi inang yang rentan. *Vibrio cholerae* memiliki lipopolisakarida O yang memberikan spesifisitas secara serologis. Diperkirakan terdapat sekitar 206 grup berdasarkan antigen O. Strain *Vibrio cholerae* O1 dan O139 menimbulkan manifestasi klinis kolera klasik, sedangkan selain strain O1/O139 menyebabkan *cholerae-like disease*. Pada *cholerae-like disease*, memiliki manifestasi klinis yang lebih ringan dan durasi kolonisasi bakteri pada usus halus bagian proksimal lebih pendek, sehingga durasi diare juga menjadi lebih pendek dan hilangnya cairan tubuh lebih minimal bila dibandingkan dengan manifestasi klinis kolera klasik. Antibodi terhadap antigen O cenderung bersifat protektif terhadap hewan coba yang diinfeksi dengan *Vibrio cholerae* (Abdulkadir, 1991; Crump, *et al.*, 2003).

Antigen *Vibrio cholerae* serogrup O1 memiliki berbagai determinan yang membuat adanya klasifikasi yang lebih dalam lagi dalam bentuk tiga serotipe, yaitu Ogawa, Inaba, dan Hikojima. Dua biotipe *Vibrio cholerae* epidemik juga telah teridentifikasi yaitu biotipe klasik dan El Tor. Uji *Voges-Proskauer* merupakan uji yang digunakan untuk membedakan biotipe klasik dan El Tor dari *Vibrio cholerae* O1. Uji tersebut digunakan untuk menentukan apakah suatu organisme memproduksi *acetyl methyl carbinol (acetoin)* dari fermentasi glukosa. Dengan adanya kadar oksigen yang cukup dan Kalium hidroksida 40% dalam medium agar, *acetoin* akan diubah menjadi *dyacetyl*, dan *alpha-naphthol* berfungsi sebagai katalis untuk dapat memunculkan kompleks berwarna merah sebagai tanda hasil positif pada uji ini. Biotipe El Tor memproduksi hemolisin sehingga membuat hasil positif pada uji *Voges-Proskauer*. Biotipe ini juga resisten terhadap *Polymixin B*. *Vibrio cholerae* strain O139 sangat mirip dengan *Vibrio cholerae* O1 biotipe El Tor, namun strain O139 tidak bisa

memproduksi lipopolisakarida O1 dan tidak memiliki gen yang dibutuhkan untuk membentuk antigen ini. *Vibrio cholerae* strain O139 membentuk kapsul lipopolisakarida seperti strain non-O1 lainnya, sedangkan strain O1 tidak membentuk kapsul (CDC, 2019; Levinson, W., 2014).

2.1.3 Patogenesis diare akibat *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae hanya bersifat patogenik pada manusia. Karena bakteri ini tidak tahan asam, maka untuk menimbulkan manifestasi klinis pada individu dengan asam lambung yang normal dibutuhkan untuk “menelan” sekitar lebih dari 10^{10} bakteri dalam air sebagai *transportemya*.

Apabila *transportemya* berupa makanan, maka dibutuhkan jumlah yang lebih sedikit yaitu sekitar 10^2 - 10^4 bakteri untuk menimbulkan manifestasi klinis. Oleh karena itu, kondisi yang menyebabkan asam lambung seseorang menurun akan mencetuskan kondisi yang lebih rentan terhadap infeksi *Vibrio cholerae*.

Setelah tertelan, *Vibrio cholerae* akan melewati lambung dan melakukan kolonisasi yang utamanya terjadi di usus halus. Patogenesis kolera membutuhkan regulasi ekspresi dua faktor virulensi yang paling penting, yaitu *toxin-coregulated pilus* (TCP) dan *cholera toxin* (CT). *Toxin-coregulated pilus* merupakan *membrane-spanning type IV pilus* yang berperan dalam kolonisasi *Vibrio cholerae* adalah membantu pembentukan mikrokoloni bakteri, memperantarai adhesi ke sel epitel usus, dan mensekresi faktor kolonisasi TcpF. Sedangkan, *cholera toxin* merupakan jenis toksin yang dikode oleh gen *ctxAB* dari *Vibrio cholerae* yang berperan dalam menimbulkan manifestasi klinis kolera.

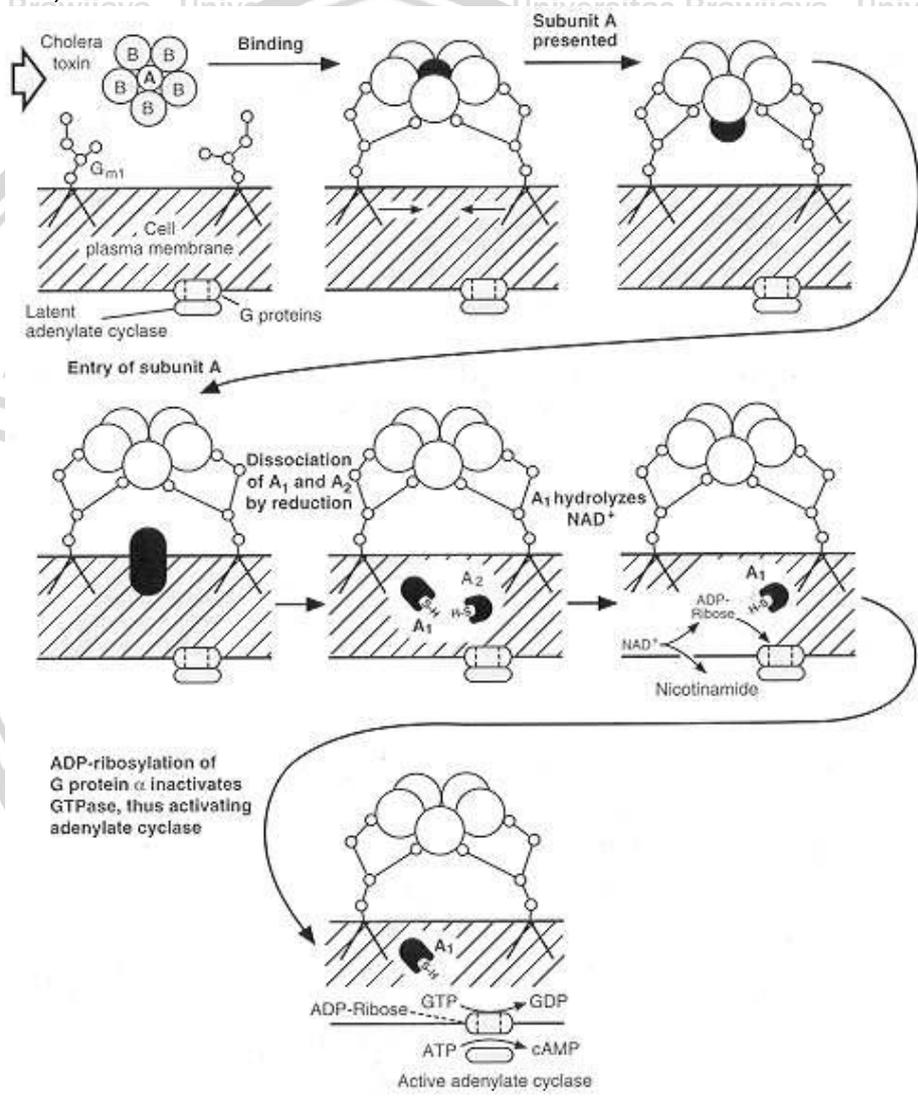
Ekspresi dari dua faktor virulensi tersebut diatur oleh faktor transkripsi yang melibatkan ToxR, TcpP, dan ToxT merupakan aktivator

transkripsi yang dikode oleh gen operon *toxT* yang secara bersamaan mengaktifkan operon *ctxA* dan *tcpA*. Ekspresi ToxT distimulasi oleh dua aktivator transkripsi, yaitu TcpP dan ToxR, yang aktivitasnya tergantung pada kondisi lingkungan, seperti pH, osmolaritas, nutrisi, dan densitas bakteri. Selain itu, motilitas *Vibrio cholerae* juga berperan krusial dalam pathogenesis kolera. Kemampuan tersebut membantu *Vibrio cholerae* untuk berkolonisasi dan terdistribusi di sepanjang usus halus. Kemampuan tersebut diperankan oleh fungsi motorik dari flagel, yang memperoleh energi dari gradien elektrokimiawi ion Na^+ dari pompa Na^+ -NADH: *quinone oxireductase* (Muanprasat & Chatsudthipong, 2013).

Setelah dapat melakukan kolonisasi pada mukosa usus halus, maka bakteri ini akan mensekresi *cholera toxin*. *Cholera toxin* mengandung 5 subunit B (*binding*) dengan berat molekul 11.500 dalton, dan satu subunit A1 (*active*) dengan berat molekul 23.500 dalton, serta *bridging piece* (A2) dengan berat molekul 5.500 dalton yang menghubungkan subunit A1 ke 5 subunit B. Ketika subunit A1 dilepaskan ke dalam sel, subunit A1 secara enzimatik akan memberikan ribosa ADP dari NAD ke suatu protein (disebut Gs atau Ns) yang mengatur sistem adenilat siklase di dalam membran plasma sel. Fragmen A1 akan mengkatalisis transfer ADP-ribosyl dari NAD kepada komponen dari sistem adenilat siklase. Kemudian, fragmen A1 akan mengkatalisis perlekatan ADP-Ribosa (ADPR) ke protein regulator membentuk struktur Gs-ADPR sehingga GTP tidak dapat dihidrolisis. Oleh karena itu, adenilat siklase tetap dalam keadaan aktif secara terus-menerus karena tidak terjadi hidrolisis GTP untuk inaktivasi enzim tersebut (Gambar 2.2).

Aktivasi dari adenilat siklase secara terus-menerus menyebabkan peningkatan cAMP intraseluler yang sangat banyak, sehingga

menginduksi sel-sel mukosa untuk memompa ion Cl^- dalam jumlah banyak ke dalam lumen usus. Akibatnya, H_2O , ion Na^+ , dan elektrolit lainnya akan ikut dipompa ke lumen usus akibat gradien osmotik dan elektrik yang disebabkan oleh hilangnya ion Cl^- . Dengan demikian, sel-sel yang rusak akibat toksin akan mengeluarkan air dan elektrolit dalam jumlah sangat banyak, yang menjadi ciri khas dari kolera (Todar, K., 2012).



Gambar 2.2 Mekanisme kerja enterotoksin kolera. Cholera toxin mendekati permukaan sel target. Subunit B berikatan ke oligosakarida dari gangliosida GM_1 . Perubahan konformasi dari holotoksin terjadi, sehingga terjadi pelepasan subunit A ke permukaan sel. Kemudian, subunit A masuk ke dalam sel. Ikatan disulfida dari subunit A dilemahkan oleh glutathione intraseluler, membebaskan A_1 dan A_2 . Kemudian, NAD dihidrolisis oleh A_1 , menghasilkan ADP-ribose dan nicotinamide . Salah satu protein G dari adenilat siklase mengalami ribosilasi oleh ADP , menghambat kerja GTP-ase dan membuat adenilat siklase selalu dalam keadaan aktif. (Sumber: Todar, K., 2012).

2.1.4 Imunitas terhadap *Vibrio cholerae*

Infeksi *Vibrio cholerae* menghasilkan berbagai macam respon yang bervariasi mulai dari infeksi ringan atau tanpa manifestasi klinis kecuali respon serologis hingga diare sekretori yang mengancam jiwa.

Alasan perbedaan manifestasi klinis ini tidak diketahui. Salah satu gagasan menyebutkan bahwa tiap individu memiliki perbedaan dalam ketersediaan reseptor pada usus untuk *Vibrio cholerae* atau untuk toksin kolera, tetapi hal ini belum terbukti. Paparan infeksi sebelumnya tentu merupakan faktor utama. Misalnya, di daerah endemik berat seperti Bangladesh, memiliki *attack rate* relatif lebih rendah pada orang dewasa dibandingkan dengan anak-anak.

Setelah terjadi infeksi *Vibrio cholerae*, antibodi yang bersirkulasi dalam darah dapat dideteksi terhadap beberapa antigen kolera termasuk toksin, antigen somatik (O), dan antigen *flagellar* (H). Antibodi juga dapat meningkat oleh injeksi antigen parenteral sebagai komponen vaksin. Antibodi terhadap antigen O *Vibrio* disebut antibodi "*vibriocidal*" karena mereka akan melisis sel *Vibrio cholerae* yang telah diopsonisasi oleh komplemen dan komponen serum. Antibodi *vibriocidal* mencapai puncak pada 8-10 hari setelah onset dari gejala klinis, dan kemudian menurun, kembali ke *baseline* pada 2-7 bulan kemudian. Adanya antibodi tersebut berhubungan dengan resistensi terhadap infeksi, tetapi tidak berperan sebagai mediator proteksi terhadap infeksi, dan perannya sebagai antibodi yang bersirkulasi pada infeksi *Vibrio* masih belum jelas.

Pengamatan bahwa infeksi alami memberikan imunitas yang efektif dan jangka panjang terhadap kolera telah membangkitkan upaya untuk mengembangkan vaksin dalam rangka memperoleh imunitas protektif. Upaya pertama kali pada pengembangan vaksin kolera di tahun

1960-an diarahkan pada preparat *whole-cell* yang disuntikkan secara parenteral. Namun, preparat vaksin tersebut ternyata hanya mampu memberikan imunitas sebesar 90% dan menurun dengan cepat ke *baseline* dalam waktu satu tahun. Kemudian, juga terdapat preparat vaksin dengan bahan dasar LPS yang dimurnikan dari berbagai biotipe *Vibrio*, dan ternyata juga memberikan tingkat keberhasilan yang bervariasi. Selain itu, *cholera toxin* ternyata juga dapat dikonversi menjadi toksoid dengan adanya formalin dan glutaraldehid. Namun, toksoid merupakan antigen yang kurang baik sehingga menimbulkan tingkat imunitas yang sangat rendah.

Perkembangan vaksin kolera hingga saat ini yang tersedia adalah *Dukoral* (dikembangkan oleh *SBL Vaccines*) dan *Mutachol Berna (CVD 103-HgR)*. Beberapa vaksin tersebut memberikan imunitas yang lebih baik dan memberikan efek samping yang lebih minimal dibandingkan preparat vaksin sebelumnya yang sudah ada. Jenis vaksin tersebut direkomendasikan untuk *traveler* dan juga tersedia di Amerika Serikat. Namun, vaksin tersebut belum direkomendasikan untuk digunakan pada individu di negara endemis kolera. Salah satu vaksin tersebut juga memberikan proteksi terhadap enterotoksigenik *E.coli* (ETEC) yang mana memproduksi toksin yang identik terhadap toksin kolera, yang mana seringkali menjadi penyebab dari *traveller's diarrhea* (Todar, K., 2012).

2.1.5 Molekul Adhesin *Vibrio cholerae*

Secara umum, patogenesis infeksi diawali oleh proses perlekatan atau adhesi antara patogen dan sel inang yang diperantarai oleh suatu molekul adhesin. Selain sebagai mediator pembentukan ikatan dan komunikasi antar sel terkait patogenesis infeksi, molekul adhesin juga

berperan dalam proses pertumbuhan sel, imunitas (pengenalan patogen), dan penyembuhan luka.

Pada tahun 1987, Taylor *et al.* menemukan bahwa kolonisasi *Vibrio cholerae* pada epitel usus halus diperantarai oleh pili, hemagglutinin, dan faktor kolonisasi tambahan lainnya. Ketika bakteri tersebut sudah melakukan perlekatan pada epitel usus, maka membran terluar dari bakteri akan mensekresikan enterotoksin kolera ke dalam lingkungan ekstraseluler dan mengganggu transpor ion oleh sel epitel usus sehingga akan terjadi pembuangan air dan elektrolit secara masif dari dalam tubuh (Maheshwari *et al.*, 2011). Perlekatan tersebut diperankan oleh protein bakteri yang dikenal sebagai molekul adhesin yang akan menempel pada reseptor sel epitel usus halus.

Karakterisasi molekul adhesin bakteri terdapat pada dua tempat, yaitu pada pili dan *outer membrane protein* (OMP). Pada penelitian yang dilakukan oleh Sperandio, *et al.* (1995), dilaporkan bahwa terdapat protein dengan berat molekul 38 kDa pada OMP *Vibrio cholerae* yang berpotensi sebagai faktor perlekatan dari *Vibrio cholerae* terhadap sel mamalia.

Hingga saat ini studi mengenai identifikasi molekul adhesin *Vibrio cholerae* terus berkembang. Sumarno (2000) melaporkan bahwa protein dengan berat molekul 37,8 kDa pada OMP *Vibrio cholerae* O1 M094V galur Malang, Indonesia bersifat hemagglutinin dan dikarakterisasi sebagai molekul adhesin. Selain melaporkan molekul adhesin pada OMP, Sumarno (2000) juga menemukan beberapa protein yang bersifat sebagai molekul adhesin pada pili bakteri yang sama, yaitu protein dengan berat molekul 50,3 kDa; 37,8 kDa; 35,6 kDa; dan 21,3 kDa.

Berdasarkan analisis SDS-PAGE, tes hemaglutinasi, dan tes adhesi diketahui bahwa subunit pili dengan berat molekul 37,8 kDa memiliki kemampuan hemaglutinasi tertinggi dan terbukti dapat menginduksi *secretory-IgA* melalui uji protektivitas (Sumarno *et al.*, 2011).

Hemaglutinasi merupakan kemampuan suatu mikroorganismen dalam menyebabkan agregasi sel darah merah oleh molekul hemaglutinin yang merupakan glikoprotein pada permukaan eritrosit. Reseptor permukaan eritrosit dan mukosa sel inang memiliki tingkat homologi yang signifikan, sehingga kemampuan bakteri menempel pada eritrosit tersebut dapat dijadikan dasar penentuan protein subunit pili sebagai molekul adhesin.

Hasil tersebut memperkuat konsep peranan molekul adhesin sebagai inhibitor kolonisasi serta internalisasi toksin *Vibrio cholerae* terhadap sel inang.

Ditemukannya molekul adhesin pada *Vibrio cholerae* membuka peluang baru untuk diciptakannya kandidat vaksin masa depan yang akan mencegah perlekatan bakteri pada sel epitel usus halus sehingga bakteri tidak bisa mengeluarkan toksin dan sekret berbahaya lainnya (Sumarno, *et al.*, 2011; Setyorini, *et al.*, 2013).

2.2 *Shigella flexneri*

2.2.1 Morfologi dan Identifikasi

Kingdom : *Bacteria*

Filum : *Proteobacteria*

Kelas : *Gammaproteobacteria*

Ordo : *Enterobacteriales*

Famili : *Enterobacteriaceae*

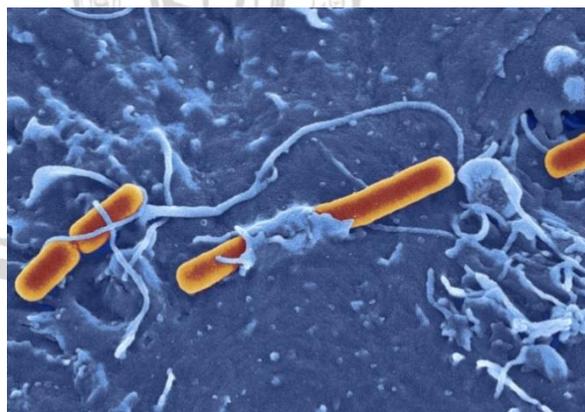
Genus : *Shigella*

Spesies : *Shigella flexneri*.

Sumber: (Lima, *et al.*, 2015)

Shigella merupakan bakteri Gram negatif yang pertama kali ditemukan pada tahun 1896 oleh ahli mikrobiologi Jepang bernama Kiyoshi Shiga yang mengisolasi bakteri basilus dari sampel feses penderita disentri, saat ini hasil penemuan tersebut lebih dikenal sebagai *Bacillus dysenteriae* atau *Shigella dysenteriae* tipe 1 (Bhunia, 2008).

Shigella memiliki karakteristik bentuk seperti batang, bersifat anaerob fakultatif, non-motil, dan tidak memfermentasi laktosa, melainkan jenis karbohidrat lainnya dengan hasil berupa asam (Gambar 2.2). Selain itu, *Shigella* tidak menghasilkan H₂S (Brooks, 2013). Berdasarkan reaksi biokimiawi dan antigen O spesifik, *Shigella* terbagi kedalam empat spesies, yakni *Shigella dysenteriae* (serogrup A), *Shigella flexneri* (serogrup B), *Shigella boydii* (serogrup C), dan *Shigella sonnei* (serogrup D) (Mao, *et al.*, 2013).



Gambar 2.3 Visualisasi morfologi *Shigella flexneri*. *Shigella flexneri* adalah bakteri penyebab *Shigellosis* yang ditransmisikan secara fekal-oral dengan manifestasi utama berupa diare akibat proses invasi epitel usus manusia. Gambar diatas merupakan hasil *scanning* mikroskop elektron interaksi *Shigella* terhadap sel stem sebagai *host*. Gambar tersebut menunjukkan bahwa setelah bakteri melakukan kontak dengan sel *host*, terjadi pembentukan struktur yang mengelilingi *Shigella* yang memediasi proses internalisasi *Shigella flexneri*. (Sumber: <https://wellcomeimages.org>)

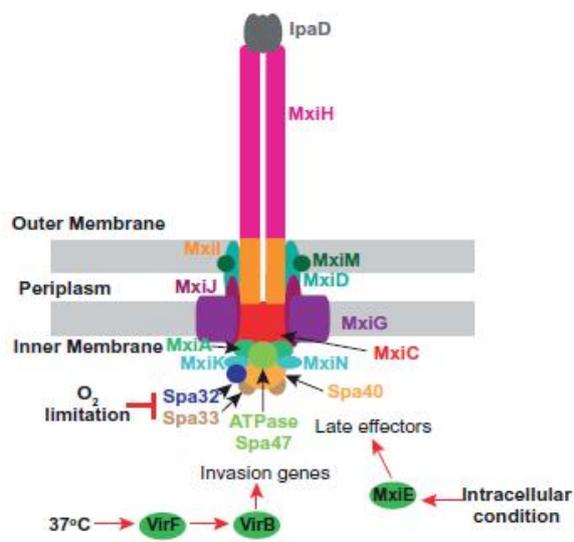
Distribusi spesies dan serotipe *Shigella* sangat heterogen berdasarkan waktu dan lokasi. Di negara berkembang, penyebab utama infeksi *Shigella* adalah *Shigella flexneri* dengan estimasi jumlah sebesar 60%.

2.2.2 Struktur Antigenik dan Klasifikasi Biologis

Klasifikasi *Shigella* terbagi ke dalam empat spesies yang terdiri dari hampir 50 serogrup berbasis antigen-O, yaitu *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, dan *Shigella sonnei*. Diferensiasi empat spesies tersebut memerlukan kombinasi uji biokimia dan uji serologis, karena relatif sedikit sifat biokimia yang berguna dan absolut untuk penggolongan spesies. Mannitol dan dekarboksilasi ornithin utamanya digunakan dalam uji biokimia. *Shigella sonnei* positif terhadap keduanya, sedangkan *Shigella dysenteriae* negatif terhadap keduanya. *Shigella flexneri* dan *Shigella boydii* positif terhadap mannitol tetapi negatif terhadap ornithin, dengan pengecualian pada *Shigella boydii* serotipe 13 yang positif terhadap ornithin. Tidak ada sifat biokimia yang dapat membedakan *Shigella flexneri* dari *Shigella boydii*, sehingga diperlukan *serogrouping* untuk diferensiasi ke tingkat spesies menggunakan pengelompokan sera.

Serotyping pada *Shigella* berbasis pada antigenitas antigen-O saja, yang mana saat ini terdapat 55 serotipe. *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae* dan *Shigella flexneri* masing-masing memiliki 20, 15 dan 19 serotipe, sedangkan *Shigella sonnei* hanya memiliki satu serotipe. Sembil belas serotipe *Shigella flexneri* saat ini adalah 1a, 1b, 1c (atau 7a), 1d, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4av, 4b, 5a, 5b, X, Xv (4c), Y, Yv, 6 dan 7b.

Spesies *Shigella* awalnya melekat dan menyerang sel M yang terletak di *Peyer's patch*. Kemudian, sistem sekresi tipe III (T3SS) memediasi sekresi empat protein, yaitu IpaA, IpaB, IpaC, dan IpaD ke dalam sel epitel dan makrofag (Gambar 2.4). Protein-protein ini berperan dalam menginduksi kerusakan membran pada sel target, yang menyebabkan terjadinya proses endositosis bakteri. Setelah difagositosis oleh makrofag, *Shigella* melisiskan vakuola fagositik dan bereplikasi dalam sitoplasma sel inang. Dengan polimerisasi filamen aktin dalam sel inang, bakteri bergerak dalam sitoplasma ke sel yang berdekatan, kemudian terjadi perpindahan dari sel ke sel. Dengan cara ini, *Shigella* terlindung dari respon imun inang dan bertahan dari fagositosis dengan menginduksi apoptosis makrofag. Proses ini juga mengarah pada pelepasan IL-1 β yang menarik leukosit polimorfonuklear ke dalam jaringan yang terinfeksi. Hal ini menyebabkan gangguan pada stabilitas dinding usus dan memungkinkan bakteri untuk mencapai sel epitel yang lebih dalam.



Gambar 2.4 Genetika dan arsitektur sistem sekresi tipe III (T3SS) *Shigella*. Struktur seperti jarum yang dimiliki oleh T3SS beserta faktor-faktor kunci regulatornya. (Sumber: Octavia & Lan, 2015).



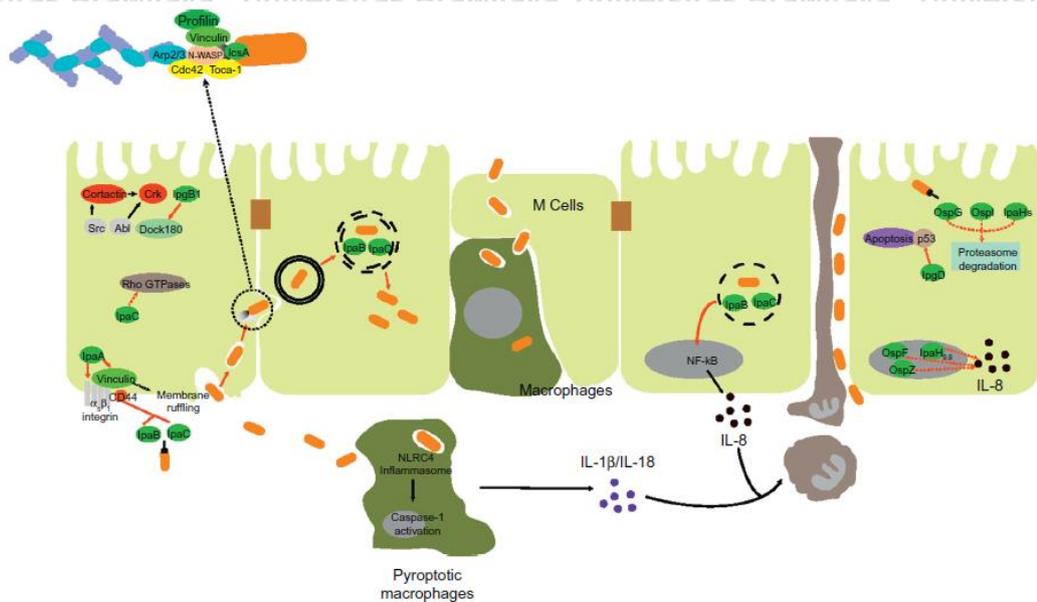
Strain *Shigella dysenteriae* menghasilkan eksotoksin yang disebut *Shiga toxin*. Toksin tersebut mirip dengan *Shiga toxin* yang diproduksi oleh EHEC, yaitu memiliki satu subunit A dan lima subunit B. Subunit B akan berikatan ke glikolipid sel inang (Gb3) dan memfasilitasi transfer subunit A ke dalam sel. Subunit A memotong 28S rRNA dalam subunit ribosom 60S, sehingga mencegah pengikatan RNA transfer aminoasil dan mengganggu sintesis protein. Manifestasi utama dari aktivitas toksin tersebut adalah kerusakan pada epitel usus. Namun, pada sebagian kecil pasien, *Shiga toxin* dapat menyebabkan kerusakan sel endotel glomerulus yang mengakibatkan *hemolytic uremic syndrome* (HUS) (Murray, *et al.*, 2013; Octavia & Lan, 2015).

2.2.3 Patogenesis diare akibat *Shigella flexneri*

Shigella merupakan salah satu patogen yang sangat infeksius, sehingga “menelan” 10-100 unit bakteri saja telah adekuat sebagai dasar perkembangan infeksi *Shigellosis*. Hal ini didukung oleh karakteristik *Shigella* yang resisten terhadap lingkungan asam sehingga memudahkannya menembus *barrier* kimiawi lambung hingga menuju ke usus (Sansone, 2001). Patogenesis infeksi *Shigella flexneri* banyak dikaitkan dengan kemampuan bakteri untuk melakukan invasi dan replikasi pada epitel usus sehingga memicu inflamasi serta destruksi epitel. Hal tersebut sangat berbeda dengan patogenesis diare oleh *Vibrio cholerae*, yaitu ia akan mensekresi toksin yang dapat meningkatkan kadar cAMP di dalam enterosit, sehingga menyebabkan hilangnya cairan dalam jumlah banyak selama diare (Perez-Lopez, *et al.*, 2016).

Penetrasi *Shigella flexneri* ke dalam epitel usus terjadi melalui sel M (*membranous epithelial cell*) (Gambar 2.5). Kemudian, *Shigella flexneri*

menginduksi respon inflamasi berupa fagositosis oleh makrofag, namun bakteri tersebut memiliki mekanisme evasi berupa *invasin plasmid antigen-B* (Ipa-B) yang berfungsi sebagai agen yang dapat melisiskan vakuola fagositosis sehingga mampu menghindari degradasi oleh enzim lisosom dan bergerak bebas menuju sitoplasma.



Gambar 2.5 Diagram patogenesis infeksi *Shigella*. Peristiwa ini dimulai ketika sel M melakukan endositosis terhadap patogen dari lumen usus dan mentransmisikannya ke makrofag. *Shigella* menginduksi apoptosis makrofag dan melepaskan sitokin proinflamasi. Setelah dilepaskan dari makrofag, *Shigella* menyerang dari sisi basolateral sel epitel usus. Begitu berada di dalam sel inang, *Shigella* berkembang biak di sitoplasma dan menyebar secara intra dan interseluler menggunakan motilitas berbasis aktin. (Sumber: Octavia & Lan, 2015).

Setelah mencapai sitoplasma, Ipa-B berperan sebagai aktivator *caspase-1*, yaitu agen pro-apoptotik terhadap makrofag, sehingga *Shigella flexneri* dapat bebas sekali lagi menuju submukosa usus. Setelah mencapai sisi basolateral enterosit, maka *Shigella* memulai proses invasi yang diperantarai oleh IpaA-IpaD melalui sistem injeksi sekresi tipe III (T3SS), sehingga terjadi re-organisasi sitoskeleton, polimerisasi aktin, dan perubahan lainnya pada permukaan sel. Perubahan tersebut dimanfaatkan oleh *Shigella flexneri* untuk menginduksi proses internalisasi *Shigella flexneri* dengan pembentukan



vakuola sehingga memudahkan kontak antara *Shigella flexneri* dengan sitoplasma sel epitel. Selain itu, proses tersebut dapat meningkatkan motilitas *Shigella flexneri* melalui penyusunan “ekor” aktin (Jennison dan Verma, 2004; Octavia & Lan, 2015).

Pada fase selanjutnya, enterosit mengalami kerusakan oleh *Shigella* dengan cara melisiskan membran sel dan membentuk ulkus di mukosa, sehingga kerusakan menjadi semakin luas hingga mencapai lamina propria dan memicu reaksi inflamasi yang lebih berat, seperti abses. Manifestasi klinis diare dari proses ini merupakan diare tipe inflamasi yang ditandai dengan volume cairan yang sedikit serta mengandung leukosit, eritrosit, bakteri, dan debris seluler lainnya (Octavia & Lan, 2015).

2.3 Vaksinasi

2.3.1 Definisi Vaksinasi secara Umum

Vaksinasi adalah tindakan memasukkan vaksin ke dalam tubuh untuk menghasilkan imunitas terhadap penyakit tertentu (CDC, 2018). Secara definisi, vaksinasi adalah proses merangsang respons imun adaptif yang protektif terhadap mikroba melalui paparan terhadap bentuk yang tidak patogen atau komponen dari mikroba. Berikut ini merupakan beberapa jenis vaksin berdasarkan jenis antigen yang digunakan dan telah dikembangkan saat ini (Tabel 2.1) (Abbas, *et al.*, 2016; Kumar, *et al.*, 2019).

Antigen dari virus atau bakteri tersebut akan dimasukkan dalam tubuh dan akan menginduksi imunitas tanpa menimbulkan penyakit.

Vaksinasi juga mampu menurunkan resiko penyakit berkembang menjadi

lebih berat dikarenakan sudah terbentuk kekebalan dari respon imun pertama yang diinduksi oleh vaksin. Pada vaksin berbahan dasar antigen protein, toksin, LAV baik yang bakteri maupun virus akan ditangkap oleh APC dan merespon melalui sekresi antibodi melalui sel T (*T-dependent antibody response*). Sedangkan pada vaksin dengan antigen berupa polisakarida akan menginduksi respon dari sel B tanpa melalui sel T (*T-independent antibody response*). Antibodi yang terbentuk melalui jalur ini dianggap masih kurang baik dikarenakan memorinya yang singkat dan afinitasnya lebih rendah bila dibandingkan melalui jalur produksi antibodi melalui sel T. Oleh karena itu, dibutuhkan konjugasi dari polisakarida dengan protein pembawa sebagai peptida tidak dikenali dan menarik sistem imun untuk merespon melalui sel T. Imunitas jangka panjang dievaluasi dari pemeliharaan efektor antigen spesifik atau induksi dari sel memori yang efisien dan cukup cepat diaktivasi kembali pada paparan patogen berikutnya (Siegrist, 2008).

Tabel 2.1 Ringkasan Jenis Vaksinasi

Jenis Vaksin	Contoh	Bentuk perlindungan
Bakteri hidup yang dilemahkan atau dimatikan	BCG, kolera, campak, demam kuning, whole cell pertussis, IPV	Respon antibodi
Virus hidup yang dilemahkan	Polio oral, rabies, rotavirus,	Respon antibodi, respon imun seluler
Vaksin subunit (antigen)	Toksoid tetanus, toksoid difteri	Respon antibodi
Vaksin konjugat	Infeksi <i>Haemophilus influenzae</i>	Respon antibodi tergantung sel T <i>helper</i> pada antigen polisakarida
Vaksin buatan	Vaksin hepatitis (protein rekombinan)	Respon antibodi
Vektor virus	Uji klinis antigen HIV pada <i>canary pox vector</i>	Respon imun humoral dan seluler
Vaksin DNA	Uji klinis sedang berlangsung untuk beberapa infeksi	Respon imun humoral dan seluler
Vaksin berbasis ragi	<i>S. cerevisiae</i> dan <i>P. pastoris</i> untuk terapi kanker dan penyakit infeksi	Respon imun seluler



Sedangkan, imunisasi adalah proses di mana seseorang dibuat imun atau resisten terhadap penyakit menular, biasanya dilakukan dengan pemberian vaksin. Vaksin akan merangsang sistem kekebalan tubuh sendiri untuk melindungi orang tersebut dari infeksi atau penyakit selanjutnya (WHO, 2020). Terdapat dua jenis imunisasi, yaitu imunisasi aktif dan imunisasi pasif. Injeksi antibodi murni atau serum yang mengandung antibodi untuk memberikan perlindungan sementara yang cepat atau pengobatan terhadap seseorang disebut imunisasi pasif.

Misalnya, pada bayi baru lahir menerima imunitas pasif alami dari imunoglobulin ibu yang melintasi plasenta atau terdapat dalam ASI.

Imunisasi aktif terjadi ketika respons imun distimulasi karena paparan dengan imunogen, seperti paparan terhadap agen infeksi (imunisasi alami) atau melalui paparan terhadap mikroba atau antigen mereka dalam vaksin. Pada paparan selanjutnya dengan agen virulen, respon imun sekunder diaktifkan dengan lebih cepat dan lebih efektif dalam melindungi individu, atau dapat melalui antibodi untuk memblokir penyebaran atau fungsi dari agen.

Imunisasi pasif dapat digunakan untuk beberapa tujuan, seperti untuk mencegah penyakit setelah paparan yang diketahui (misalnya, cedera karena jarum suntik dengan darah yang terkontaminasi virus hepatitis B), memperbaiki gejala penyakit yang sedang berlangsung, melindungi individu yang defisiensi imun, memblokir kerja toksin bakteri dan mencegah penyakit yang disebabkan (misalnya sebagai terapi).

Sediaan serum imun globulin yang berasal dari manusia atau hewan seropositif (misalnya kuda) tersedia sebagai profilaksis untuk beberapa penyakit karena bakteri dan virus. Preparat antibodi monoklonal saat ini sedang dikembangkan untuk perlindungan terhadap berbagai agen dan

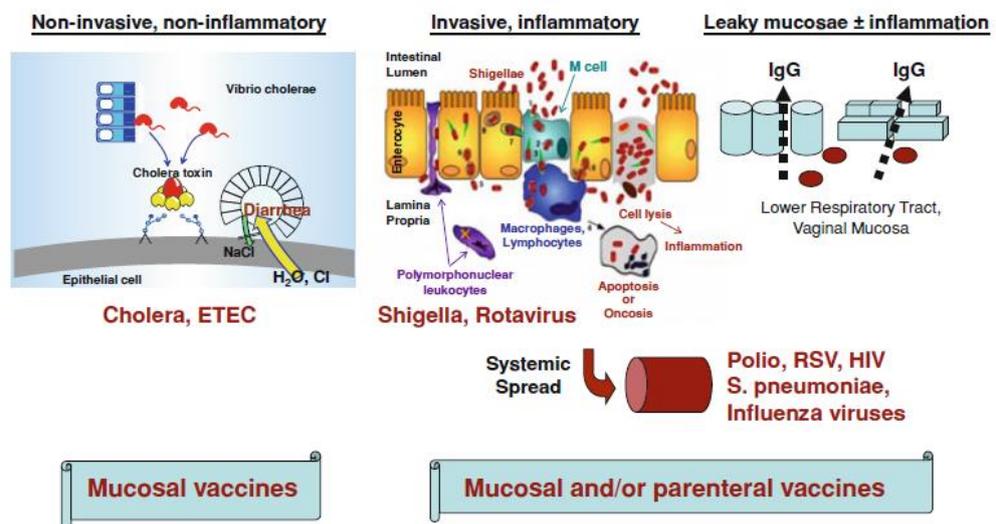
penyakit. Selain penyakit menular, antibodi monoklonal digunakan sebagai terapi untuk memblokir respon sitokin yang berlebihan dalam inflamasi dan sepsis, serta untuk terapi lainnya.

Vaksin istilah ini berasal dari virus *vaccinia*, anggota yang kurang virulen dari famili poxvirus yang digunakan untuk mengimunisasi orang terhadap cacar. Vaksin klasik dapat dibagi lagi menjadi dua kelompok berdasarkan apakah mereka mendapat respon imun terhadap infeksi (vaksin hidup seperti *vaccinia*) atau tidak (vaksin subunit yang diinaktifkan). Vaksin berbahan dasar DNA mewakili cara baru dalam imunisasi. Dalam pendekatan ini, DNA plasmid disuntikkan ke otot atau kulit, kemudian diambil oleh sel dendritik, otot, atau makrofag, yang mengekspresikan gen untuk imunogen seolah-olah untuk infeksi alami. Vaksinasi DNA merangsang respon kekebalan sel T, yang dapat ditingkatkan dengan antigen untuk memperoleh respon antibodi matur (Murray, *et al.*, 2013).

2.3.2 Jenis Rute Vaksinasi

Infeksi dan transmisi penyakit antar individu dari sebagian besar patogen mukosa dapat secara efektif dikendalikan oleh vaksin melalui mukosa. Namun, sifat patogen dan jaringan mukosa target akan menentukan apakah vaksin harus diberikan secara mukosa atau parenteral agar lebih efektif (Gambar 2.6). Rute vaksinasi mukosa berperan penting untuk perlindungan terhadap infeksi non-invasif pada permukaan mukosa, misalnya infeksi oleh *Vibrio cholerae* dan ETEC. Sedangkan, pada infeksi yang invasif, misalnya infeksi oleh *Shigella spp.* dapat menggunakan rute vaksinasi mukosa dan/atau parenteral (Czerkinsky & Holmgren, 2010).

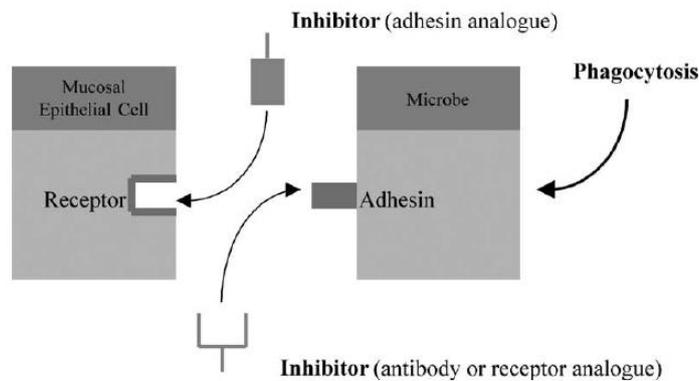
Vaksinasi melalui mukosa dinilai lebih baik meskipun melalui jalur per oral, nasal, rektal maupun vaginal dikarenakan sebagian besar infeksi berawal dari mukosa dan mampu menginduksi respon imun protektif. Target dari vaksinasi melalui mukosa dapat digunakan untuk menginduksi imunitas sehingga dapat mencegah adhesi dan terbentuknya kolonisasi bakteri di mukosa, mencegah bakteri melakukan penetrasi dan replikasi di mukosa atau mencegah toksin dari bakteri merusak epitel dan sel targetnya. Membran mukosa di usus memiliki ciri khas dalam menginduksi sistem imun mukosa yang melindungi permukaan dari patogen. Sistem imun mukosa memiliki tiga fungsi utama, yaitu perlindungan membran mukosa dari invasi dan kolonisasi bakteri, mencegah pembentukan antigen dari makanan, udara, dan mikrobiota, serta mencegah perkembangan dari respon imun yang berbahaya (Holmgren & Czerkinsky, 2005).



Gambar 2.6 Perbedaan jenis rute vaksinasi. Perbedaan jenis infeksi mukosa dan permukaan mukosa dapat menjadi pertimbangan pemilihan jenis rute vaksin yang berbeda. Vaksinasi melalui mukosa berperan penting untuk melindungi infeksi non-invasif pada permukaan mukosa yang secara normal tidak menembus sel epitel; Infeksi *Vibrio cholerae* dan ETEC merupakan salah satu contoh infeksi, di mana vaksin yang menginduksi proteksi utamanya diperantarai oleh antibodi s-IgA yang diproduksi secara lokal. Perlindungan melawan patogen yang lebih invasif atau infeksi pada permukaan mukosa yang dapat menembus sel epitel, seperti infeksi *Shigella spp*, *Rotavirus*, infeksi pada mukosa saluran nafas atau genital, dapat diperoleh baik dengan vaksinasi mukosa maupun parenteral. (Sumber: Czerkinsky & Holmgren, 2010).

2.3.3 Molekul Adhesin sebagai Target Vaksin

Molekul adhesin memiliki peranan penting dalam kolonisasi karena dapat mencegah bakteri patogen tereliminasi. Pada bakteri intraseluler, proses adhesi setelah berikatan dengan permukaan sel inang akan memicu terjadinya internalisasi bakteri ke dalam sel inang. Salah satu struktur bakteri yang terlibat dalam perlekatan bakteri ke sel inang adalah pili. Adhesi dari bakteri ke sel inang juga berperan dalam pembentukan biofilm (Ribet & Cossart, 2015).



Gambar 2.7 Skema inhibisi adhesi bakteri terhadap sel inang. (Sumber: Bassett, *et al.*, 2003).

Metode pengembangan molekul adhesin sebagai vaksin pernah dilakukan sebelumnya yaitu pada pertusis. Vaksin aseluler pertusis (aP) memiliki beberapa komponen dalam vaksinnya yaitu toksin pertusis, filamen hemaglutinin (FHA), dan *pertactin* (PRN) yang merupakan molekul adhesin dengan berat molekul 68-70 kDa protein, fimbrial-2 dan fimbrial-3, serta adjuvan dari vaksin. *Pertactin* adalah protein permukaan dari bakteri *Bordetella pertussis* yang paling imunogenik dan berperan sebagai perantara proses adhesi ke sel eukariot (WHO, 2009). Selain itu, juga terdapat penelitian di Inggris yang mengembangkan inhibitor berbasis analog adhesin mikroba atau inhibitor berupa antibodi atau

analog reseptor yang dapat mengenali reseptor mikroba untuk menghambat proses adhesi pada organisme *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, dan *Rotavirus* (Gambar 2.7) (Basset, et al., 2003).

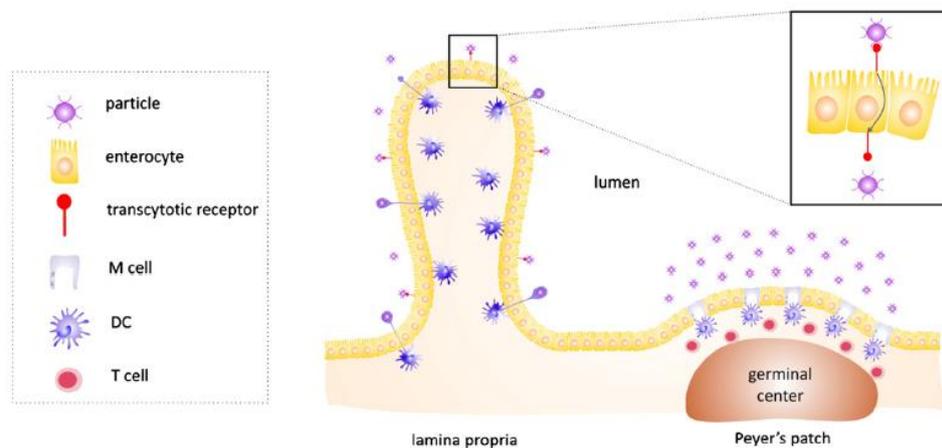
Sejalan dengan dua konsep penelitian tersebut, saat ini mulai dikembangkan juga metode vaksinasi untuk diare yang berbasis pada molekul adhesin bakteri penyebabnya. Berdasarkan studi yang dilakukan Sumarno, et al., (2015) dilaporkan bahwa terdapat korelasi antara kemampuan *Shigella dysenteriae* untuk melekat pada enterosit mencit dengan jumlah pili pada bakteri. Hal ini dapat membuktikan bahwa pengurangan jumlah pili dapat membantu mengurangi jumlah perlekatan bakteri pada sel inang, sehingga molekul adhesin dari bakteri tersebut dapat dikembangkan untuk kandidat vaksin dari *Shigella*. Penelitian lain yang mendukung kemudian melakukan identifikasi subunit pili dari masing-masing spesies dari *Shigella spp.* (Sumarno et al., 2016).

Studi lain dari Sumarno (2000) juga melaporkan ditemukannya molekul adhesin dengan berat molekul 37,8 kDa pada subunit pili *Vibrio cholerae*. Kemudian pada studi yang dilakukan oleh Sumarno et al., (2011) telah membuktikan bahwa molekul adhesin tersebut bila dikonjugasi dengan adjuvan, yaitu *cholera toxin subunit-B* (CTB) mampu meningkatkan produksi s-IgA dan bersifat protektif terhadap mukosa usus mencit. Oleh karena itu, molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* ini juga dapat berperan sebagai kandidat vaksin untuk pencegahan kolera.

2.3.4 Respon Imun Mukosa terhadap Vaksinasi

Beberapa mekanisme imunitas inang pada mukosa usus terhadap infeksi oleh bakteri enterik di antaranya adalah pengenalan

lebih penting untuk pengembangan vaksin melalui mukosa adalah meningkatnya bukti bahwa respon imun mukosa lokal berperan penting untuk perlindungan terhadap penyakit, terutama untuk penyakit yang dimulai pada permukaan mukosa seperti mukosa saluran pernapasan, gastrointestinal, atau urogenital. Di sisi lain, respon imun mukosa paling efisien diinduksi oleh pemberian vaksin pada permukaan mukosa, sedangkan vaksin yang disuntikkan umumnya merupakan penginduksi imunitas mukosa yang kurang baik sehingga kurang efektif untuk melawan infeksi pada permukaan mukosa (Borges, *et al.*, 2009).



Gambar 2.9 Jalur uptake vaksin dalam usus. (Sumber: Devriendt, *et al.*, 2012).

Antigen yang berasal dari vaksin diendositoses oleh sel M dalam epitel terkait folikel (FAE) pada *germinal center* yang terletak di atas *Peyer's patch* (Gambar 2.9). Sel-sel M yang sangat terspesialisasi ini memiliki beberapa fitur struktural dan fungsional yang unik, yang dapat memfasilitasi endositoses dan transportasi makromolekul dan bakteri. Berbeda dengan enterosit, sel M tidak memiliki lapisan mukus yang luas, kemudian memiliki *brush border* dan mikrovili yang tidak teratur, memiliki glikokaliks tipis dan aktivitas enzimatis rendah. Selain itu, membran basolateral diinvaginasi untuk membentuk kantong intraepitel di mana terdapat limfosit dan sel penyaji antigen (APC), yang memungkinkan



transfer antigen secara cepat ke sel-sel imun ini. Menariknya, sel M juga dapat mengangkut antigen ke sel imun yang berada di lamina propria (LP).

Meskipun sel M umumnya dianggap sebagai portal untuk masuknya antigen ke GALT, pentingnya vili enterosit tidak boleh diabaikan, karena sel-sel ini jauh melebihi jumlah sel M dan memiliki kemampuan transitis untuk makromolekul, seperti *cholera toxin* (CT).

Selain itu, enterosit juga berperan dalam fagositosis dan transitis bakteri melintasi *barrier* epitel dengan perantara TLR4. Selain diserap oleh sel-sel epitel, sel fagosit di lamina propria dapat secara langsung mengenali antigen dan bakteri dalam lumen usus dengan memperluas tonjolan trans-epitel ke dalam lumen usus tanpa mengganggu integritas *barrier* melalui ekspresi protein *tight junctions* (Devriendt, *et al.*, 2012).

2.4 Sel Th17

Sel Th17 merupakan salah satu subset limfosit T CD4⁺ yang memiliki efek protektif terhadap permukaan mukosa serta mempertahankan *barrier* mukosa terhadap infeksi (Levinson, W., 2014). Ditemukan oleh Zhang *et al.* (2014) pada mencit model *autoimmune encephalomyelitis*, sel Th17 memiliki karakteristik yang unik. Selain bersifat protektif terhadap infeksi, sitokin yang diproduksi oleh sel Th17 diketahui berperan dalam beberapa penyakit autoimun, seperti *rheumatoid arthritis*, *psoriasis*, *juvenile idiopathic arthritis*, *Chron's disease*, dan lain-lain (Tabarkiewicz, *et al.*, 2015). Pembentukan sel Th17 dipengaruhi oleh beberapa faktor diferensiasi seperti sitokin imunoregulator TGF- β , sitokin pro-inflamasi IL-1, IL-6, dan IL-21, serta ditunjang oleh faktor-faktor transkripsi seperti STAT3, ROR γ t, Rora, dan IRF4 (Muranski & Restifo, 2013). Melalui aktivasi

faktor transkripsi tersebut, maka fungsi sel Th17 dapat dicapai dengan sintesis sitokin IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, dan IL-26 (Meller, *et al.*, 2015).

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) merupakan sitokin regulator yang diproduksi oleh makrofag. Sitokin ini diperlukan baik dalam induksi awal IL-17

pada sel T CD4⁺ maupun induksi IL-23R sehingga sel lebih responsif terhadap IL-23 yang penting untuk proses maturasi sel. Faktor diferensiasi selanjutnya

adalah IL-6, yakni sitokin yang dihasilkan oleh sel imunitas alami seperti sel dendritik, monosit, makrofag, sel mast, sel B, dan subset sel T teraktivasi.

Interleukin-6 banyak terlibat dalam produksi protein fase akut oleh hepatosit.

Pada proses diferensiasi sel Th17, IL-6 merupakan ko-stimulator poten TGF- β dengan cara kerja yang sinergis. *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β)

diperlukan untuk menjaga responsivitas sel T helper naif terhadap IL-6, kemudian setelah IL-6 berikatan dengan reseptornya maka terjadi aktivasi gp130

hingga faktor transkripsi STAT3. Sehingga STAT3 dapat meningkatkan ekspresi ROR γ t dan ROR α yang bertanggungjawab terhadap produksi IL-17. Selain

kedua sitokin tersebut, diketahui bahwa IL-21 juga berperan dalam induksi ekspresi ROR γ t. Interleukin-21 merupakan sitokin yang dihasilkan oleh beberapa

subset sel T seperti sel Th1, Th2, dan Th17. Namun, sel Th17 merupakan sel yang mampu menghasilkan IL-21 dengan jumlah tertinggi, sehingga dapat

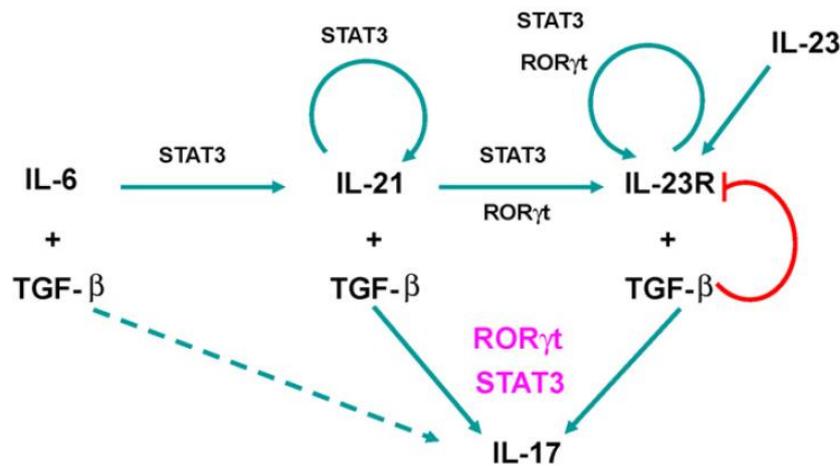
dikatakan bahwa IL-21 memiliki kinerja *positive feedback loop* yang mengamplifikasi produksi sel Th17 (Korn, *et al.*, 2009).

Infeksi pada mukosa yang disebabkan oleh beberapa jenis bakteri seperti *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri* dapat memicu respon imun berupa

peningkatan produksi sel Th17. Toksin kolera yang merupakan eksotoksin *Vibrio cholerae* mampu menstimulasi sel dendritik untuk memproduksi aktivin A. Sitokin

tersebut merupakan protein dimer anggota superfamili TGF- β yang terdiri dari subunit β A dan β B. Berdasarkan studi lain yang pernah dilakukan, diketahui

bahwa sitokin aktivin A dapat bertindak sebagai substitusi IL-6 dalam pembentukan sel Th17. Setelah diproduksi oleh sel dendritik, TGF- β dan aktivin A kemudian berikatan dengan reseptornya dan bekerja secara sinergis dalam aktivasi transduksi sinyal diferensiasi sel Th17 (Kang, *et al.*, 2016).



Gambar 2.10. Peran sekuensial dari sitokin-sitokin dalam diferensiasi sel Th17. Interleukin-6 menginduksi IL-21, yang kemudian menginduksi transkripsinya sendiri melalui jalur yang tergantung STAT3. Ekspresi IL-23R yang diinduksi oleh IL-21 (dan IL-23) tergantung pada ROR γ T dan STAT3. Pensinyalan IL-21R dan IL-23R, bersamaan dengan TGF- β , memprogram sel T naif berdiferensiasi menjadi sel Th17 secara independen dari IL-6. Diferensiasi sepenuhnya dari sel Th17 membutuhkan aksi yang kooperatif dari ROR γ T dan STAT3. Induksi IL-17 oleh IL-6 dalam kondisi tanpa sinyaling IL-21/IL-21R ditunjukkan dengan garis putus-putus. (Sumber: Ivanov, *et al.*, 2007).

Hasil yang serupa juga ditemukan pada infeksi *Shigella flexneri*. Studi oleh Sellge, *et al.* (2010) menyatakan bahwa paparan *Shigella* menunjukkan dominasi produksi sel Th17 dengan sel T- $\gamma\delta$ sebagai imunitas mukosa minor terhadap sel Th1. Pada hewan coba mencit yang diinduksi infeksi *Shigella flexneri* dapat dibuktikan adanya peningkatan IFN- γ , IL-17A, dan IL-22. Kemudian hal yang menarik adalah IL-17A memiliki efek klirens bakteri yang lebih baik pada infeksi sekunder. Pada mencit model infeksi primer *Shigella flexneri* tidak didapatkan perbedaan inhibisi proliferasi bakteri yang signifikan terhadap pemberian anti-IL-17A maupun mencit defisiensi reseptor IL-17A. Sedangkan pada infeksi sekunder, injeksi anti-IL-17A menyebabkan penurunan berat badan dan peningkatan jumlah koloni *Shigella* yang signifikan. Selain itu,



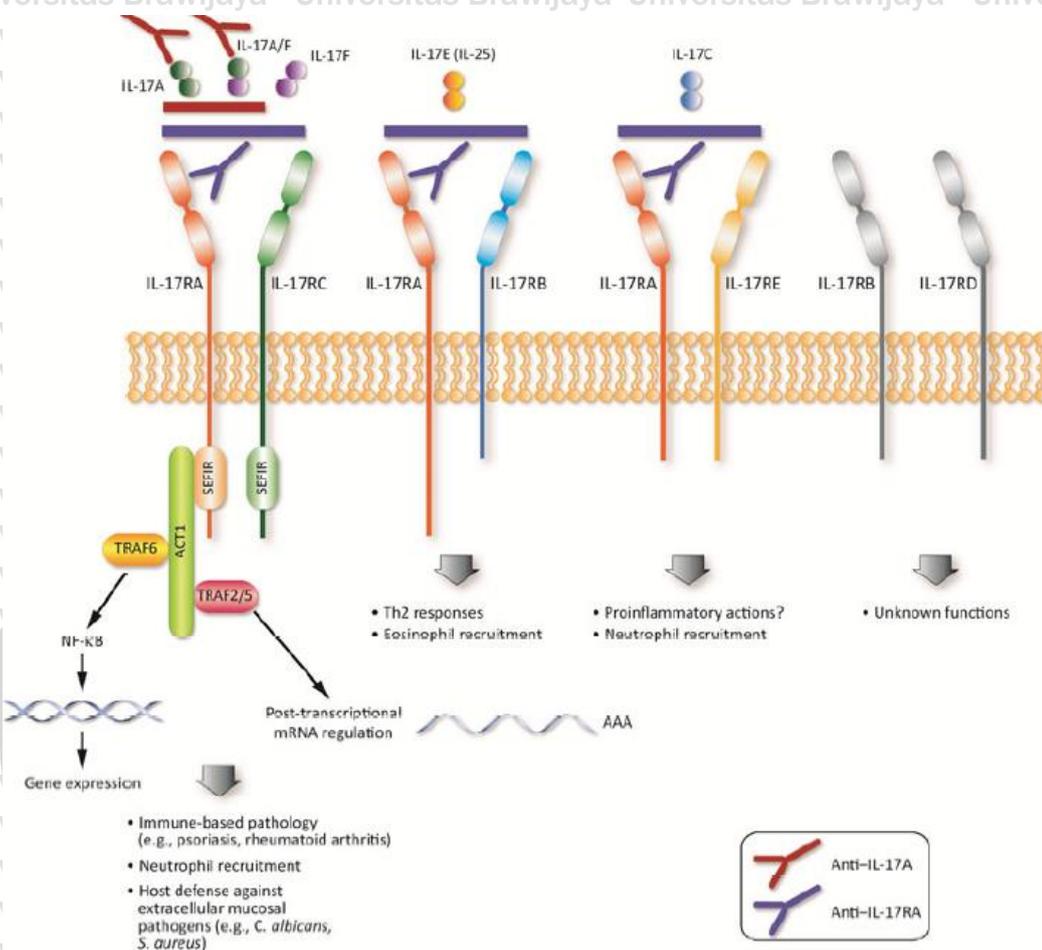
hasil studi tersebut juga mengidentifikasi peningkatan IL-1 β , IL-6, CXCL1, dan CXCL9. Hal ini, sekaligus membuktikan teori bahwa IL-17A merupakan sitokin yang dapat melawan bakteri serta fungi dengan peningkatan ekspresi kemokin yang memediasi rekrutmen sel PMN untuk mengeliminasi agen penyebab infeksi.

2.5 Interleukin-17A (IL-17A)

Interleukin-17 (IL-17) merupakan sitokin pro-inflamasi yang banyak disekresikan oleh sel T yang teraktivasi. Sitokin IL-17 ini dalam jumlah tinggi berkaitan dengan penyakit inflamasi yang kronis, seperti reumatoid arthritis, psoriasis dan *multiple sclerosis*. Interleukin-17 pertama kali ditemukan pada tahun 1993. IL-17 terdiri dari enam subunit yaitu dari IL-17A hingga IL-17F, namun IL-17A dan IL-17F cenderung lebih banyak diteliti. Interleukin-17 memiliki homologi bervariasi dengan IL-17A mulai dari 50% untuk IL-17F hingga 16% untuk IL-17E. Baik IL-17A dan IL-17F disekresikan oleh sel Th17 dan sel imun lainnya, termasuk *innate lymphoid cell*, sebagai homodimer terkait disulfida tetapi juga dapat membentuk heterodimer IL-17A/IL-17F. IL-17A sekitar 10-30 kali lipat lebih poten daripada IL-17F, sedangkan heterodimer IL-17A/IL-17F memiliki aktivitas menengah (Khirkam, *et al.*, 2014).

Reseptor dari IL-17 yang dinamakan IL-17R ditemukan pertama kali pada tahun 1995. Reseptor IL-17A banyak diekspresikan oleh sel hematopoietik maupun non-hematopoietik seperti sel fibroblas, sel epitel, makrofag, dan neutrofil. IL-17A, IL-17F dan IL17A/F heterodimer akan berikatan dengan reseptor heterodimer kompleks yaitu IL-17RA dan IL-17RC (Jin & Dong, 2013). IL-17R mengaktifkan NF- κ B dan jalur MAP kinase untuk memproduksi sitokin pro-inflamasi dan perekrutan mieloid ke area yang mengalami inflamasi. Selain

dari sel Th17, IL-17 juga diproduksi oleh makrofag, neutrofil, sel T- $\gamma\delta$, sel T NK, dan sel *Paneth* (Jin dan Dong, 2013; Beringer, *et al.*, 2016).



Gambar 2.11 Struktur famili reseptor IL-17. Famili reseptor IL-17 terdiri dari lima subunit yang disebut IL-17RA hingga IL-17RE, dengan fitur struktural yang dikonservasi termasuk *extracellular fibronectin III-like domain*, domain transmembran tunggal, dan *cytoplasmic SEF/IL-17R (SEFIR) domain*. IL-17A, IL-17A/F, dan IL-17F mengikat kompleks reseptor yang terdiri dari dua rantai IL-17RA dan satu subunit IL-17RC. IL-17RA dan IL-17RC berinteraksi, melalui domain SEFIR, dengan protein adaptor Act1, yang berisi dua motif pengikatan TRAF. Jalur yang melibatkan TRAF6 mengarah pada aktivasi jalur *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) dan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), dan faktor-faktor transkripsi *CCAAT/enhancer binding protein* (C/EBP) yang menghasilkan ekspresi gen pro-inflamasi. Kompleks pensinyalan TRAF6-independen, TRAF2/5 yang terkait dengan IL-17 juga telah diidentifikasi yang menghasilkan peningkatan stabilitas mRNA untuk kemokin CXCL1. (Sumber: Khirkam, *et al.*, 2014).

Interleukin-17A banyak berperan dalam menginduksi inflamasi.

Interleukin-17 utamanya IL-17A dan IL-17F bersifat protektif terhadap patogen yang menyerang epitel dan mukosa. Sel Th17 yang teraktivasi juga mensekresikan IL-17F, IL-21, IL-22, dan IL-23 (Shabgah, *et al.*, 2014). Selain

pada bakteri, IL-17A juga berperan pada infeksi jamur melalui *Innate Limfoid cell* dan sel NK (Gladiator, *et al.*, 2013; Bar, *et al.*, 2014).

Defek terhadap IL-17A maupun IL-17RA menyebabkan menurunnya kadar mediator inflamasi dan perekrutan neutrofil ke tempat inflamasi.

Sedangkan peningkatan dari IL-17A atau IL-17F yang tidak terkendali dapat menyebabkan peningkatan jumlah sitokin pro-inflamasi dan menyebabkan inflamasi kronis yang memicu kerusakan jaringan dan autoimun (Jin dan Dong, 2013). Kadar IL-17 yang meningkat banyak ditemukan pada penyakit autoimun, seperti osteoarthritis, Imun Trombositopenia Purpura (ITP), ankilosing spondilitis, myasthenia gravis, *inflammatory bowel disease* (IBD), dan psoriasis (Tabarkiewicz, *et al.*, 2015; Ye, *et al.*, 2015). Pada sistematik lupus eritematus (SLE) dan ankilosing spondilitis, peningkatan kadar IL-17 berkaitan dengan derajat keparahan dari penyakit (Tabarkiewicz, *et al.*, 2015).

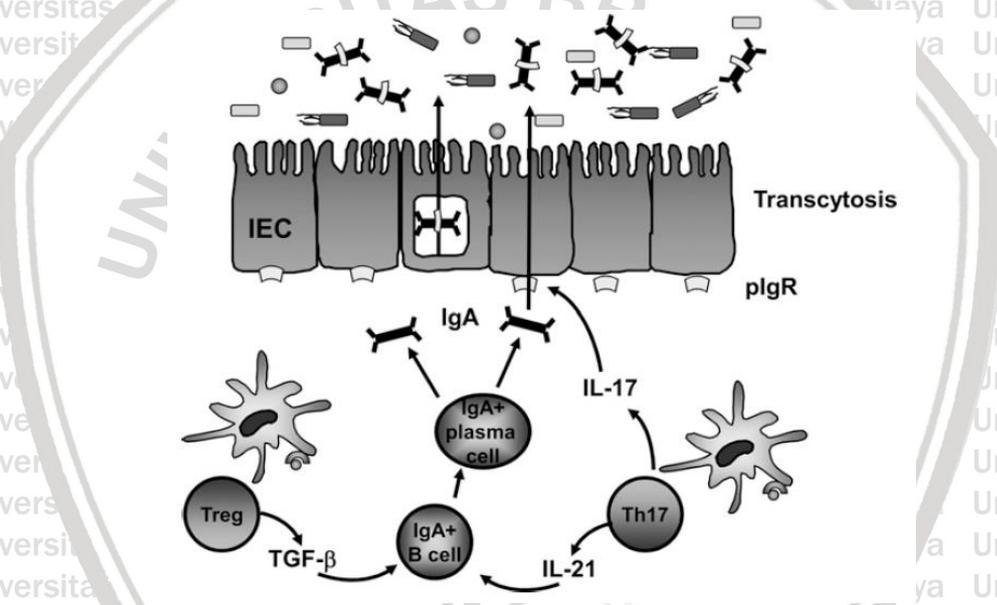
Di dalam mukosa, IL-17 berperan sebagai mediator protektif dengan beberapa mekanisme, yaitu menjaga integritas lapisan pelindung, memproduksi faktor antimikroba yang akan menahan patogen pada lapisan pelindung dan perekrutan neutrofil. Produksi dari IL-17 pada *caecum* selama infeksi *Salmonella* digunakan sebagai perantara sel Th17 dan sel intestinal lainnya termasuk sel T NK dan sel T- $\gamma\delta$. Produksi ini bergantung pada aktivasi dari NOD1 dan NOD2. Dilaporkan juga pada mencit yang mengalami defisiensi IL-17AR, terjadi penyebaran *S. Typhimurium* mencapai limfonodus mesenterium dan lien (Perez-Lopez, *et al.*, 2016).

2.6 Secretory-IgA (s-IgA)

Antibodi berfungsi pada seluruh bagian tubuh dan lumen dari organ mukosa. Antibodi diproduksi setelah limfosit B dirangsang oleh antigen di dalam

organ limfoid perifer (seperti kelenjar limfe, limpa, dan jaringan limfoid mukosa).

Beberapa limfosit B yang dirangsang oleh antigen akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang mensekresi antibodi, namun sebagian tetap berada di organ limfoid atau jaringan yang mengalami inflamasi, kemudian bermigrasi menuju sumsum tulang dan tinggal di sana. Sel plasma memproduksi dan mensekresi antibodi isotipe rantai berat yang berbeda kelas. Antibodi tersebut memasuki darah dan dapat mencapai berbagai tempat infeksi di perifer, serta dapat disekresikan di mukosa untuk mencegah infeksi dari mikroba yang mencoba menembus epitel (Abbas, *et al.*, 2016).



Gambar 2.12 Koordinasi regulasi produksi dan sekresi IgA dalam usus oleh sel Th17 dan Treg. Sel Treg memproduksi TGF-β yang berperan dalam diferensiasi sel B naif menjadi sel yang memproduksi IgA. Sel Th17 memproduksi IL-21 yang memperkuat efek TGF-β dan meningkatkan diferensiasi sel B IgA+. *Polymeric IgA* kemudian berikatan ke pIgR yang diekspresikan pada sel-sel epitel usus, sehingga terjadi transitis dari struktur pIgR-pIgA, dan kompleks IgA disekresikan dalam lumen sebagai s-IgA. Interleukin-17 dari sel Th17 berperan dalam meningkatkan ekspresi pIgR pada sel epitel usus dan meningkatkan jumlah sekresi s-IgA ke dalam lumen usus. (Sumber: Cao, *et al.*, 2012).

Imunoglobulin A disekresi dalam jumlah banyak di mukosa usus. Baik melalui mekanisme sel T-dependen maupun sel T-independen yang mengatur produksi IgA di usus. Imunoglobulin A berfungsi dalam netralisasi dan pembersihan patogen ekstraseluler dengan mencegah adhesi dan akses patogen tersebut ke permukaan epitel. Diproduksi oleh sel-sel plasma di mukosa,

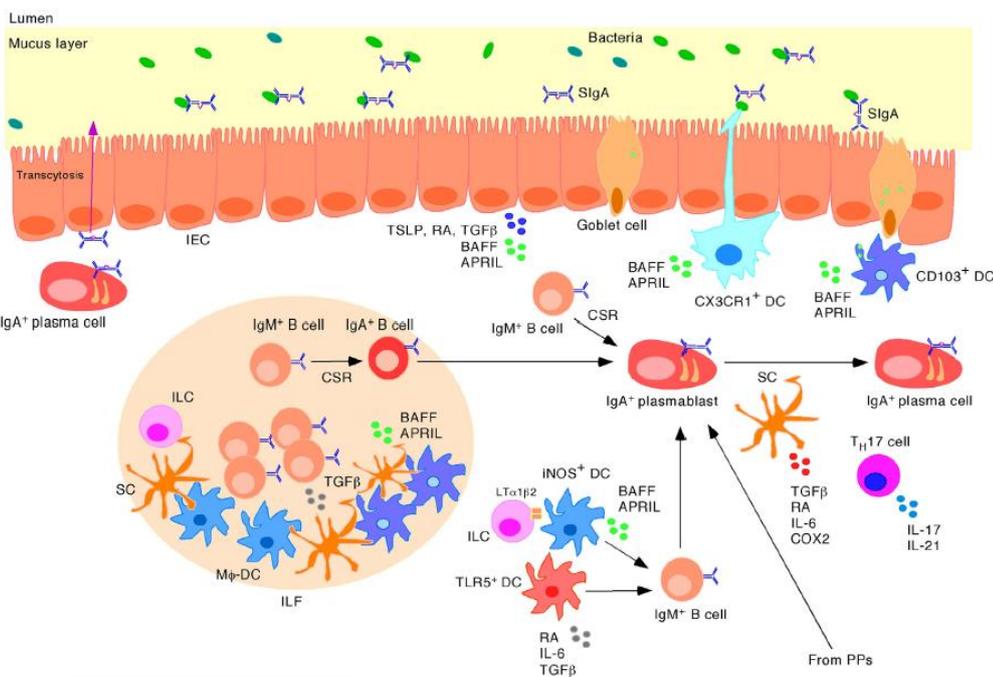


sekresi IgA bergantung pada transportasi melintasi epitel usus, yang diperantarai oleh suatu reseptor Fc spesifik, yang disebut *polymeric immunoglobulin receptor* (pIgR), yang diekspresikan pada permukaan basolateral sel-sel epitel. Reseptor ini mengikat IgA, memasukkannya ke dalam vesikel, dan membawanya ke permukaan lumen. Di sini, reseptor dipecah oleh suatu protease, dan IgA dilepaskan ke dalam lumen dengan masih membawa bagian dari reseptor poli-Ig yang terikat (komponen sekretorik). Komponen sekretorik yang terbawa akan melindungi antibodi dari degradasi oleh protease usus. Ekspresi pIgR sangat penting untuk perlindungan yang diperantarai IgA. Sel-sel Th17 mendorong translokasi IgA melintasi epitel usus melalui induksi pIgR oleh IL-17 (Cao, *et al.*, 2012; Abbas, *et al.*, 2016).

Di dalam usus, IgA dapat dihasilkan melalui beberapa jalur, di dalam atau di luar struktur folikel terorganisasi yang dimiliki oleh *gut associated lymphoid tissues* (GALT), dengan atau tanpa bantuan kognitif dari sel T CD4⁺. Di dalam GALT, sel M menangkap antigen dalam lumen dan mengirimkannya ke *subepithelial dome* (SED) untuk pengenalan antigen oleh sel dendritik (DC) atau dieliminasi oleh makrofag. Setelah pengenalan antigen, DC mengalami maturasi dan bermigrasi ke zona sel T (wilayah interfolikular, IFR) di *Peyer's patch* (PP), *Isolated lymphoid follicle* (ILF) atau *Mesenteric lymph node* (MLN). Kemudian, DC mengaktifkan sel T naif yang berdiferensiasi menjadi sel efektor. Bergantung pada lingkungan sitokin, berbagai subset sel T yang dapat dihasilkan, diantaranya adalah sel T helper (Th) 2 terutama terlibat dalam respons antibodi, sel Th1 terutama dibutuhkan dalam respon terhadap patogen intraseluler, sel T regulator yang mengarah pada toleransi, dan sel Th17 yang dapat berperan patogenik maupun protektif tergantung pada konteksnya (Longet, S., 2013; Fagarasan, *et al.*, 2015).

memproduksi IgA kemudian mengekspresikan BLIMP-1 dan mengatur *gut homing receptor* $\alpha 4\beta 7$ dan CCR9 sebagai respon terhadap asam retinoat dari DC yang menstimulasi TLR. Proses ini memungkinkan migrasi sel plasmablas ke dalam lamina propria usus, yaitu tempat di mana mereka menjadi sel plasma berumur panjang. Sebagian besar sel plasma ini dimutasi dan diseleksi, kemudian melepaskan repertoire antibodi IgA yang sangat beragam untuk pembentukan hubungan simbiosis dengan mikrobiota. (Sumber: Fagarasan, *et al.*, 2015).

Sedangkan pada produksi s-IgA melalui jalur sel T-independen (Gambar 2.14), antigen yang berada dalam lumen secara langsung ditangkap sampelnya oleh sel M, kemudian ditransfer ke DC yang ada dalam SED atau *follicular dendritic cell* (FDC), yang kemudian dipresentasikan ke sel B. Sekresi sitokin seperti *B-cell activating factor* (BAFF), *a proliferating-inducing ligand* (APRIL), dan $TGF-\beta$ oleh DC menyebabkan terjadinya proses *IgA class-switch recombination* (Longet, S., 2013).



Gambar 2.14 Produksi IgA melalui jalur sel T-independen. Sel B yang terdapat di *isolated lymphoid follicle* (ILF) dan lamina propria (LP) dapat memproduksi IgA meskipun tidak ada peran dari sel T. Di dalam ILF, faktor-faktor terlarut seperti BAFF, APRIL, dan $TGF-\beta$ yang diproduksi oleh sel dendritik (DC) yang diaktifkan bakteri dan ROR γ ^t *innate lymphoid cell* (ILC) yang diaktifkan sel stroma, menstimulasi sel B untuk menjalani *switching class* dari IgM menjadi IgA. ROR γ ^t ILC lebih lanjut akan meningkatkan *switching class* IgA melalui induksi sekresi NO oleh sel dendritik yang mengekspresikan iNOS (TipDC) melalui mekanisme yang melibatkan $LT\alpha 1\beta 2$ terikat membran. Nitric oxide akan menstimulasi ekspresi BAFF dan APRIL pada DC. Di dalam LP, beberapa subset dari DC myeloid konvensional berkontribusi pada sintesis IgA setelah menerima sinyal TLR dari bakteri. Bakteri di dalam lumen usus dikenali oleh CX3CR1⁺ dari DC melalui proyeksi transepitel dan setelahnya dapat melakukan transfer antigen terhadap CX3CR1⁺ dari DC dengan fungsi yang menginduksi IgA. DC tersebut meliputi TipDC yang melepaskan BAFF dan APRIL, begitu juga TLR5⁺ dari DC yang melepaskan IL-6 dan asam retinoat (RA). Sitokin penginduksi IgA seperti BAFF, APRIL, RA, dan $TGF-\beta$ juga diproduksi oleh sel epitel usus dan membantu kelangsungan hidup sel plasma dan kemungkinan diferensiasi selain *switching class* IgA dan produksi. Sel epitel usus lebih lanjut dapat meningkatkan respon IgA melalui stimulasi DC untuk memproduksi APRIL



via TSLP. Diferensiasi dan kelangsungan hidup sel-sel plasma yang muncul dari jalur-jalur sel T-independen (atau sel T-dependen) juga meningkat oleh sel stroma yang diaktifkan TLR melalui RA, TGF- β , IL-6, dan *cyclooxygenase 2* dan oleh sel-sel Th17 melalui IL-21 dan IL-17. Sitokin terakhir ini juga dapat meningkatkan transitis IgA di seluruh sel epitel usus. Secara umum, antibodi IgA yang dihasilkan pada ILF dan LP kurang atau telah mengurangi hipermutasi somatik dan dianggap berfungsi sebagai pertahanan lini pertama terhadap patogen mukosa. (Sumber: Fagarasan, *et al.*, 2015).

Beberapa *secretory-IgA* juga berperan dalam meningkatkan proses *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) dan meningkatkan kapasitas fagositosis melalui reseptor Fc α pada beberapa jenis sel. Selain itu juga meningkatkan perlekatan bakteri tertentu pada mukus, mengganggu interaksi bakteri dengan *growth factor* (seperti zat besi) dan enzim-enzim yang dibutuhkan untuk bakteri atau parasit patogenik. *Secretory-IgA* memberikan pengaruh positif pada fase induksi imunitas mukosa dengan mendorong *antigen uptake* ke dalam *Peyer's patch* (Brandtzaeg *et al.*, 1985; Brandtzaeg *et al.*, 1979; Grzych *et al.*, 1993; Killian dan Russell, 1994).

Secretory-IgA (s-IgA) bersifat protektif untuk melawan patogen enterik dengan mengikat molekul permukaan yang diekspresikan oleh patogen dan dengan menetralkan toksinnya. Antibodi sekretori ini penting untuk mengurangi kolonisasi mukosa oleh patogen non-invasif seperti *Vibrio cholerae*. Seminggu setelah timbulnya kolera, pasien dengan infeksi akut menunjukkan puncak limfosit spesifik antigen *Vibrio cholerae* yang bersirkulasi yang mengekspresikan reseptor kemokin usus. Sel-sel ini kemudian bermigrasi ke mukosa usus, di mana mereka meningkatkan sekresi s-IgA di usus. Titer serum s-IgA yang spesifik untuk toksin kolera, yang merupakan faktor virulensi utama dari *Vibrio cholerae*, berkorelasi dengan perlindungan terhadap infeksi. Meskipun antibodi spesifik-toksin menjadi tidak terdeteksi pada waktu satu tahun setelah infeksi, individu yang terinfeksi sebelumnya dapat menunjukkan sekresi antibodi yang cepat di usus bila terpapar kembali dengan antigen *Vibrio cholerae*. Selain itu, s-IgA juga memiliki efek anti-inflamasi. Sebuah penelitian membuktikan fenomena

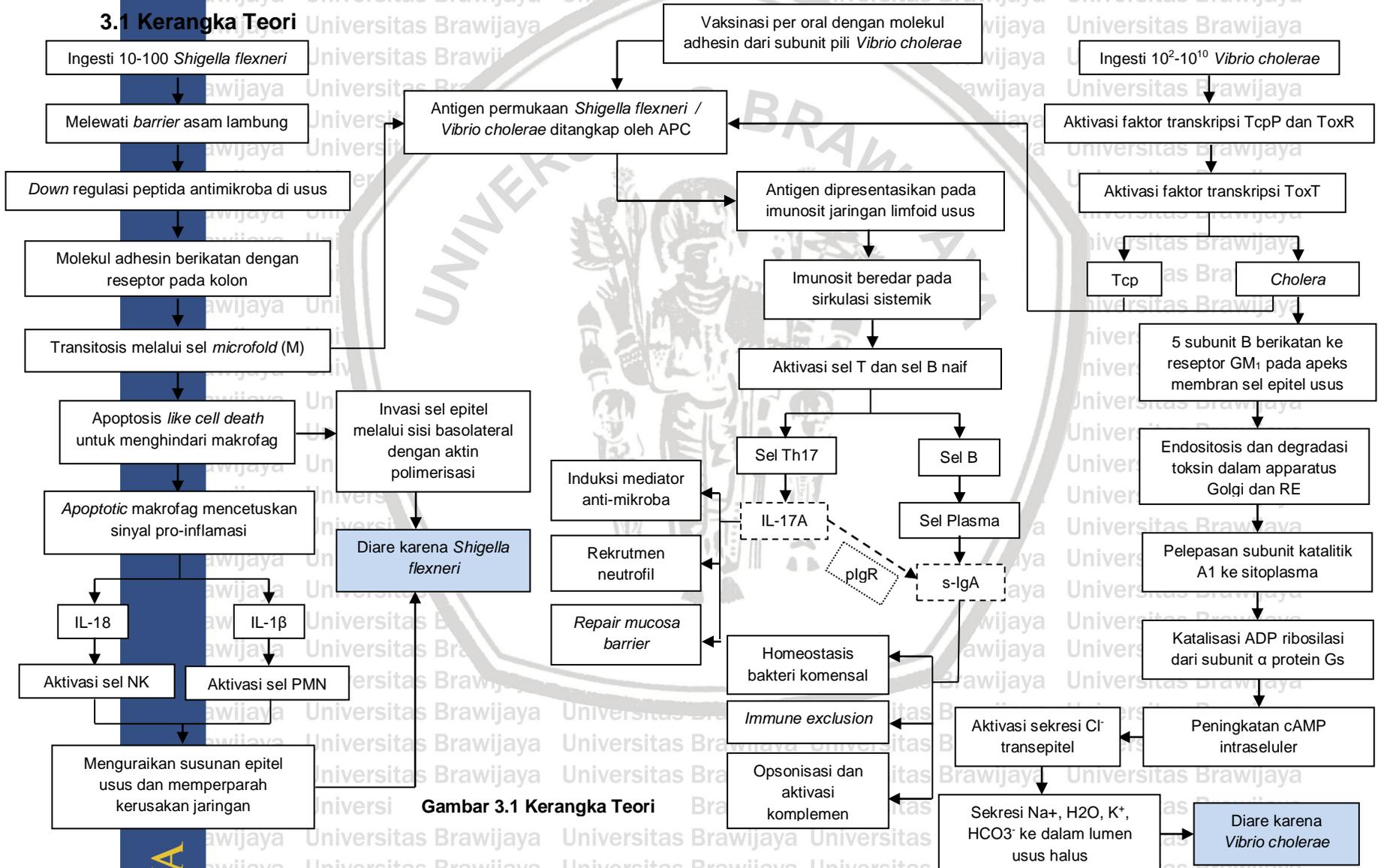
ini menggunakan model *rabbit ileal loop* untuk infeksi *Shigella flexneri*. Pada penelitian tersebut, dilaporkan bahwa bakteri dinetralkan oleh s-IgA spesifik-LPS, namun beberapa kompleks imun juga masuk ke dalam *Peyer's patch* dan diinternalisasi oleh sel dendritik di *Peyer's patch*. Menariknya, kompleks imun yang telah diopsonisasi oleh s-IgA dapat menurunkan inflamasi dan mencegah kerusakan *barrier* usus (Longet, S., 2013; Perez-lopez, *et al.*, 2016).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1 Kerangka Teori

3.2 Deskripsi Kerangka Teori

Patogenesis disentri basiler (*Shigellosis*) terjadi ketika hospes “menelan” 10-100 bakteri dan terjadi proses adhesi bakteri ke epitel usus. Proses adhesi tersebut terdiri dari dua tahap, yaitu *anchoring*, yang diperankan oleh pili dan *docking* sebagai tahap kedua yang diperankan oleh *outer membrane protein* (OMP). Setelah terjadi proses adhesi, bakteri akan melakukan kolonisasi dan invasi pada mukosa serta dapat mensekresi toksin. Hal tersebut menyebabkan degenerasi epitel dan inflamasi pada lamina propria sehingga terjadi deskuamasi dan ulserasi mukosa yang menyebabkan terjadinya perdarahan, migrasi sel-sel inflamasi, dan sekresi lendir ke dalam lumen usus yang merupakan manifestasi klinis dari disentri.

Sedikit berbeda dengan patogenesis kolera yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae*. Patogenesis dimulai ketika hospes “menelan” sekitar lebih dari 10^2 - 10^{10} bakteri dalam air atau makanan sebagai *transportemnya* untuk menimbulkan manifestasi klinis. Bakteri ini pada awalnya akan menempel pada *brush border* dari sel epitel usus halus yang kemudian akan bermultiplikasi dan menyebarkan toksin kolera beserta mucinase dan endotoksin. Enterotoksin *Vibrio cholerae* yang bersifat *heat labile* terdiri atas subunit A dan subunit B. Subunit B akan menempel pada reseptor mukosa gangliosida GM_1 yang kemudian akan mencetuskan subunit A untuk masuk ke dalam sel. Aktivasi toksin subunit A menyebabkan peningkatan kadar *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) sehingga menyebabkan hipersekresi air dan elektrolit sebagai manifestasi klinis dari kolera.

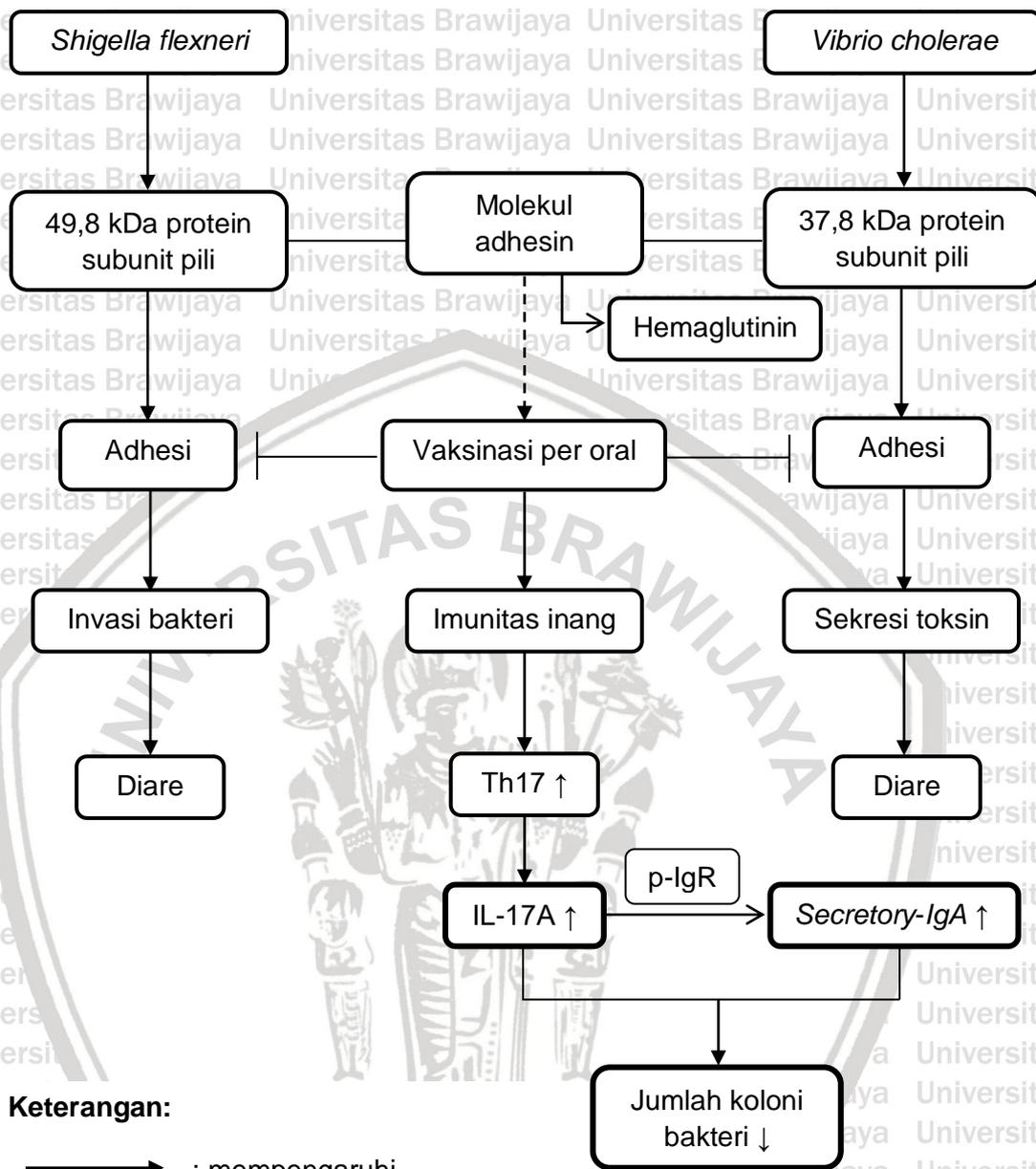
Bila ditinjau dari segi imunitas inang, antigen yang terdapat pada *Shigella flexneri* maupun *Vibrio cholerae* akan dipresentasikan oleh *antigen presenting cell* (APC) dan dikenali oleh limfosit T *helper*, yang berperan dalam aktivasi sel B.

Aktivasi sel T menyebabkan generasi sel T *helper* (Th) efektor yang berbeda

termasuk sel Th1, Th2, dan Th17. Sel B yang teraktivasi akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang menghasilkan Imunoglobulin A dan sitokin pro-inflamasi sebagai produk dari sel Th17, diantaranya adalah subset sitokin IL-17A. Interleukin-17A mampu mengerahkan neutrofil ke lokasi invasi bakteri dan meningkatkan *repair* dari *mucosa barrier* dengan merangsang proliferasi sel epitel dan produksi *tight junction protein*. Sel Th17 memberikan kontribusi dalam mempertahankan homeostasis imunitas sel inang melawan mikroba secara khusus melalui induksi IL-17A terhadap ekspresi pIgR di epitel usus, sehingga terjadi peningkatan sekresi *secretory-IgA* (s-IgA) ke dalam lumen usus. Melalui mekanisme *immune exclusion*, s-IgA mampu mencegah terjadinya adhesi bakteri, dapat menetralkan toksin, opsonisasi dan aktivasi komplemen.

Patogenesis dari *Shigellosis* dan kolera diawali oleh proses adhesi bakteri pada epitel usus. Sehingga dengan adanya vaksin berbahan dasar protein pili bakteri, diharapkan mampu mencegah adanya perlekatan bakteri terhadap hospes dan dibuktikan dengan penurunan jumlah koloni bakteri pada kultur sekret usus mencit pada medium agar setelah diinfeksi bakteri. Oleh karena itu, berdasarkan hasil uji anti-hemaglutinasi yang positif antara subunit pili *Shigella flexneri* dengan berat molekul 49.8 kDa dan subunit pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37.8 kDa yang telah dilakukan oleh Anindhita (2018), lebih lanjut diharapkan vaksinasi dengan molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* mampu menjadi kandidat vaksin yang homolog untuk mencegah *Shigellosis* maupun kolera di masa depan.

3.3. Kerangka Konsep



Keterangan:

- : mempengaruhi
- | : menghambat
- - - - -> : perlakuan
- : menginduksi
- : variabel yang diteliti
- : variabel yang tidak diamati secara langsung

Gambar 3.2 Kerangka Konsep



3.4 Deskripsi Kerangka Konsep

Bakteri *Shigella flexneri* dan *Vibrio cholerae* memiliki molekul adhesin, yaitu 49,8 kDa subunit pili pada *Shigella* dan 37,8 kDa subunit pili pada *Vibrio*.

Molekul adhesin tersebut berperan dalam proses adhesi bakteri pada mukosa usus, baik pada bagian usus halus untuk *Vibrio cholerae* dan pada bagian usus besar untuk *Shigella flexneri*. Proses adhesi bakteri ini merupakan tahapan pertama dalam urutan patogenesis yang membuat bakteri dapat menginvasi sel epitel usus maupun mensekresikan toksin dan faktor berbahaya lainnya sehingga menimbulkan manifestasi diare dengan ciri klinis yang berbeda antara kolera dan *Shigellosis*.

Imunitas inang sangat berperan dalam mencegah progresifitas diare karena infeksi oleh kedua bakteri tersebut. Apabila imunitas inang terhadap bakteri tersebut rendah, maka akan cenderung mengalami manifestasi klinis diare karena *Vibrio* maupun *Shigella*. Namun sebaliknya, apabila imunitas inang terhadap bakteri tersebut baik, maka manifestasi klinis diare dapat dicegah.

Salah satu cara untuk dapat meningkatkan imunitas pada inang adalah dengan vaksinasi. Dalam penelitian ini, vaksinasi diberikan secara per oral, utamanya untuk menginduksi respon imun mukosa. Komponen imun yang berperan penting dalam imunitas mukosa adalah sel Th17, karena subset sel T ini mensekresikan sitokin IL-17A yang dapat menarik sel-sel fagosit untuk menyerang mikroorganisme patogen pada mukosa. Sel Th17 memberikan kontribusi dalam mempertahankan homeostasis imunitas sel inang melawan mikrobiota secara khusus melalui induksi IL-17A terhadap ekspresi *polymeric Immunoglobulin receptor* (pIgR) di bagian basal dari epitel usus, sehingga terjadi peningkatan sekresi *secretory-IgA* ke dalam lumen usus.

Bakteri *Vibrio cholerae* memiliki protein dengan berat molekul 37.8 kDa pada subunit pilinya, yang berperan dalam proses adhesi. Begitu juga dengan

Shigella flexneri yang memiliki molekul adhesin dengan berat molekul 49.8 kDa pada subunit pilinya. Kedua molekul adhesin tersebut diketahui bersifat imunogenik dan bersifat protektif untuk mencegah diare pada mencit. Kedua molekul adhesin tersebut juga memiliki sifat hemagglutinin, sehingga diduga berpotensi memiliki reaksi silang di antara keduanya.

Dalam penelitian ini, digunakan metode *Mice Ligated Ileal Loop* (MLIL) untuk membuat model mencit diare. Metode tersebut telah terbukti mampu digunakan untuk uji protektivitas vaksinasi terhadap diare menggunakan molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae*. Sehingga diharapkan, vaksinasi menggunakan molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* juga dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri pada kultur sekret usus mencit yang telah diinfeksi bakteri *Shigella flexneri* maupun *Vibrio cholerae*.

3.3 Hipotesis Penelitian

3.3.1 Vaksinasi molekul adhesin 37.8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* meningkatkan kadar IL-17A pada darah mencit yang divaksinasi molekul adhesin.

3.3.2 Vaksinasi molekul adhesin 37.8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* meningkatkan kadar *secretory-IgA* pada sekret usus mencit yang divaksinasi molekul adhesin.

3.3.3 Vaksinasi molekul adhesin 37.8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* menurunkan jumlah koloni bakteri pada kultur sekret usus mencit yang telah diinfeksi *Shigella flexneri*.

3.3.4 Vaksinasi molekul adhesin 37.8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* menurunkan jumlah koloni bakteri pada kultur sekret usus mencit yang telah diinfeksi *Vibrio cholerae*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratorik dengan desain *Randomized Post Test Only with controlled group* secara *in vivo* dan *ex vivo*. Hewan coba yang digunakan adalah mencit balb/c yang dikelompokkan secara paralel menjadi dua kelompok pada parameter IL-17A dan *secretory-IgA*, serta lima kelompok pada parameter jumlah koloni bakteri. Hewan coba mencit dipilih dalam penelitian ini karena dengan metode MLIL, mencit dapat menunjukkan patofisiologi diare akibat *Shigella* secara alami yang ditandai oleh peningkatan sekresi cairan dalam lumen usus, kerusakan enterosit, dan kolonisasi bakteri. Hal ini sangat mirip dengan kondisi patologis yang terjadi pada manusia. Selain itu, penggunaan hewan coba mencit dinilai lebih etis karena merupakan hewan dengan tingkat lebih rendah untuk model diare dibandingkan dengan kelinci dan hewan coba diinfeksi bakteri setelah dikorbakan terlebih dahulu sehingga akan mengurangi rasa sakit (Faisal, *et al.*, 2013; Setyorini, *et al.*, 2013; Sumarno, *et al.*, 2015).

Pada parameter IL-17A dan *secretory-IgA*, hewan coba dibagi menjadi dua kelompok penelitian, yakni kelompok kontrol dan kelompok yang divaksinasi (subunit pili 37,8 kDa *Vibrio cholerae*), mencit tersebut kemudian dibagi menjadi lima kelompok yang akan memasuki prosedur MLIL dan diambil sekret ususnya setelah diinfeksi *Shigella* maupun *Vibrio*, untuk dikultur pada medium agar.

Kelompok tersebut meliputi: kontrol negatif, kontrol positif *Shigella flexneri* (KPS), kontrol positif *Vibrio cholerae* (KPV), kelompok mencit yang divaksinasi 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dan diinfeksi dengan *Shigella flexneri* (P1), kelompok

mencit yang divaksinasi 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dan diinfeksi dengan *Vibrio cholerae* (P2).

4.2 Populasi dan Sampel

Mencit yang digunakan berbobot 20-30 gram, usia 6-8 minggu, jantan, kondisi sehat ditandai dengan pergerakan aktif dan bulu mata bersih. Untuk memperoleh variabilitas mencit yang digunakan sebagai sampel/ulangan penelitian, maka mencit dari setiap kelompok dipilih dengan cara randomisasi sederhana.

Jumlah sampel/ulangan setiap kelompok pada penelitian ini sesuai rumus Federrer. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(5 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$r - 1 \geq 15/4$$

$$r \geq 4,75$$

Keterangan: t = jumlah perlakuan, r = jumlah ulangan

Berdasarkan rumus di atas, jumlah minimal mencit yang digunakan dalam tiap kelompok adalah lima ekor. Lima kelompok perlakuan adalah sebagai berikut ini, ditampilkan pada tabel 4.1. Oleh karena itu, total dari seluruh sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25 ekor mencit balb/c.

Tabel 4.1 Alokasi Sampel untuk Setiap Kelompok

Kelompok	Jumlah Ulangan	Jenis Perlakuan
Kontrol (n=15)	KN	5 Tanpa vaksinasi maupun infeksi
	KPS	5 Tanpa vaksinasi, diinfeksi <i>Shigella flexneri</i> 10 ⁶ cfu/ml
	KPV	5 Tanpa vaksinasi, diinfeksi <i>Vibrio cholerae</i> 10 ⁷ cfu/loop
	P1	5 Divaksinasi 37,8 kDa subunit pili <i>Vibrio cholerae</i> 250 µg + CTB (Σ = 0,1 ml) selama 28 hari (hari ke 7,14, 21, 28), kemudian diinfeksi <i>Shigella flexneri</i> 10 ⁶ cfu/ml setelah metode MLIL
Perlakuan (n=10)	P2	5 Divaksinasi 37,8 kDa subunit pili <i>Vibrio cholerae</i> + CTB (Σ = 0,1 ml) selama 28 hari (hari ke 7,14, 21, dan 28), kemudian diinfeksi <i>Vibrio cholerae</i> 10 ⁷ cfu/loop setelah metode MLIL

Keterangan:

KN: Kelompok kontrol negatif; KPS: Kelompok kontrol positif infeksi *Shigella flexneri*; KPV: Kelompok kontrol positif infeksi *Vibrio cholerae*; P1: Kelompok yang divaksinasi 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dan diinfeksi *Shigella flexneri*; P2: Kelompok yang divaksinasi 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dan diinfeksi *Vibrio cholerae*.

4.3 Kriteria Sampel

4.3.1 Kriteria Inklusi

- Mencit balb/c berjenis kelamin jantan
- Umur 6-8 minggu
- Berat badan sekitar 20-30 gram
- Kondisi sehat: gerakan mencit yang aktif, bulu yang putih bersih, mata dan bulu mata bersih

4.3.2 Kriteria Eksklusi

- Mencit mati dan sakit (mengalami diare) selama masa perlakuan
- Mencit yang tidak mau makan selama penelitian



4.4 Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah vaksinasi molekul adhesin 37.8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae*.

4.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar interleukin-17A (IL-17A) dalam darah dan kadar *secretory-IgA* (s-IgA) pada mukosa usus mencit setelah dilakukan vaksinasi, serta jumlah koloni bakteri pada kultur sekret mukosa usus setelah mencit diinfeksi.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Biosains, penghitungan jumlah koloni bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FKUB, serta pengukuran kadar IL-17A dan kadar *secretory-IgA* dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUB. Waktu penelitian mulai dari tanggal 1 Oktober 2018 saat mencit pertama kali divaksin hingga tanggal 7 November 2018 ketika mencit terakhir dibedah. Kemudian dilakukan analisis data sesuai parameter yang telah ditentukan.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Alat yang diperlukan antara lain:

1. Kandang untuk mencit subjek penelitian berukuran 40x30x20 cm beserta perlengkapan minum mencit
2. Neraca elektronik untuk menimbang sisa pakan mencit

Bahan yang diperlukan antara lain:

1. Mencit balb/c berusia 6-8 minggu dengan berat 20-30 gram
2. Pakan standar mencit

4.6.2 Pembuatan Vaksin Molekul Adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae*

4.6.2.1 Kultur Bakteri *Vibrio cholerae*

Alat yang diperlukan antara lain:

1. *Plate Agar*
2. *Scraper*
3. Botol roux
4. *Water Bath*
5. Inkubator
6. *Handsoen*

Bahan yang diperlukan antara lain:

1. *Phosphate-Buffered Saline (PBS)* steril pH 7.4
2. Medium *Thiosulfate citrate bile-salts sucrose* (TCBS)
3. Medium *thioprolin carbonate glutamate* (TCG)

yang terdiri atas 0,02% *Thioprolin*, 0,3% NaHCO_3 , 0,1% *Monosodium l-glutamat*, 1% *Bacto tryptone*, 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. *Brain heart infusion (BHI) broth*

5. Bakteri *Vibrio cholerae* yang diperoleh dari
Laboratorium Mikrobiologi FKUB

4.6.2.2 Isolasi Protein Pili *Vibrio cholerae*

Alat yang diperlukan antara lain:

1. Botol roux
2. Pili cutter
3. Sentrifugator dingin
4. Vortex
5. Refrigerator 4°C

Bahan yang diperlukan antara lain:

1. *Tri chlor acetic acid* (TCA)
2. PBS pH 7,4
3. Hasil kultur bakteri *Vibrio cholerae*

4.6.2.3 Prosedur SDS-PAGE

Alat yang diperlukan antara lain:

1. Mikropipet P1000, P100
2. Tabung *Eppendorf*
3. *Vortex mixer*
4. *Gel cassette*
5. *Gel casting*
6. *Gel comb*
7. Sumber listrik
8. *Chamber*
9. *Staining box*

10. *Shaker incubator*

11. *Gel Doc EZ Imager*

12. *Komputer*

Bahan yang diperlukan antara lain:

1. Sampel supernatan pili

2. *Gel:*

- *DD H₂O*

- *Acrylamide/Bis*

- *Gel Buffer*

- *SDS*

- *APS (Ammonium Persulfate)*

- *TEMED*

3. *Running buffer*

4. *RSB (Reducing Sample Buffer)*

5. *Staining buffer (Comassie blue)*

6. *De-staining buffer*

4.6.2.4 Prosedur Elektroelusi dan Dialisis

Alat yang diperlukan antara lain:

1. *Cawan petri*

2. *Kantong selofan*

3. *Chamber elektroelusi*

4. *Sumber listrik*

5. *Stirrer*

6. *Sentrifugator*

7. *Beaker glass*

8. *Tabung Eppendorf*

9. Nanodrop

10. Pendingin

Bahan yang diperlukan antara lain:

1. 5% Na₂CO₃

2. ddH₂O

3. EDTA

4. Akuades steril

5. *Running buffer*

6. PBS

7. *Ethanol absolut*

8. *Comassie blue*

9. *Destaining*

10. Tris-Cl

11. Gel yang sudah dipotong pada berat molekul 37,8 kDa

4.6.2.5 Prosedur Penambahan Adjuvan

Alat yang diperlukan antara lain:

1. Mikropipet

2. Tabung *Eppendorf*

3. *Stirrer*

4. Inkubator

5. Lemari pendingin

Bahan yang diperlukan antara lain:

1. PBS

2. 2% *glutaraldehyde*

3. *Glycine* pH 7,2

4. Protein subunit pili 37,8 kDa

5. *Cholerae* toxin subunit-B (CTB)

4.6.3 Pemeliharaan Hewan Coba

Alat yang diperlukan antara lain:

1. Kandang untuk tikus subjek penelitian berukuran 40x30x20 cm beserta perlengkapan minum mencit
2. Neraca elektronik untuk menimbang sisa pakan mencit
3. Sonde untuk pemberian vaksin molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae*

Bahan yang diperlukan antara lain:

1. Mencit balb/c
2. Pakan standar mencit
3. Vaksin molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae*

4.6.4 Pembedahan Mencit

Alat yang diperlukan antara lain:

1. Papan bedah
2. Gunting bedah
3. Pinset
4. Jarum pentul
5. Steroform
6. Penggaris
7. Kertas label
8. Termos es
9. Kapas

10. Wadah plastik dan tutup organ

11. S spuit insulin 1cc

12. *Vacutainer*

13. Peralatan untuk pencucian dan fiksasi jaringan

Bahan yang diperlukan antara lain:

1. Mencit balb/c

2. Larutan PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

3. Kloroform 20 ml

4. Formalin 10%

5. Alkohol

4.6.5 Pengukuran Kadar IL-17A

Alat yang diperlukan adalah:

1. Micropipette *single channel* (P200, P1000), dan *multi-channel*

2. *Handscoen*

3. *Vortex mixer*

4. Aluminium foil

5. *Anti-Mouse IL-17A Pre-coated 96-well Strip Microplate*

6. *Plate sealers*

7. Tabung *Eppendorf*

8. Rak tabung *Eppendorf*

9. Botol untuk mencuci atau *automated microplate washer*

10. Inkubator

11. Sentrifugator

12. Kertas tisu

13. *Microplate reader*

14. *Timer*

15. Komputer dan *software* analisis data

Bahan yang diperlukan adalah:

1. Sampel darah mencit
2. **LEGEND MAX™ Mouse IL-17A ELISA Kit (432507):**
 - *Mouse IL-17A Dectection Antibody*
 - *Mouse IL-17A Standard*
 - *Matrix A*
 - *Avidin-HRP A*
 - *Assay Buffer A*
 - *Wash Buffer (20X)*
 - *Substrate Solution F*
 - *Stop Solution*
3. *Deionized (DI) water*

4.6.6 Pengukuran Kadar *secretory-IgA*

Alat yang diperlukan adalah:

1. Spatel
2. Wadah organ
3. *Micropipette single channel* (P200, P1000), dan *multi-channel*
4. *Handskoen*
5. *Vortex mixer*
6. *96-well microplate*
7. Aluminium foil
8. *Plate sealers*
9. Tabung *Eppendorf*

10. Rak tabung *Eppendorf*
11. Botol untuk mencuci atau *automated microplate washer*
12. *Plate sealers*
13. Inkubator
14. Sentrifugator
15. Kertas tisu
16. *Microplate reader*
17. *Timer*
18. Komputer dan *software* analisis data

Bahan yang diperlukan adalah:

1. PBS *cold*
2. PBS steril
3. *Protease inhibitor*
4. Sekret mukosa usus mencit
5. *Mouse s-IgA (Secretory Immunoglobulin A) ELISA Kit (E-*

EL-M104):

- *Reference standard*
 - *Concentrated biotinylated detection antibody (100x)*
 - *Concentrated HRP conjugate (100x)*
 - *Reference standard diluent dan sample diluents*
 - *Biotinylated detection antibody diluents*
 - *HRP conjugate diluent*
 - *Concentrated wash buffer (25x)*
 - *Substrate reagent*
 - *Stop solution*
6. *Deionized (DI) water*

4.6.7 Penghitungan Jumlah Koloni Bakteri

Alat yang diperlukan adalah:

1. *Scrapper*
2. *Sputit* 1cc
3. Medium *MacConkey*
4. Medium *Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose* (TCBS)
5. Inkubator
6. *Colony counter*

Bahan yang diperlukan adalah:

1. *Vibrio cholerae* O1 10^7 cfu/loop
2. *Shigella flexneri* 10^6 cfu/ml
3. Sekret mukosa usus menciit yang telah diinfeksi bakteri

4.7. Definisi Operasional

- *Shigella flexneri* : Bakteri diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, kemudian dikultur untuk diisolasi proteinnya. Satuan pengukuran dinyatakan dalam cfu/mL.
- *Vibrio cholerae* : Bakteri diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, kemudian dikultur untuk diisolasi proteinnya. Satuan pengukuran dinyatakan dalam cfu/loop.
- Adjuvan : Subtansi yang ditambahkan ke dalam vaksin untuk meningkatkan imunogenitas

vaksin sehingga induksi respon imun inang menjadi lebih efektif. Adjuvan yang digunakan pada penelitian ini adalah *Cholera Toxin subunit-B* (CTB). Satuan pengukuran dinyatakan dalam mg.

- Vaksin molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* : Vaksin ini berasal dari hasil isolasi protein dengan berat molekul 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dan diberi tambahan adjuvan CTB. Vaksin ini diberikan secara oral kepada mencit dengan dosis $\pm 250 \mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$ selama 28 hari (hari ke-7, 14, 21, dan 28). Satuan pengukuran dinyatakan dalam μg .

- Interleukin17-A (IL-17A) : Sitokin pro-inflamasi yang diproduksi oleh sel Th17. Interleukin-17A merupakan salah satu subset dari IL-17 yang diketahui dapat menginduksi ekspresi pIgR di epitel usus sehingga dapat meningkatkan translokasi s-IgA ke dalam lumen usus. IL-17A dalam penelitian ini diukur pada darah mencit yang telah divaksinasi per oral dengan molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae*. Satuan pengukuran dinyatakan dalam pg/mL.

• **Secretary-IgA (s-IgA)** : Immunoglobulin yang diproduksi dalam jaringan limfoid mukosa, diangkut melalui epitel oleh plgR, kemudian dimasukkan ke dalam vesikel dan dibawa ke permukaan lumen usus. **Secretary-IgA** dalam penelitian ini diukur pada sekret mukosa usus mencit yang telah divaksinasi per oral dengan molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae*. Satuan pengukuran dinyatakan dalam $\mu\text{g/mL}$.

• **Jumlah koloni bakteri** : Koloni bakteri yang tumbuh pada medium agar dari hasil kultur sekret mukosa usus mencit yang telah diinfeksi oleh *Shigella flexneri* atau *Vibrio cholerae*. Satuan pengukuran dinyatakan dalam cfu.

• **Usus mencit model diare *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri*** : Infeksi oleh *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri* merupakan dua jenis penyakit yang banyak menyebabkan diare. Kedua organisme ini memiliki rute transmisi yang serupa, yakni secara oral, kemudian melakukan proses adhesi, replikasi, dan kolonisasi di epitel saluran cerna.

Sehingga untuk melakukan penelitian mengenai kedua organisme tersebut dilakukan prosedur MLIL. Induksi usus

mencit menjadi model infeksi *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri* dilakukan dengan cara injeksi sejumlah 10^7 cfu cfu/loop bakteri *Vibrio cholerae* dan 10^6 cfu/ml bakteri *Shigella flexneri*. Usus kemudian diinkubasi dalam suhu 37°C selama enam jam yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FKUB.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Pernyataan Etik

Penelitian ini diawali dengan pengurusan etik (*ethical clearance*) yang meliputi pengajuan proposal, formulir laik etik, dan penjelasan etik penelitian yang kemudian dievaluasi oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.8.2 Persiapan Hewan Coba

Persiapan hewan coba terdiri dari persiapan alat dan bahan penelitian dan seleksi hewan coba berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditetapkan. Kemudian dilanjutkan dengan masa aklimatisasi mencit di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selama satu minggu agar mencit terbiasa dengan lingkungan baru sehingga siap diteliti. Seluruh mencit diberi pakan standar. Pemberian pakan dilakukan setiap hari dan diganti pada 24 jam berikutnya.

4.8.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Setelah masa aklimatisasi selama satu minggu, mencit dipilih secara acak (randomisasi) supaya seluruh hewan coba memiliki kesempatan yang sama. Mencit dibagi ke dalam lima kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol negatif, yaitu kelompok yang tidak divaksinasi dan diinfeksi *Shigella flexneri* saat MLIL, kelompok yang tidak divaksinasi dan diinfeksi *Vibrio cholerae* saat MLIL, kelompok yang divaksin molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dan diinfeksi *Shigella flexneri* saat MLIL, dan kelompok yang divaksin molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dan diinfeksi *Vibrio cholerae* saat MLIL.

Pada parameter IL-17A digunakan sampel berupa darah mencit dan pada parameter *secretory-IgA*, digunakan sampel berupa kerokan mukosa usus diambil sebelum metode MLIL sehingga nomenklatur pembagian kelompok yang digunakan hanya kelompok kontrol yang tidak divaksin (kelompok kontrol negatif, kelompok yang tidak divaksinasi dan diinfeksi *Shigella flexneri* saat MLIL, dan kelompok yang tidak divaksinasi dan diinfeksi *Vibrio cholerae* saat MLIL) serta kelompok yang divaksin (kelompok yang divaksin molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dan diinfeksi *Shigella flexneri* saat MLIL, dan kelompok yang divaksin molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dan diinfeksi *Vibrio cholerae* saat MLIL).

4.8.4 Pembuatan Vaksin Molekul Adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae*

4.8.4.1 Kultur Bakteri *Vibrio cholerae*

Bakteri *Vibrio cholerae* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang

dikembangkan dalam media selektif TCBS. Selain itu, untuk memperbanyak pertumbuhan pili maka digunakan media TCG.

Media dibuat dalam 20 botol berukuran 250 ml yang dilakukan secara miring. Kemudian ditambahkan media TCG pada masing-masing botol dengan jumlah sebanyak 50 ml. Sebelum dibiakkan dalam media tersebut, *Vibrio cholerae* diinokulasi pada media BHI dan diinkubasi dalam suhu 24°C selama semalam. Hasil biakan kemudian dicampurkan dengan PBS steril dengan pH 7,4 dengan volume 10 cc. Suspensi yang terbentuk lalu dikerok dan dituangkan dalam botol yang sudah terisi 1000 ml BHI broth kemudian diletakkan dalam *waterbath* dengan suhu 37°C dan dikocok selama 30 menit. Setelah itu suspensi dimasukkan dalam media TCG dalam botol dan diinkubasi selama 2 hari dalam suhu 37°C.

4.8.4.2 Isolasi Protein Pili *Vibrio cholerae*

Hasil kultur bakteri dalam medium TCG kemudian dikumpulkan dalam satu botol steril dan diresuspensi menggunakan larutan TCA hingga konsentrasi final 3%, kemudian di *stir* dalam suhu 4°C selama 1 jam. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit dalam suhu 4°C. Pellet yang didapatkan lalu diresuspensi dengan 6 ml PBS pH 7,4, sementara supernatan dibuang. Hasil suspensi pellet kemudian dilakukan pemotongan pili menggunakan *bacterial pili cutter* yang didesain oleh Sumarno (2000). Kecepatan pencukuran bakteri dilakukan sebesar 10.000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang banyak mengandung protein pili kemudian dipisahkan

dengan pellet dan disimpan dalam suhu 4°C, sedangkan pellet diresuspensi menggunakan PBS pH 7,4 dengan volume yang sama dan dilakukan pemotongan kembali hingga supernatan bening dengan indikator perbandingan menggunakan larutan PBS dan dilakukan uji nanodrop untuk mengetahui konsentrasi *crude* pili dalam setiap ml.

4.8.4.3 Prosedur SDS-PAGE

Untuk mendapatkan protein pili dengan berat molekul 37,8 kDa maka dilakukan *profiling* menggunakan SDS-PAGE. Pertama-tama dilakukan pembuatan *gel* dengan cara menentukan formulasi *gel* yang terdiri dari *stacking gel* dengan konsentrasi 4% dan *separating gel* dengan konsentrasi 12%. Digunakan penyangga berupa Tris HCl masing-masing dengan konsentrasi dan pH sebesar 1,5 M pH 8,8 untuk *separating gel* dan 0,5 M dan pH 6,8 untuk *stacking gel*. Kemudian digunakan APS dan TEMED sesaat sebelum larutan dituang ke dalam *gel cassette*. Untuk 10 ml *monomer solution* digunakan 50 µl 10% APS (*Ammonium Persulfate*) dan 5 µl TEMED pada *separating gel buffer* dan 50 µl 10% APS (*Ammonium Persulfate*) dan 10 µl TEMED pada *stacking gel buffer*. Setelah *monomer solution* dituangkan, kemudian ditambahkan air untuk meratakan permukaannya dan didiamkan hingga gel mengeras. Setelah itu ditambahkan *stacking monomer solution* dalam *gel cassette* yang telah berisi *separating monomer solution* ddH₂O kemudian ditambahkan untuk mengatur volume. *Comb* kemudian dipasang lalu didiamkan hingga *stacking gel* mengeras. *Gel cassette* lalu dilepaskan dari *gel casting* lalu

dimasukkan dalam *chamber*. *Running buffer* lalu ditambahkan hingga *gel cassette* terendam sempurna.

Suspensi hasil pemotongan pili *Vibrio cholerae* ditambahkan dengan RSB dengan perbandingan 1:1, kemudian dipanaskan hingga suhu 100°C selama kurang lebih 5 menit untuk mendenaturasi protein. *Marker* protein sebanyak 10 µl kemudian dimasukkan dalam *well* yang terbentuk pada *gel*, kemudian diikuti oleh sampel sebanyak 15-20 µl/*well*. Kemudian dialiri listrik dengan tegangan 200V selama 35 menit. Apabila *tracking dye* yang berwarna biru telah mencapai garis hijau dari *gel cassette*, maka proses *running* dihentikan. *Gel* kemudian dilepaskan dari kaset dan dimasukkan dalam *staining box* dan dicampur dengan larutan *staining buffer* hingga gel terendam sempurna. Inkubasi dilakukan selama ± empat jam – *overnight* dalam *shaker incubator*. Kemudian *staining buffer* diganti dengan larutan *de-staining buffer* dan diinkubasi dalam *shaker incubator* hingga pita-pita protein nampak jelas. Selanjutnya dilakukan analisis menggunakan *Gel Doc EZ Imager*. Setelah dilakukan identifikasi protein berat molekul 37,8 kDa, maka dilanjutkan dengan pemurnian protein dengan metode elektroelusi.

4.8.4.4 Proses Elektroelusi dan Dialisis

Sebelum dilakukan prosedur elektroelusi dilakukan pemotongan pita protein dari *gel* elektroforesis dan dimasukkan dalam petri yang berisi *running buffer*. Kemudian dimasukkan dalam kantong selofan sebanyak 2 potong. Kantong selofan kemudian dibilas dengan *running buffer* dan dijepit salah satu

ujungnya. *Running buffer* lalu dimasukkan untuk menggenangi gel pita protein 37,8 kDa dengan cara melewati salah satu ujung yang terbuka. Kemudian selofan dijepit kembali di ujung yang terbuka. Selofan lalu dimasukkan dalam *chamber* elektroelusi yang telah diisi oleh *running buffer*. Mesin kemudian dinyalakan selama 60 menit dengan tegangan 120 V. Setelah selesai, selofan diangkat dan dilanjutkan dengan dialisis. Dialisis dilakukan dalam gelas *beaker* yang diisi dengan PBS pH 7,4. Selofan kemudian dimasukkan dan di *stirrer* dalam suhu 4°C selama semalam. Setelah itu, protein dimasukkan dalam tabung *Eppendorf*. *Ethanol* absolut kemudian ditambahkan dengan perbandingan 1:1 dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan lalu dibuang dan endapan dikeringkan. Protein kemudian diresuspensi menggunakan PBS dan dilakukan uji nanodrop untuk mengetahui kadarnya dalam setiap ml. Hasil konsentrasi protein berdasarkan uji nanodrop adalah 2,4 mg/ml.

4.8.4.5 Prosedur Penggabungan Subunit Pili 37,8 kDa *Vibrio cholerae* dengan Adjuvan CTB

Berdasarkan prosedur Stratmann (2015), rasio kuantitas bahan vaksin dengan CTB sebagai adjuvan adalah 5:1, sehingga 24 mg protein molekul adhesin dicampur dengan 4,8 mg CTB (konsentrasi CTB 500 µg/0,25 ml). Protein sebanyak 24 mg (10 ml) kemudian dicampur dengan PBS sebanyak 1,5 ml. Kemudian ditambahkan 1,5 ml PBS dan 3 ml 2% *glutaraldehyd*. Campuran bahan tersebut kemudian diaduk pada suhu 4°C selama 1 jam. Setelah diaduk, ditambahkan *glycine* pH 7,2 dengan volume 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 .

4.8.5 Vaksinasi Molekul Adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae*

Setelah masa aklimatisasi, mencit kelompok P1 dan P2 diberikan

vaksinasi secara oral dengan konsentrasi $250\ \mu\text{g}/0,1\ \text{ml}$. Periode

vaksinasi dilakukan selama 28 hari secara berkala yakni mulai hari ke-7,

14, 21, dan 28. Pemberian vaksin dilakukan menggunakan sonde.

4.8.6 Pembedahan Mencit dengan Metode MLIL

Setelah pemberian vaksin terakhir, mencit dieuthanasia dengan

disemprotkan klorofom dalam wadah tertutup. Setelah tidak terdapat

refleks kornea dan pergerakan dari keempat anggota gerak, mencit

diposisikan pada papan bedah menggunakan *pins*. Mencit dibedah mulai

dari bagian perut menggunakan gunting bengkok. Kemudian dilakukan

pemotongan usus empat cm dari distal lambung mencit dan empat cm

dari proksimal rektum. Selanjutnya bagian usus yang panjang tersebut

dibagi menjadi tiga bagian sama besar, kemudian dibersihkan dengan

larutan PBS. Selanjutnya, bagian tengah dari ketiga potongan tersebut

yang diinfeksi dengan *Shigella flexneri* maupun *Vibrio cholerae* selama

kurang lebih enam jam.

4.8.7 Pengukuran Kadar IL-17A

Setelah dilakukan pembedahan, dilakukan pengambilan sampel

darah pada jantung mencit. Sampel darah yang diambil ditampung dalam

vacutainer heparin. Kemudian, sampel darah disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 1.000 rpm dalam 30 menit. Supernatan kemudian digunakan sebagai sampel dalam prosedur ELISA.

Kemudian dilakukan pengukuran kadar IL-17A. Pertama-tama dilakukan persiapan reagen dalam suhu ruang. Reagen yang digunakan antara lain *Mouse IL-17A Detection Antibody*, *Mouse IL-17A Standard*, *Matrix A*, *Avidin-HRP A*, *Assay Buffer A*, *Wash Buffer (20X)*, *Substrate Solution F*, *Stop Solution*. Untuk melakukan pengukuran terhadap sampel berupa plasma, dilakukan penambahan 50 μL *Matrix A* ke dalam setiap *well* yang akan terisi *Standard Dilution*. Menambahkan 50 μL *Assay Buffer A* dalam setiap *well* yang akan terisi sampel. Kemudian menambahkan 50 μL *Standard Dilution* ke dalam setiap *well* yang sudah terisi *Matrix A*. Menambahkan 50 μL dari sampel plasma yang telah terdilusi ke dalam *well* yang mengandung *Assay Buffer A*.

Menutup *plate* dengan *plate sealer* yang sudah ada dalam kit dan diinkubasi selama dua jam dalam *shaker* dengan kecepatan 200 rpm pada suhu ruang. Setelah itu, pindahkan isi dalam *plate* ke dalam wadah steril. Melakukan aspirasi pada setiap *well* dan dicuci, mengulangi proses tersebut sebanyak empat kali. Mencuci dengan menggenangi tiap *well* dengan *Wash Buffer* (400 μL) menggunakan *autowasher*. Membuang liquid yang menggenangi *plate* dengan cara membalikkan *plate* kemudian mengeringkan sisa liquid dengan kertas tisu. Hindari terbentuknya gelembung dalam *plate*, bila terbentuk gelembung, lakukan aspirasi menggunakan pipet.

Selanjutnya, menambahkan 100 μL larutan *Mouse IL-17A Detection Antibody* ke dalam setiap *well*, menutup *plate* dan diinkubasi selama satu jam dalam *shaker* pada suhu ruang. Setelah itu, pindahkan

isi dalam *plate* ke dalam wadah steril dan mencuci *plate* seperti langkah sebelumnya sebanyak empat kali. Menambahkan 100 μ L larutan *Avidin-HRP A* ke dalam setiap *well*, menutup *plate* dan diinkubasi selama 30 menit dalam *shaker* pada suhu ruang. Setelah itu, pindahkan isi dalam *plate* ke dalam wadah steril dan mencuci *plate* seperti langkah sebelumnya sebanyak lima kali.

Kemudian tambahkan 100 μ L *Substrate Solution F* ke dalam setiap *well* dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan harus terlindung dari cahaya. *Well* yang mengandung *mouse IL-17A* akan berubah warna menjadi biru. Kemudian, tambahkan 100 μ L *Stop Solution* pada setiap *well* untuk menghentikan reaksi. Menentukan *optical density* pada setiap *well* dalam 30 menit, menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 450 nm.

4.8.8 Pengukuran Kadar *secretory-IgA*

Setelah dilakukan pembedahan, dilakukan pengumpulan sampel sekret mukosa usus dari setiap mencit dari bagian yang berbeda dari usus yang digunakan pada metode MLIL. Setelah dilakukan insisi secara longitudinal, dilakukan pembilasan isi usus mencit dengan PBS dingin, kemudian lapisan mukus usus dikerok menggunakan spatula dan ditempatkan ke dalam tabung *Eppendorf* yang berisi PBS dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm dalam suhu 40°C selama 10 menit. Supernatan kemudian digunakan sebagai sampel dalam prosedur

ELISA.

Kemudian dilakukan pengukuran kadar *secretory-IgA*. Pertama-tama dilakukan persiapan reagen dalam suhu ruang. Reagen yang digunakan antara lain *Reference standard*, *Concentrated biotinylated*

detection antibody, Concentrated HRP conjugate, Reference standard diluent dan sample diluent, Biotinylated detection antibody diluent, HRP conjugate diluent, Concentrated wash buffer, Substrate reagent, dan Stop solution.

Langkah pertama adalah menambahkan 100 μL larutan standard atau sampel ke dalam setiap *well*. Menutup *plate* dengan *plate sealer* yang disediakan dalam kit dan diinkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C. Memindahkan cairan dari masing-masing *well*, kemudian tambahkan 100 μL larutan *Biotinylated Detection Antibody* ke dalam setiap *well*. Menutup *plate* dengan *plate sealer* dan diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C. Melakukan aspirasi atau tuang larutan dari masing-masing *well*, tambahkan 350 μL *wash buffer* ke setiap *well* dan cuci sebanyak tiga kali.

Menambahkan 100 μL larutan *HRP Conjugate* ke masing-masing *well*. Menutup *plate* dengan *plate sealer* yang disediakan dalam kit dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Melakukan aspirasi atau tuang larutan dari masing-masing *well*, ulangi proses pencucian hingga lima kali seperti yang dilakukan pada langkah sebelumnya.

Menambahkan 90 μL *Substrate Reagent* ke dalam setiap *well*. Menutup *plate* dengan *plate sealer* yang disediakan dalam kit dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C di ruang gelap. Menambahkan 50 μL dari *Stop Solution* ke masing-masing *well*. Membaca *optical density* (OD) pada setiap *well* pada *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm.

4.8.9 Penghitungan Jumlah Koloni Bakteri

Metode ini dilakukan sebagai uji protektivitas vaksin. Setelah pembedahan, dilakukan pemotongan usus empat cm dari distal lambung mencit dan empat cm dari proksimal rektum. Bagian yang digunakan dalam metode ini berbeda dengan segmen yang digunakan pada pemeriksaan *secretory-IgA*. Selanjutnya bagian usus yang panjang tersebut dibagi menjadi tiga bagian sama besar, kemudian dibersihkan dengan larutan PBS.

Kedua ujung bagian usus yang telah dipotong kemudian diikat dengan benang. Pada kelompok model infeksi *Shigella flexneri* kemudian disuntikkan bakteri tersebut sejumlah satu ml bakteri (10^6 cfu/ml), sedangkan pada kelompok model infeksi *Vibrio cholerae* juga disuntikkan satu ml bakteri (10^7 cfu/loop). Setelah enam jam, dilakukan pengumpulan sekret mukosa usus dari setiap mencit dalam PBS steril dalam volume yang sama. Kemudian, 100 μ l suspensi homogenasi yang dihasilkan, masing-masing ditanam pada medium agar *MacConkey* dan TCBS. Agar diinkubasi selama 18-24 jam dalam suhu 37°C. Koloni yang tumbuh lalu diidentifikasi dan dihitung menggunakan *colony counter* (Setyorini, 2013).

4.9 Analisis Data

Pengambilan data dan analisis data dilakukan setelah fase penelitian.

Teknik pengolahan dan analisis data dilakukan dengan menggunakan program

Software Statistical Product and Service Solution (SPSS) versi 23 dengan tingkat

signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha =$

0,05). Pertimbangan menggunakan tingkat signifikansi 0,05 berkaitan dengan

ukuran sampel. Semakin kecil tingkat signifikansi maka peneliti akan

mempunyai tingkat signifikansi yang semakin besar. Sebaliknya semakin besar tingkat signifikansi maka peneliti akan membutuhkan data yang semakin kecil (Sarwono, 2013). Oleh karena itu, dalam penelitian ini digunakan tingkat signifikansi 0,05 karena sampel yang digunakan berskala kecil ($n=25$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut (Dahlan, 2014) :

a. Uji Normalitas : untuk menginterpretasikan suatu data apakah data memiliki distribusi data yang normal atau tidak, karena uji hipotesis tergantung pada normal atau tidaknya distribusi data. Apabila didapatkan distribusi data normal maka dilanjutkan sebagai uji parametrik. Namun, apabila distribusi data tidak normal maka digunakan uji non-parametrik.

Pada penelitian ini digunakan uji *Saphiro-Wilk* karena jumlah sampel penelitian kurang dari 50 ($n \leq 50$). Data dinyatakan memiliki distribusi normal bila $p > 0,05$.

b. Uji Homogenitas : untuk menentukan apakah distribusi beberapa set data memiliki varians yang homogen. Apabila didapatkan data memiliki varians homogen maka analisis data dilanjutkan dengan uji parametrik. Namun, apabila sebaran data tidak normal digunakan uji non-parametrik.

Pada penelitian ini digunakan uji varians *Levene's test*. Data dinyatakan memiliki varians homogen dengan nilai signifikansi $p > 0,05$.

c. Uji *Mann Whitney* : uji *Mann Whitney* merupakan uji non-parametrik yang digunakan pada parameter kadar IL-17A dan *secretory-IgA*. Uji ini dilakukan untuk menentukan perbedaan antara dua kelompok yang tidak berpasangan. Perbedaan dinyatakan bermakna bila nilai $p < 0,05$.

d. Uji *Kruskal Wallis* : uji *Kruskal Wallis* merupakan uji non-parametrik yang digunakan sebagai uji beda terhadap lebih dari dua kelompok data yang tidak berpasangan pada parameter jumlah koloni bakteri. Perbedaan pada kelompok data dinyatakan bermakna bila $p < 0,05$.

Kemudian untuk mengetahui antar perlakuan mana yang berbeda, dilakukan uji *Post Hoc Mann Whitney*, untuk menguji perbedaan rerata antara satu kelompok atau perlakuan dengan perlakuan lainnya.

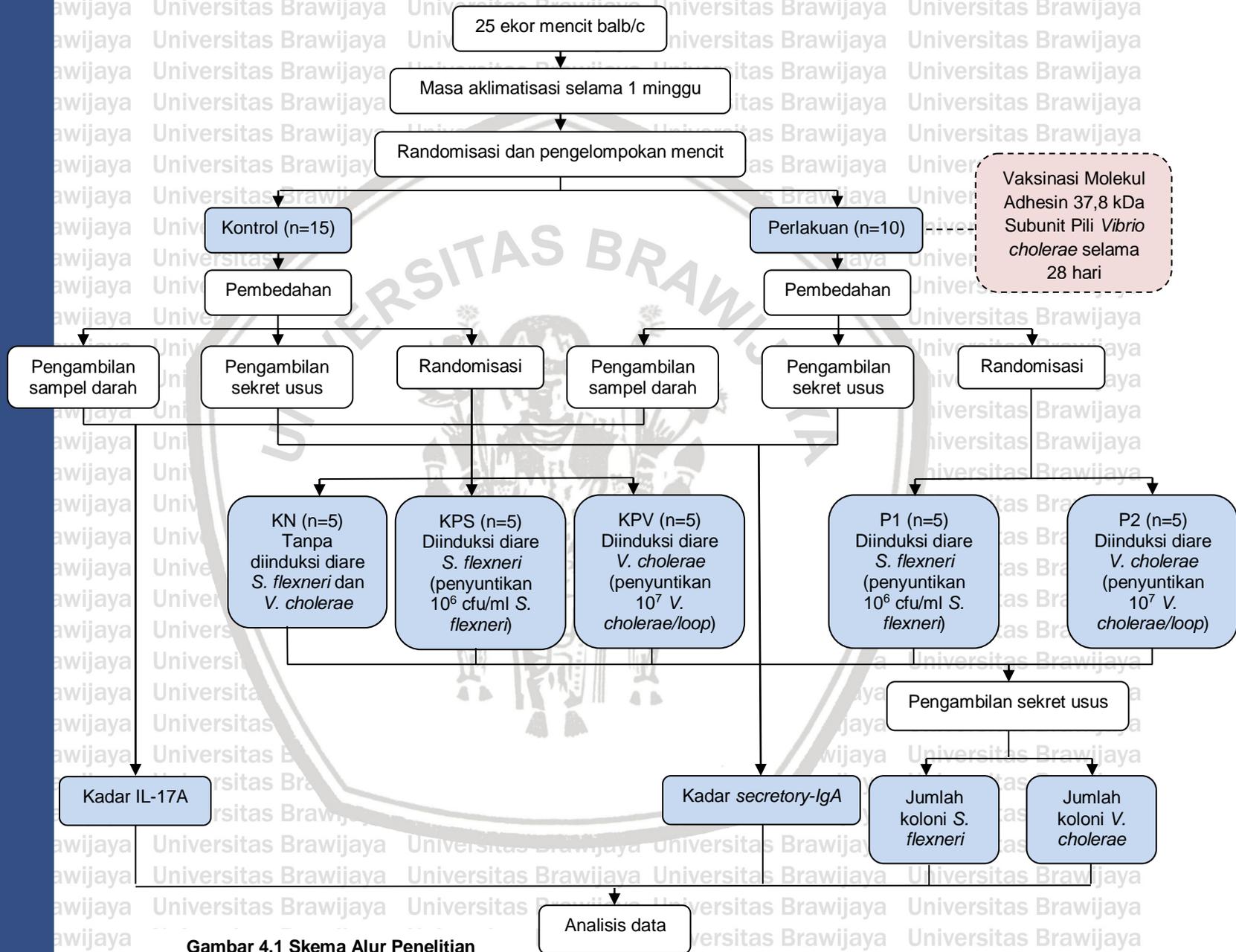
4.10 Alur Penelitian

Pada penelitian ini, jumlah sampel yang digunakan adalah 25 ekor mencit balb/c jantan. Setelah mengalami masa aklimatisasi selama satu minggu, mencit secara acak dikelompokkan menjadi dua, yaitu kelompok kontrol (n=15) dan kelompok perlakuan (n=10). Kelompok kontrol adalah mencit yang tidak mendapat vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae*, sedangkan kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat vaksinasi molekul adhesin secara oral selama 28 hari (hari ke-7, 14, 21, dan 28). Setelah periode vaksinasi selesai, mencit dikorbankan.

Pengambilan sampel darah mencit untuk pemeriksaan kadar IL-17A dilakukan pada kelompok kontrol dan perlakuan. Selanjutnya, dilakukan ligasi pada bagian usus mencit sesuai dengan metode yang telah dijelaskan sebelumnya, dan dilakukan pembagian segmen usus untuk parameter pengukuran yang berbeda. Terdapat segmen usus yang diambil sekret mukosanya untuk pemeriksaan kadar *secretory-IgA*. Kemudian, kelompok kontrol yang berjumlah 15 sampel dibagi lagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (KN), kontrol positif *Shigella* (KPS), kontrol positif *Vibrio* (KPV), dengan jumlah lima sampel pada masing-masing kelompok. Selain itu, kelompok perlakuan yang berjumlah 10 sampel, dibagi lagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok perlakuan 1 (diinfeksi *Shigella flexneri*) dan perlakuan 2 (diinfeksi *Vibrio cholerae*). Selanjutnya, dari kelima kelompok tersebut, akan dilakukan pengambilan sekret mukosa usus untuk dikultur pada medium agar dan

selanjutnya akan dilakukan pemeriksaan hitung jumlah koloni bakteri. Seluruh data yang telah diperoleh kemudian dianalisis menggunakan software SPSS.





Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian

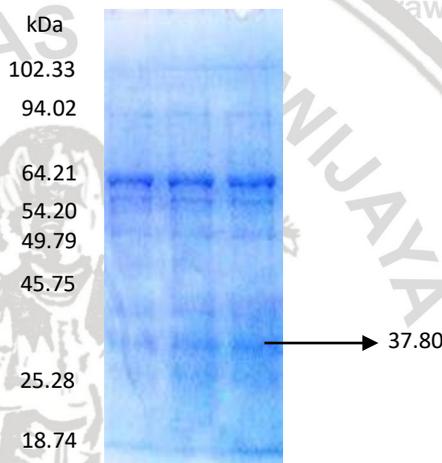
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil *Profiling* Pili *Vibrio cholerae* dengan SDS-PAGE

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



Gambar 5.1 Hasil SDS-PAGE protein subunit pili *Vibrio cholerae*.

Berdasarkan hasil SDS-PAGE didapatkan protein dengan berat molekul 37,8 kDa yang berasal dari subunit pili *Vibrio cholerae*.

Bakteri *Vibrio cholerae* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dikultur dalam medium selektif TCBS. Kemudian, untuk memperbanyak pertumbuhan pili maka digunakan medium TCG. Selanjutnya, hasil kultur dari medium TCG dilakukan isolasi pili menggunakan *pili cutter* desain Sumarno. Setelah dilakukan isolasi pili, maka dilakukan *profiling* menggunakan SDS-PAGE untuk mengidentifikasi profil suatu protein berdasarkan perbedaan berat molekulnya dari pili *Vibrio cholerae*. Berdasarkan hasil

SDS-PAGE, diperoleh profil protein dengan densitas pita yang paling tebal pada 37,8 kDa.

Hasil elektroforesis berupa protein subunit pili dengan berat molekul 37,8 kDa tersebut selanjutnya digunakan sebagai bahan untuk vaksinasi mencit.

5.1.2 Hasil Pengukuran Kadar IL-17A pada Darah Mencit Balb/c

Pasca Vaksinasi

Interleukin-17A (IL-17A) merupakan salah satu subset sitokin pro-inflamasi yang dihasilkan oleh sel Th17 yang dapat bersifat protektif terhadap infeksi bakteri. Untuk mengetahui efek dari vaksinasi terhadap respon imun sistemik, kadar IL-17A yang berasal dari sampel darah mencit diukur setelah periode vaksinasi dengan molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* selama 28 hari selesai dilakukan.

Tabel 5.1 Rerata Kadar IL-17A pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan (pg/mL)

Mencit	Kelompok Kontrol	Kelompok Perlakuan
1	1374,76	1762,29
2	1857,33	1746,19
3	405,9	3326,48
4	545,43	3066,48
5	1306,48	1835,81
6	1496,57	2149,71
7	296,48	1755,33
8	1744,76	2068,86
9	1700	1844
10	1749,9	1850,29
11	1698,09	
12	1852,09	
13	816,67	
14	1892,85	
15	1870,19	
Rerata ± SD	1373,83 ± 572	2140,54 ± 575,52

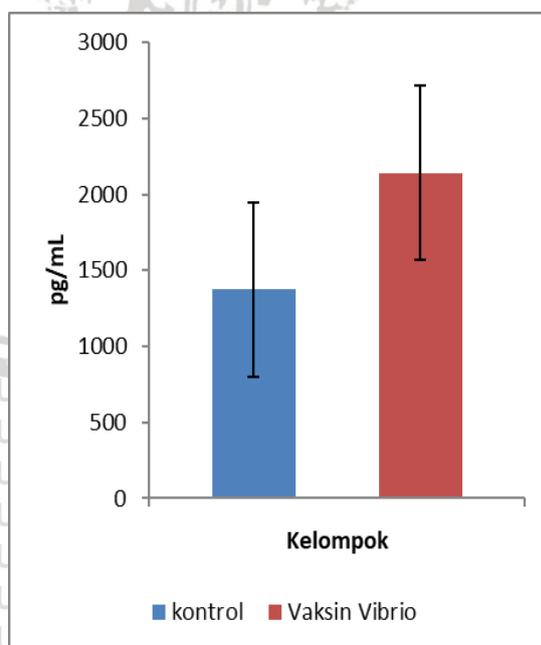
Tabel 5.1 menunjukkan rerata kadar IL-17A pada kelompok kontrol maupun perlakuan.



Dapat dilihat bahwa pada kelompok kontrol didapatkan rerata kadar IL-17A adalah 1373,83 pg/mL dengan SD 572 pg/mL. Sedangkan, pada kelompok perlakuan yang diberikan vaksinasi dan adjuvan CTB didapatkan rerata kadar IL-17A adalah 2140,54 pg/mL dengan SD 575,52 pg/mL.

Pada penelitian ini, kelompok kontrol berjumlah total 15 sampel, sedangkan pada kelompok perlakuan berjumlah total 10 sampel. Perbedaan jumlah sampel pada kedua kelompok tersebut berdasarkan pada hasil penghitungan besarnya pengulangan pada sampel menggunakan rumus Federrer. Berdasarkan rumus tersebut, jumlah minimal mencit yang digunakan dalam tiap kelompok adalah lima ekor.

Sedangkan, setelah dilakukan pembedahan, kelompok kontrol akan dibagi lagi menjadi kelompok kontrol negatif (KN), kontrol positif *Shigella* (KPS), dan kontrol positif *Vibrio* (KPV) untuk dilakukan metode MLIL, sehingga dibutuhkan jumlah total 15 sampel pada kelompok kontrol. Begitu juga, pada kelompok perlakuan akan dibagi lagi menjadi kelompok perlakuan 1 dan perlakuan 2 untuk dilakukan metode MLIL, sehingga dibutuhkan jumlah total 10 sampel pada kelompok perlakuan.



Gambar 5.2. Grafik kadar IL-17A.

Kadar IL-17A dari kelompok kontrol dan kelompok yang divaksinasi molekul adhesin *Vibrio*. Setelah periode vaksinasi selesai, sampel darah mencit balb/c dikumpulkan dan diukur dengan metode ELISA. Data direpresentasikan sebagai rerata \pm SD.

Berdasarkan hasil pengukuran dengan metode ELISA, diperoleh data bahwa mencit yang divaksinasi dengan molekul adhesin menghasilkan kadar IL-17A yang tinggi secara signifikan ($2140,54 \pm 575,52$ pg/mL) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol ($1373,83 \pm 572$ pg/mL) ($p=0,006$). Hal tersebut menunjukkan bahwa vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dapat meningkatkan respon imun melalui produksi sitokin pro-inflamasi IL-17A sebagai sitokin yang bersifat protektif terhadap patogen yang menyerang epitel dan mukosa.

5.1.3 Hasil Pengukuran Kadar *secretory-IgA* pada Sekret Usus Mencit Balb/c Pasca Vaksinasi

Secretory-IgA (s-IgA) merupakan imunoglobulin yang diproduksi dalam jaringan limfoid mukosa, kemudian diangkut melalui epitel oleh pIgR dan ditranspor ke permukaan lumen usus. *Secretory-IgA* berperan sebagai imunoglobulin-spesifik antigen yang merupakan komponen penting dari imunitas pada mukosa. Kadar *secretory-IgA* dalam penelitian ini diamati pada sekret mukosa usus mencit balb/c yang telah divaksinasi per oral dengan molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae*.

Pada penelitian ini, kelompok kontrol berjumlah total 15 sampel, sedangkan pada kelompok perlakuan berjumlah total 10 sampel. Perbedaan jumlah sampel pada kedua kelompok tersebut berdasarkan pada hasil penghitungan besarnya pengulangan pada sampel menggunakan rumus Federrer. Berdasarkan rumus tersebut, jumlah minimal mencit yang digunakan dalam tiap kelompok adalah lima ekor.

Sedangkan, setelah dilakukan pembedahan, kelompok kontrol akan dibagi lagi menjadi kelompok kontrol negatif (KN), kontrol positif *Shigella*

(KPS), dan kontrol positif *Vibrio* (KPV) untuk dilakukan metode MLIL, sehingga dibutuhkan jumlah total 15 sampel pada kelompok kontrol.

Begitu juga, pada kelompok perlakuan akan dibagi lagi menjadi kelompok perlakuan 1 dan perlakuan 2 untuk dilakukan metode MLIL, sehingga dibutuhkan jumlah total 10 sampel pada kelompok perlakuan.

Tabel 5.2 Rerata Kadar *secretory-IgA* pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan ($\mu\text{g/mL}$)

Mencit	Kelompok Kontrol	Kelompok Perlakuan
1	3,88	3,2
2	2,6	4,6
3	2,83	3,4
4	5,52	4
5	2,4	3,2
6	3,48	3,62
7	2,87	3,45
8	2,05	3,76
9	2,77	3,54
10	4,01	3,37
11	3,19	
12	2,74	
13	3,47	
14	3,15	
15	2,92	
Rerata \pm SD	3,19 \pm 0,83	3,61 \pm 0,42

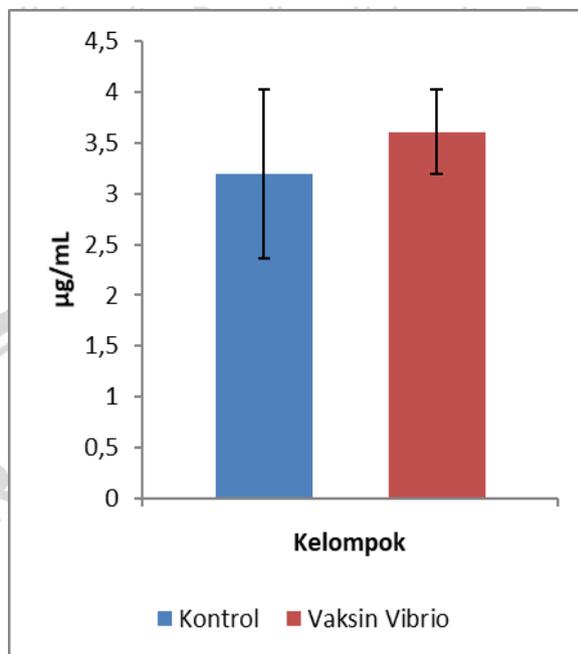
Tabel 5.2 menunjukkan rerata kadar *secretory-IgA* pada kelompok kontrol maupun perlakuan.

Dapat dilihat bahwa pada kelompok kontrol didapatkan rerata kadar *secretory-IgA* adalah 3,19 $\mu\text{g/mL}$ dengan SD 0,83 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan, pada kelompok perlakuan yang diberikan vaksinasi dan adjuvan CTB didapatkan rerata kadar *secretory-IgA* adalah 3,61 $\mu\text{g/mL}$ dengan SD 0,42 $\mu\text{g/mL}$.

Berdasarkan hasil pengukuran dengan metode ELISA, diperoleh data bahwa mencit yang divaksinasi dengan molekul adhesin mengalami peningkatan kadar s-IgA secara kuantitatif (3,61 \pm 0,42 $\mu\text{g/mL}$) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (3,19 \pm 0,83 $\mu\text{g/mL}$). Hal tersebut menunjukkan bahwa vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dapat meningkatkan respon imun mukosa melalui s-IgA sebagai antibodi yang paling banyak disekresikan di mukosa usus dan



berperan dalam netralisasi serta pembersihan patogen ekstraseluler dengan mencegah adhesi dan akses patogen tersebut ke permukaan epitel.



Gambar 5.3 Grafik kadar secretory-IgA.

Kadar secretory-IgA dari kelompok kontrol dan kelompok yang divaksinasi molekul adhesin *Vibrio*. Setelah periode vaksinasi selesai, sekret mukosa usus mencit balb/c dikumpulkan dan diukur dengan metode ELISA. Data direpresentasikan sebagai rerata \pm SD.

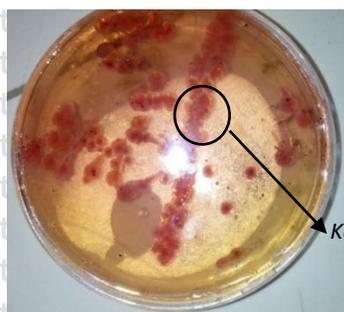
5.1.4 Hasil Penghitungan Jumlah Koloni

Pada penelitian ini, mencit divaksinasi dengan molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* pada hari ke-7, 14, 21, dan 28.

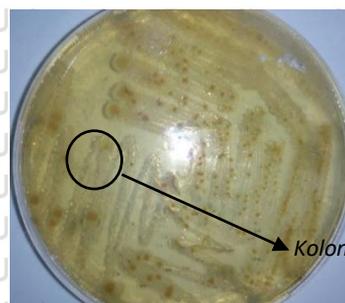
Setelah itu, dilakukan pembedahan pada mencit dengan insisi abdominal dan dilakukan isolasi usus menggunakan metode MLIL. Kemudian, masing-masing potongan segmen usus yang berbeda diinokulasi dengan *Shigella flexneri* dan *Vibrio cholerae*. Setelah itu, dilakukan pengumpulan sekret mukosa usus mencit untuk dikultur pada medium agar. Koloni yang tumbuh lalu diidentifikasi dan dihitung menggunakan colony counter (Setyorini, 2013).

Secara taksonomi, *Shigella* termasuk dalam Famili *Enterobacteriaceae*. Isolasi koloni *Shigella* dapat menggunakan berbagai macam medium agar, misalnya *xylose-lysine-deoxycholate* (XLD), *Salmonella-Shigella* (SS), dan *MacConkey* (Morris, *et al.*, 1970). Pada penelitian ini, digunakan medium agar *MacConkey* untuk mengisolasi koloni *Shigella*. Agar *MacConkey* dipilih sebagai medium kultur karena merupakan medium kultur selektif dan diferensial yang sering digunakan untuk isolasi bakteri enterik Gram negatif. Agar *MacConkey* merupakan medium yang selektif untuk organisme Gram negatif dan dapat membedakan batang Gram negatif yang memfermentasi laktosa dan yang tidak memfermentasi laktosa. Jika laktosa difermentasi oleh bakteri, maka produksi asam akan menurunkan pH pada medium agar. Penurunan pH ditunjukkan oleh perubahan indikator merah netral menjadi merah muda (merah netral tampak menjadi merah muda pada pH <6,8). Bakteri Gram negatif yang tumbuh pada agar *MacConkey* tetapi tidak memfermentasi laktosa tampak tidak berwarna pada medium dan agar yang mengelilingi bakteri tetap relatif transparan (Levinson, W., 2014; Tankeshwar, 2019).

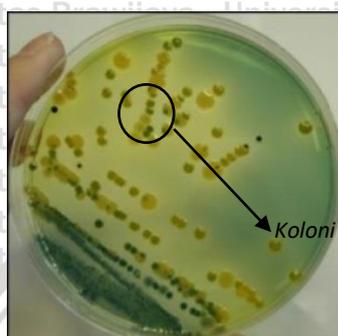
Medium agar TCBS digunakan untuk mengisolasi *Vibrio cholerae* berdasarkan kemampuan memfermentasi sukrosa yang terdeteksi melalui indikator pH dan produksi H₂S dari *thiosulfate* dengan membentuk besi sulfida berwarna kehitaman dari *ferric citrate*. Koloni *Vibrio* biasanya berwarna kuning dengan diameter 1-3 mm pada medium agar TCBS (Corry, *et al.*, 2003). Hasil kultur dari sekret mukosa usus mencing pada setiap kelompok ditampilkan pada gambar 5.4.



A. Kontrol Negatif



B. Kontrol Positif *Shigella*



C. Kontrol Positif *Vibrio*



D. Kelompok infeksi *Shigella*-vaksinasi *Vibrio*



E. Kelompok infeksi *Vibrio*-vaksinasi *Vibrio*

Gambar 5.4 Hasil kultur dari sekret mukosa usus menciit pada setiap kelompok perlakuan.

Setelah dilakukan metode MLIL, dilakukan pengumpulan sekret mukosa usus dan dikultur pada medium agar *MacConkey* untuk kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif *Shigella*, dan kelompok infeksi *Shigella*-vaksinasi *Vibrio*. Kelompok kontrol positif *Vibrio* dan kelompok infeksi *Vibrio*-vaksinasi *Vibrio* dikultur pada medium agar TCBS. Pada medium agar *MacConkey*, tampak pertumbuhan koloni *E.coli* berwarna merah muda, sedangkan koloni *Shigella flexneri* tidak berwarna. Ketika dikonfirmasi dengan pengecatan Gram, didapatkan gambaran bakteri batang Gram negatif pada koloni yang berwarna merah muda dan koloni yang tidak berwarna. Pada medium TCBS, koloni *Vibrio cholerae* tampak berwarna kuning.

Keterangan: A: Kontrol Negatif; B: Kontrol Positif *Shigella*; C: Kontrol Positif *Vibrio*; D: Kelompok infeksi *Shigella*-vaksinasi *Vibrio*; E: Kelompok infeksi *Vibrio*-vaksinasi *Vibrio*.

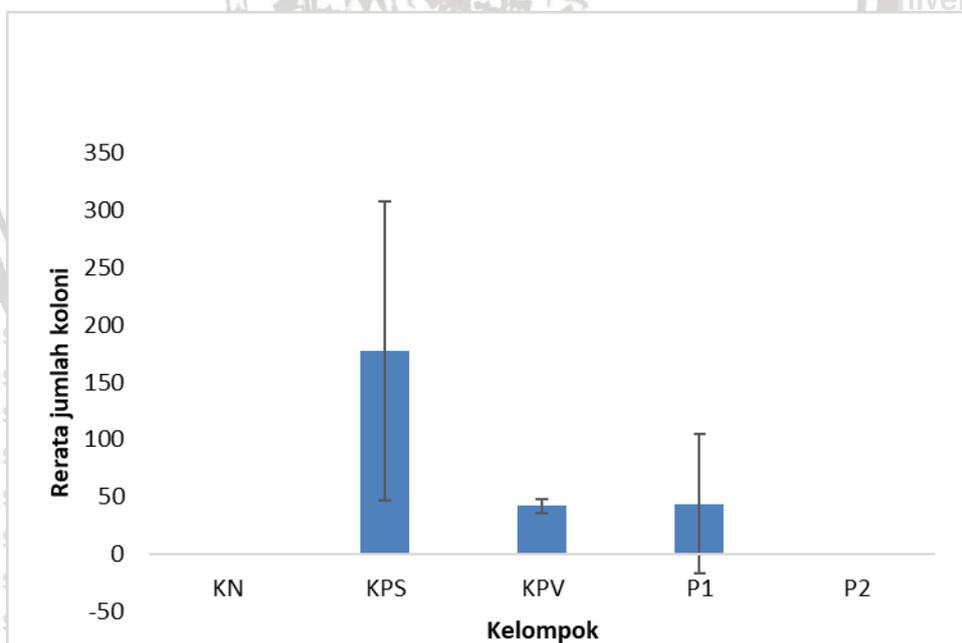
Tabel 5.3 Rerata Hitung Jumlah Koloni (cfu)

Kelompok	Rerata Jumlah Koloni	SD
KN	0	0
KPS	177,2	130,6
KPV	42	6,3
P1	44	60,25
P2	0	0

Tabel 5.3 menunjukkan rerata hitung jumlah koloni pada kelompok kontrol maupun perlakuan.

Dapat dilihat bahwa pada kelompok kontrol negatif didapatkan rerata hitung jumlah koloni adalah 0 cfu dengan SD 0 cfu. Hal tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat koloni *Shigella flexneri* pada hasil kultur di medium agar MacConkey. Kemudian, pada kelompok KPS, didapatkan rerata hitung jumlah koloni adalah 177,2 cfu dengan SD 130,6 cfu, sehingga menunjukkan bahwa sebaran data pada kelompok KPS tidak homogen. Pada kelompok KPV didapatkan rerata hitung jumlah koloni adalah 42 cfu dengan SD 6,3 cfu, sehingga menunjukkan bahwa sebaran data pada kelompok KPV homogen. Pada kelompok P1, didapatkan rerata hitung jumlah koloni adalah 44 cfu dengan SD 60,25, sehingga menunjukkan bahwa sebaran data pada kelompok P1 tidak homogen. Pada kelompok P2, didapatkan rerata hitung jumlah koloni adalah 0 cfu dengan SD 0 cfu. Hal tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat koloni *Shigella flexneri* pada hasil kultur di medium agar MacConkey.

Keterangan: KN: Kontrol Negatif; KPS: Kontrol Positif *Shigella*; KPV: Kontrol Positif *Vibrio*; P1: Infeksi *Shigella*-vaksinasi *Vibrio*; P2: Infeksi *Vibrio*-vaksinasi *Vibrio*.



Gambar 5.5 Grafik hasil hitung jumlah koloni pada kelompok kontrol dan perlakuan.

Jumlah koloni setelah 28 hari dilakukan vaksinasi. Data direpresentasikan sebagai rerata±SD. KN: Kontrol negatif; KPS: Kontrol Positif *Shigella*; KPV: Kontrol Positif *Vibrio*; P1: Infeksi *Shigella*-vaksinasi *Vibrio*; P2: Infeksi *Vibrio*-vaksinasi *Vibrio*.

Hasil hitung jumlah koloni menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p=0,005$) antara kelompok yang divaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dan kemudian diinfeksi *Vibrio cholerae* bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif *Vibrio*. Hal tersebut menunjukkan bahwa vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dapat menghambat proses adhesi bakteri pada epitel usus mencit sehingga terjadi penurunan pada hasil hitung jumlah koloni bakteri *Vibrio cholerae* pada medium agar TCBS. Sedangkan, perbandingan jumlah koloni antara kelompok P1 dengan KPS menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan secara statistik ($p=0,129$). Hal tersebut tidak sesuai dengan harapan peneliti bahwa vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dapat menurunkan jumlah koloni bakteri pada kultur sekret usus mencit yang telah diinfeksi *Shigella flexneri*.

5.2 Analisis Data

5.2.1 Analisis Data Kadar IL-17A pada Darah Mencit Balb/c Pasca

Vaksinasi

Pengambilan dan analisis data dilakukan setelah fase penelitian. Teknik pengolahan dan analisis data dilakukan dengan menggunakan program *Software Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi 23. Sebelum ditentukan apakah hasil penelitian akan diuji dengan uji parametrik atau non-parametrik, terlebih dahulu dilakukan uji untuk menentukan normalitas dan homogenitas data.

Uji normalitas dilakukan untuk menginterpretasikan suatu data apakah data memiliki distribusi yang normal atau tidak, karena uji

hipotesis tergantung pada normal atau tidaknya distribusi data. Apabila didapatkan distribusi data normal, maka dilanjutkan dengan uji parametrik. Namun apabila distribusi data tidak normal, maka digunakan uji non-parametrik. Pada penelitian ini, uji normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk* karena jumlah sampel penelitian kurang dari 50 ($n \leq 50$). Data dinyatakan memiliki distribusi normal bila $p > 0,05$. Kemudian, untuk menentukan apakah distribusi beberapa set data memiliki varians yang homogen, dilakukan uji homogenitas menggunakan uji varians *Levene's*. Suatu data dinyatakan memiliki varians homogen bila $p > 0,05$.

Hasil uji normalitas *Saphiro-Wilk* menunjukkan data hasil kadar IL-17A pada kelompok kontrol $p = 0,005$ dan kelompok perlakuan $p = 0,001$, sehingga dapat disimpulkan bahwa distribusi data tidak normal ($p < 0,05$). Kemudian, dilanjutkan dengan uji homogenitas menggunakan uji varians *Levene's* untuk parameter IL-17A menunjukkan varians data homogen dengan nilai $p = 0,757$ ($p > 0,05$). Berdasarkan hasil uji normalitas menunjukkan data hasil penelitian kadar IL-17A tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji parametrik, sehingga untuk menguji beda antar kelompok kontrol dan perlakuan pada parameter IL-17A menggunakan uji non-parametrik yaitu uji *Mann Whitney*.

Uji *Mann Whitney* dilakukan untuk menentukan perbedaan antara dua kelompok yang tidak berpasangan pada parameter kadar IL-17A. Perbedaan dinyatakan bermakna bila $p < 0,05$. Hipotesis dalam uji *Mann Whitney* ditentukan melalui pengujian H_0 dan H_1 . H_0 dari penelitian ini adalah tidak ada pengaruh pada vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* terhadap kadar IL-17A. Sedangkan H_1 adalah kebalikan dari H_0 yaitu ada pengaruh pada vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* terhadap kadar IL-17A. Jika nilai

signifikansi atau *Asymp. Sig. (2-tailed)* lebih kecil dari probabilitas 0,05 maka hipotesis H1 diterima.

Berdasarkan hasil uji *Mann-Whitney* untuk data pengukuran kadar IL-17A pada kelompok kontrol dan perlakuan, didapatkan nilai signifikansi $p=0,006$. Hal ini menunjukkan terdapat beda signifikan antara hasil pengukuran kadar IL-17A pada kelompok kontrol dan perlakuan.

Hal ini menunjukkan bahwa vaksinasi molekul adhesin sebanyak empat kali selama 28 hari dapat meningkatkan diferensiasi subset sel T-helper, salah satunya sel Th17, sehingga dapat terjadi peningkatan produksi dari sitokin pro-inflamasi IL-17A sebagai respon terhadap antigen dari vaksin yang masuk ke dalam tubuh.

5.2.2 Analisis Data Kadar *secretory-IgA* pada Sekret Usus Mencit

Balb/c Pasca Vaksinasi

Hasil uji normalitas dengan *Saphiro-Wilk* menunjukkan data hasil kadar *secretory-IgA* pada kelompok kontrol $p=0,043$ dan kelompok perlakuan $p=0,074$, sehingga dapat disimpulkan distribusi data tidak normal ($p<0,05$). Kemudian, dilanjutkan dengan uji homogenitas menggunakan uji varians *Levene's* untuk parameter *secretory-IgA* menunjukkan varians data homogen dengan nilai $p=0,161$ ($p>0,05$).

Berdasarkan hasil uji normalitas menunjukkan data hasil penelitian kadar *secretory-IgA* tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji parametrik, sehingga untuk menguji beda antar kelompok kontrol dan perlakuan pada parameter *secretory-IgA* menggunakan uji non-parametrik yaitu uji *Mann-Whitney*.

Uji *Mann-Whitney* dilakukan untuk menentukan perbedaan antara dua kelompok yang tidak berpasangan pada parameter kadar *secretory-*

IgA. Perbedaan dinyatakan bermakna bila $p < 0,05$. Hipotesis dalam uji *Mann Whitney* ditentukan melalui pengujian H_0 dan H_1 . H_0 dari penelitian ini adalah tidak ada pengaruh pada vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* terhadap kadar *secretory-IgA*. Sedangkan H_1 adalah kebalikan dari H_0 yaitu ada pengaruh pada vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* terhadap kadar *secretory-IgA*. Jika nilai signifikansi atau *Asymp. Sig. (2-tailed)* lebih kecil dari probabilitas 0,05 maka hipotesis H_1 diterima.

Berdasarkan hasil uji *Mann Whitney* untuk data pengukuran kadar *secretory-IgA* pada kelompok kontrol dan perlakuan, didapatkan nilai signifikansi $p = 0,035$. Hal ini menunjukkan terdapat beda signifikan antara hasil pengukuran kadar *secretory-IgA* pada kelompok kontrol dan perlakuan.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dapat meningkatkan kadar *secretory-IgA* pada sekret mukosa usus mencit setelah dilakukan vaksinasi. Hal ini menunjukkan bahwa melalui induksi IL-17A terhadap *polymeric immunoglobulin receptor* (pIgR) yang ada di basolateral dari sel epitel usus, terjadi peningkatan transpor *secretory-IgA* ke dalam lumen usus untuk meningkatkan fungsi sistem pertahanan mukosa saluran pencernaan.

5.2.3 Analisis Data Penghitungan Jumlah Koloni

Hasil uji normalitas dengan *Saphiro-Wilk* menunjukkan data hasil hitung jumlah koloni pada kelompok KPS $p = 0,051$; KPV $p = 0,468$; P1 $p = 0,013$, sehingga dapat disimpulkan distribusi data tidak normal ($p < 0,05$). Kemudian, dilanjutkan dengan uji homogenitas menggunakan

uji varians *Levene's* untuk parameter jumlah koloni menunjukkan varians data tidak homogen dengan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$).

Berdasarkan hasil uji normalitas menunjukkan data hasil penelitian kadar jumlah koloni tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji parametrik, sehingga untuk menguji beda antar kelompok kontrol dan perlakuan pada parameter jumlah koloni menggunakan uji non-parametrik yaitu uji *Kruskal Wallis*. Kemudian untuk mengetahui antar perlakuan mana yang berbeda, maka diperlukan uji *Post Hoc Mann Whitney*, untuk menguji perbedaan *mean* antara satu kelompok perlakuan dengan perlakuan lainnya.

Uji *Kruskal Wallis* dilakukan sebagai uji beda terhadap lebih dari dua kelompok data yang tidak berpasangan dengan distribusi data tidak normal pada parameter jumlah koloni bakteri. Perbedaan pada dua kelompok dinyatakan bermakna bila $p<0,05$. Hipotesis dalam uji *Kruskal Wallis* ditentukan melalui pengujian H_0 dan H_1 . H_0 dari penelitian ini adalah tidak ada pengaruh pada vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* terhadap jumlah koloni bakteri. Sedangkan H_1 adalah kebalikan dari H_0 yaitu ada pengaruh pada vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* terhadap jumlah koloni bakteri. Jika nilai signifikansi atau *Asymp. Sig.* lebih kecil dari probabilitas 0,05 maka hipotesis H_1 diterima.

Berdasarkan hasil uji *Kruskal Wallis* untuk data hitung jumlah koloni bakteri pada kelompok kontrol dan perlakuan, didapatkan nilai signifikansi $p=0,008$. Hal ini sesuai dengan harapan bahwa vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dapat menurunkan jumlah koloni bakteri pada kultur sekret mukosa usus mencit yang telah diinfeksi *Shigella* maupun *Vibrio*.

Kemudian, untuk mengetahui antar perlakuan mana yang berbeda, dilakukan uji *Post Hoc Mann Whitney*. Di bawah ini merupakan tabel ringkasan hasil uji analisis antar perlakuan (Tabel 5.4).

Tabel 5.4 Ringkasan Hasil Uji *Mann Whitney*

Perlakuan	Sig.	Interpretasi Data
KPS dan KN	0,018	Jumlah koloni <i>Shigella flexneri</i> naik secara signifikan
KPV dan KN	0,005	Jumlah koloni <i>Vibrio cholerae</i> naik secara signifikan
P1 dan KPS	0,129	Jumlah koloni <i>Shigella flexneri</i> pada perlakuan dengan vaksinasi dibandingkan kontrol positif <i>Shigella</i> tidak berbeda bermakna secara statistik
P2 dan KPV	0,005	Jumlah koloni <i>Vibrio cholerae</i> pada perlakuan dengan vaksinasi dibandingkan kontrol positif <i>Vibrio</i> berbeda bermakna secara statistik
P1 dan P2	0,134	Jumlah koloni <i>Shigella flexneri</i> maupun <i>Vibrio cholerae</i> pada perlakuan dengan vaksinasi tidak berbeda bermakna secara statistik

Tabel 5.4 menunjukkan hasil uji *Mann Whitney* pada tiap kelompok perlakuan. Dapat dilihat bahwa perbandingan jumlah koloni pada kelompok KPS dengan KN memiliki signifikansi $p=0,018$. Perbandingan jumlah koloni pada kelompok KPV dan KN memiliki signifikansi $p=0,005$. Perbandingan jumlah koloni pada kelompok P1 dan KPS memiliki signifikansi $p=0,129$. Perbandingan jumlah koloni pada kelompok P2 dan KPV memiliki signifikansi $p=0,005$. Sedangkan, perbandingan jumlah koloni pada kelompok P1 dan P2 memiliki signifikansi $p=0,134$.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Vaksinasi Molekul Adhesin 37,8 kDa Subunit Pili *Vibrio**cholerae* terhadap Kadar IL-17A

Dalam penelitian ini, dilakukan evaluasi respon imun melalui produksi sitokin pro-inflamasi (IL-17A) pasca vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* secara oral terhadap mencit balb/c. Hasil pemeriksaan kadar IL-17A pada darah mencit balb/c pasca vaksinasi molekul adhesin sebanyak empat kali selama 28 hari menunjukkan adanya peningkatan secara signifikan ($p=0,006$) dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Sel Th17 merupakan salah satu subset limfosit T CD4⁺ yang memiliki efek protektif terhadap mukosa serta mempertahankan *barrier* epitel mukosa terhadap infeksi (Levinson, W., 2014). Salah satu sitokin yang dihasilkan oleh sel Th17 sebagai respon terhadap inflamasi adalah IL-17. Interleukin-17 dihasilkan melalui peningkatan ekspresi ROR γ t dan ROR α oleh faktor transkripsi STAT3 setelah diaktivasi oleh IL-6 dan TGF- β (Korn, *et al.*, 2009). Interleukin-17 terdiri dari enam subunit yaitu dari IL-17A hingga IL-17F (Jin & Dong, 2013). Namun, IL-17A diketahui 10-30 kali lipat lebih poten dan bersifat protektif terhadap patogen yang menyerang epitel dan mukosa (Khirkam, *et al.*, 2014; Shabgah, *et al.*, 2014).

Peningkatan secara signifikan terhadap kadar IL-17A pasca vaksinasi molekul adhesin menunjukkan bahwa vaksin molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dapat menjadi kandidat vaksin yang diberikan secara oral karena mampu menginduksi produksi IL-17A sebagai sitokin pro-inflamasi yang bersifat protektif dalam respon imun mukosa saluran pencernaan.

6.2 Pengaruh Vaksinasi Molekul Adhesin 37.8 kDa Subunit Pili *Vibrio cholerae* terhadap Kadar *secretory-IgA*

Hasil pengukuran kadar s-IgA pada sekret mukosa usus mencit pasca vaksinasi memiliki signifikansi $p=0,035$, yang menunjukkan terdapat beda yang signifikan antara hasil pengukuran kadar s-IgA pada mencit balb/c kontrol dan mencit balb/c yang diberi perlakuan.

Secretory-IgA (s-IgA) merupakan kelas antibodi yang diproduksi oleh sel plasma yang berada di lamina propria dan spesifik untuk mukosa. *Secretory-IgA* berperan dalam perlindungan melawan patogen enterik dengan mengikat molekul permukaan yang diekspresikan oleh patogen serta menetralkan toksinnya (Perez-lopez, *et al.*, 2016). Diproduksi oleh sel-sel plasma di mukosa, sekresi IgA bergantung pada transportasi melintasi epitel usus, yang diperantarai oleh suatu reseptor Fc spesifik, yang disebut *polymeric immunoglobulin receptor* (plgR), yang diekspresikan pada permukaan basolateral sel-sel epitel. Reseptor ini mengikat IgA, memasukkannya ke dalam vesikel, dan membawanya ke permukaan lumen. Di sini, reseptor dipecah oleh suatu protease, dan IgA dilepaskan ke dalam lumen dengan masih membawa bagian dari reseptor poli-Ig yang terikat (komponen sekretorik). Komponen sekretorik yang terbawa akan melindungi antibodi dari degradasi oleh protease usus. Ekspresi plgR sangat penting untuk perlindungan yang diperantarai IgA. Sel-sel Th17 mendorong translokasi IgA melintasi epitel usus melalui induksi plgR oleh IL-17 (Cao, *et al.*, 2012; Abbas, *et al.*, 2016). Oleh karena itu, s-IgA merupakan parameter yang penting untuk dievaluasi pada sistem imun mukosa pasca vaksinasi per oral dengan molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae*.

Infeksi dan transmisi penyakit antar individu dari sebagian besar patogen yang menyerang mukosa dapat secara efektif dikendalikan oleh vaksinasi melalui mukosa (Czerkinsky & Holmgren, 2010). Mekanisme imunitas pada

mukosa usus terhadap infeksi salah satunya diperankan oleh aktivasi imunitas yang mengarah pada produksi *secretory-IgA* (Perez-lopez, *et al.*, 2016).

Salah satu alasan yang lebih penting untuk pengembangan vaksinasi melalui mukosa adalah meningkatnya bukti bahwa respon imun mukosa lokal berperan penting untuk perlindungan terhadap penyakit, terutama untuk infeksi yang dimulai pada permukaan mukosa (Borges, *et al.*, 2009). Sehingga, untuk mencegah infeksi patogen saluran cerna, diperlukan bahan dan cara pemberian vaksin yang mampu mencetuskan respon imun lokal pada mukosa usus, salah satunya dengan menginduksi sekresi s-IgA.

Peningkatan secara signifikan terhadap kadar s-IgA pasca vaksinasi molekul adhesin menunjukkan bahwa vaksinasi dengan molekul adhesin dapat meningkatkan produksi s-IgA dalam lumen usus, yang sinergis dengan peningkatan produksi sitokin pro-inflamasi IL-17A, yang diketahui berperan sebagai faktor penginduksi peningkatan sekresi s-IgA ke dalam lumen usus melalui pIgR.

6.3 Pengaruh Vaksinasi Molekul Adhesin 37.8 kDa Subunit Pili *Vibrio cholerae* terhadap Jumlah Koloni Bakteri

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh vaksinasi molekul adhesin pada kelompok mencit balb/c yang diinfeksi *Shigella flexneri* dan *Vibrio cholerae* melalui uji protektivitas vaksin dengan parameter jumlah koloni bakteri. Hasil uji *Kruskal Wallis* pada kelompok kontrol dan perlakuan menunjukkan beda yang signifikan ($p=0,008$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat pengaruh pada vaksinasi molekul adhesin 37.8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* terhadap jumlah koloni bakteri. Penurunan jumlah koloni bakteri pada media agar menunjukkan bahwa molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dapat menghambat

perlekatan bakteri *Shigella* maupun *Vibrio* pada sel epitel usus mencit sehingga juga mengurangi kolonisasi bakteri pada mukosa usus yang dibuktikan dengan penurunan hitung jumlah koloni bila dibandingkan antara kelompok kontrol positif *Shigella* (KPS) dengan kelompok perlakuan *Shigella* (P1) dan kelompok kontrol positif *Vibrio* dengan kelompok perlakuan *Vibrio* (P2).

Kemudian, untuk mengetahui antar perlakuan mana yang berbeda, maka diperlukan uji *Post Hoc Mann Whitney*. Pertama dapat dilihat dari hasil paparan infeksi oleh *Shigella flexneri*. Jumlah koloni pada kelompok KPS meningkat secara signifikan dibandingkan KN ($p=0,018$), yang membuktikan bahwa infeksi *Shigella flexneri* berhasil. Begitu juga, pada hasil paparan infeksi oleh *Vibrio cholerae*. Jumlah koloni pada kelompok KPV meningkat secara signifikan dibandingkan KN ($p=0,005$), yang membuktikan bahwa infeksi *Vibrio cholerae* berhasil.

Selanjutnya, dapat dilihat dari hasil paparan infeksi oleh *Vibrio cholerae* yang sebelumnya telah divaksinasi dengan molekul adhesin *Vibrio*. Perbandingan kelompok P2 dengan kelompok KPV menunjukkan penurunan jumlah koloni yang berbeda signifikan ($p=0,005$). Hal ini menunjukkan keberhasilan vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* secara oral dalam menurunkan jumlah koloni *Vibrio cholerae* pada sekret mukosa usus mencit balb/c. Berbeda dengan hasil paparan infeksi oleh *Shigella flexneri* yang sebelumnya telah divaksinasi dengan molekul adhesin *Vibrio*. Perbandingan kelompok P1 dengan kelompok KPS menunjukkan penurunan jumlah koloni yang tidak berbeda signifikan ($p=0,129$). Hal tersebut dapat disebabkan oleh karena penggunaan media agar untuk kultur sekret mukosa usus mencit yang telah diinfeksi *Shigella flexneri* menggunakan media agar *MacConkey*. Media agar tersebut merupakan media agar yang selektif dan diferensial untuk bakteri enterik Gram negatif, sehingga tidak menutup kemungkinan pertumbuhan flora

normal usus tidak dihambat dengan sempurna dan menimbulkan kesulitan dalam penghitungan jumlah koloni *Shigella* yang berwarna transparan pada media agar tersebut.

Kemudian yang terakhir dapat dilihat dari perbandingan hasil hitung jumlah koloni kedua bakteri yang sebelumnya telah divaksinasi dengan molekul adhesin *Vibrio*. Perbandingan jumlah koloni *Shigella flexneri* dan *Vibrio cholerae* dari kelompok P1 dan kelompok P2 tidak berbeda signifikan ($p=0,134$), sehingga menunjukkan efektivitas yang hampir sama dalam menghambat pertumbuhan koloni bakteri.

Inovasi pemberian molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* sebagai kandidat vaksin dalam mencegah diare oleh karena *Shigella flexneri* dan *Vibrio cholerae* muncul karena hingga saat ini belum ada vaksin homolog yang secara efektif dapat memberikan protektifitas terhadap diare oleh karena dua spesies tersebut. Sedangkan patogenesis infeksi saluran pencernaan oleh karena kedua spesies tersebut memiliki kemiripan, yaitu diawali oleh proses adhesi terhadap reseptor sel target. Proses adhesi tersebut diperankan oleh ligan berupa adhesin pada permukaan sel mikroba, baik berupa pili maupun *outer membrane protein* (OMP) (Sumarno, 2000).

Studi yang dilakukan oleh Rabbi *et al.* (2008) melaporkan bahwa terdapat imunogenisitas yang kuat dan reaksi silang antigenik pada komponen permukaan antara *Vibrio cholerae* O1, *Shigella flexneri* 2a, dan *Haemophilus influenza* b. Kemudian, juga diketahui bahwa terjadi reaksi anti-hemaglutinasi positif antara molekul adhesin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* dengan molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* pada studi yang dilakukan oleh Anindhita (2018). Oleh karena itu, apabila molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* diberikan sebagai kandidat vaksin untuk kedua spesies tersebut, maka respon imun yang timbul akibat vaksinasi molekul adhesin

diharapkan dapat menghambat proses perlekatan/adhesi dari kedua spesies tersebut.

Berdasarkan uraian tersebut di atas, dapat diketahui bahwa vaksinasi dengan molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* secara umum berpengaruh dalam menurunkan jumlah koloni bakteri pada mencit balb/c, meskipun pada kelompok yang diinfeksi *Shigella flexneri* menunjukkan hasil yang tidak signifikan secara statistik.

6.4 Keterbatasan Penelitian

Ada beberapa hal yang menjadi keterbatasan dalam studi ini. Dalam studi ini, penggunaan media kultur untuk isolasi *Shigella flexneri* menggunakan media kultur yang selektif dan diferensial untuk bakteri enterik Gram negatif, sehingga tidak menutup kemungkinan pertumbuhan flora normal usus seperti *E. coli* tidak dihambat dengan baik dalam media ini. Sehingga, diperlukan media kultur pembanding yang dapat lebih selektif menghambat pertumbuhan flora normal usus, misalnya seperti media *Salmonella-Shigella* agar (SSA) dan *Xylose lysine deoxycholate* (XLD). Kemudian, peneliti juga masih sulit membedakan apakah respon imun yang dicetuskan oleh mencit spesifik untuk molekul adhesin atau terdapat keterlibatan CTB yang digunakan sebagai adjuvan. Sehingga, diperlukan desain penelitian yang dapat membedakan respon imun yang dicetuskan oleh CTB dan molekul adhesin secara terpisah.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

7.1.1 Kesimpulan Umum:

Vaksinasi molekuler adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dengan adjuvan CTB pada mencit balb/c dapat meningkatkan produksi IL-17A dan *secretory-IgA* sebagai komponen dari sistem imun mukosa, serta secara umum berpengaruh dalam menurunkan jumlah koloni bakteri pada sekret mukosa usus mencit yang telah diinfeksi *Shigella flexneri* maupun *Vibrio cholerae*.

7.1.2 Kesimpulan Khusus:

1. Vaksinasi molekuler adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* berpengaruh dalam meningkatkan kadar IL-17A pada darah mencit balb/c.
2. Vaksinasi molekuler adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* berpengaruh dalam meningkatkan kadar *secretory-IgA* pada sekret mukosa usus mencit balb/c.
3. Vaksinasi molekuler adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* berpengaruh dalam menurunkan jumlah koloni bakteri pada mencit balb/c yang telah diinfeksi *Shigella flexneri*, terdapat kecenderungan terhadap jumlah koloni *Shigella flexneri* untuk turun meskipun tidak bermakna secara statistik.

4. Vaksinasi molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* berpengaruh dalam menurunkan jumlah koloni bakteri pada mencit balb/c yang telah diinfeksi *Vibrio cholerae*.

Hasil-hasil tersebut menjadikan molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dapat dipertimbangkan untuk menjadi kandidat vaksin yang diberikan per oral karena mampu mencetuskan respon imun mukosa melalui peningkatan kadar IL-17A dan *secretory-IgA*, serta berpengaruh dalam menurunkan jumlah koloni bakteri pada sekret mukosa usus mencit yang telah diinfeksi *Shigella flexneri* maupun *Vibrio cholerae*.

7.2. Saran

Saran yang dapat diambil dari studi ini adalah :

1. Pada penelitian ini, diperlukan media kultur pembanding yang dapat lebih selektif menghambat pertumbuhan flora normal usus, misalnya dengan menggunakan media *Salmonella-Shigella* agar (SSA) atau *Xylose lysine deoxycholate* (XLD).
2. Diperlukan studi lanjutan dengan kelompok perlakuan yang hanya diberikan adjuvan CTB, sehingga dapat menilai respon imun yang dicetuskan oleh mencit spesifik untuk molekul adhesin atau terdapat keterlibatan CTB yang digunakan sebagai adjuvan.
3. Diperlukan studi lanjutan dengan metode lain untuk menguji molekul adhesin sebagai kandidat vaksin, seperti uji protektivitas secara *ex*

vivo pada hewan coba dengan menghitung berat usus sebagai manifestasi klinis diare.



DAFTAR PUSTAKA

Abbas, Abdul K., Lichtman, Andrew H., Pillai, Shiv. 2016. *Imunologi Dasar*. Abbas: *Mekanisme Efektor Imunitas Humoral*, Edisi Indonesia ke-5. Singapura: Elsevier; hal 174-193.

Abdulkadir, S.A., 1991. Cholera and cholera-like diarrhoeal diseases: Why the differences in severity?. *Medical hypotheses*, **34**(3), pp.278-281.

Agustina W, Fitri LE, Raras TYM, Siswanto B, Sumarno., 2012. *Antibody Protein Hemagglutinin Subunit Pili with MW 49,8 kDa Shigella dysenteriae can inhibit Shigella dysenteriae adhesion on Mice Enterocyte*. IOSR J Pharm. **2**(5):13–20.

Akter, A., Dash, P., Aktar, A., Jahan, S.R., Afrin, S., Basher, S.R., Hakim, A., Lisa, A.K., Chowdhury, F., Khan, A.I. and Xu, P., 2019. *Induction of systemic, mucosal and memory antibody responses targeting Vibrio cholerae O1 O-specific polysaccharide (OSP) in adults following oral vaccination with an oral killed whole cell cholera vaccine in Bangladesh*. *PLoS neglected tropical diseases*, **13**(8), p.e0007634.

Bär, E., Whitney, P. G., Moor, K., Reis e Sousa, C., & LeibundGut-Landmann, S., 2014. *IL-17 Regulates Systemic Fungal Immunity by Controlling the Functional Competence of NK Cells*. *Immunity*, **40**(1), 117–127.

Baratawidjaja K, Rengganis I. 2010. *Imunologi Dasar: Imunisasi*, Edisi ke-10. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Indonesia; hal. 557-617.

Basset, C., Holton, J., O'Mahony, R. and Roitt, I., 2003. *Innate immunity and pathogen–host interaction*. *Vaccine*, **21**, pp.S12-S23.

Beringer, A., Noack, M., & Miossec, P., 2016. *IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting*. *Trends in Molecular Medicine*, **22**(3), 230–241.

Bhunias, Arun K., 2008. *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. New York: Springer; hal. 253-265.

BioLegend. Legend MAX™ Mouse IL-17A ELISA Kit with Precoated Plates [Internet]. 2019 [diakses 13 Oktober 2019]. Available from: <https://www.biolegend.com/en-us/products/legend-max-mouse-il-17a-elisa-kit-with-pre-coated-plates-5817>.

Brandtzaeg, P., S. T. Gjeruldsen, F. Korsrud, K. Baklien, P. Berdal, J. Ek., 1979. *The Human Secretory Immune System Shows Striking Heterogeneity with Regard to Involvement of J Chain-Positive IgD Immunocytes*. *The Journal of Immunology*. **122** (2) 503-510.

Brandtzaeg, P., Valnes, K., Scott, H., Rognum, T. O., Bjerke, K., & Baklien, K., 1985. *The Human Gastrointestinal Secretory Immune System in Health and Disease*. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **20**(sup114), 17–38.

Brandtzaeg, P., Halstensen, T. S., Kett, K., Krajči, P., Kvale, D., Rognum, T. O., ... Sollid, L. M., 1989. *Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: Humoral immunity and intraepithelial lymphocytes*. *Gastroenterology*, **97**(6), 1562–1584.

Brooks, Geo F., Carroll, Karen C., Butel Janet S., Morse Stephen A., Mietzner Timothy A. 2013. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg*, Edisi 25. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; hal. 236-238.

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.

Camacho, A.I., Irache, J.M. and Gamazo, C., 2013. *Recent progress towards development of a Shigella vaccine*. *Expert review of vaccines*, **12**(1), pp.43-55.

Capiou, C., Poolman, J., Hoet, B., Bogaerts, H. and Andre, F., 2003. *Development and clinical testing of multivalent vaccines based on a diphtheria–tetanus–acellular pertussis vaccine: difficulties encountered and lessons learned*. *Vaccine*, **21**(19-20), pp.2273-2287.

CDC. *Shigellosis - Chapter 4 - 2020 Yellow Book | Travelers' Health | CDC* [Internet]. CDC. 2019 [diakses 8 Oktober 2019]. Available from: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/shigellosis>.

CDC. *Immunization: The Basics* [Internet]. CDC. 2018 [diakses 8 Januari 2020]. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/vac-gen/imz-basics.htm>.

CDC. *Laboratory Methods for the Diagnosis of Vibrio cholerae* [Internet]. CDC. 2019 [diakses 3 Februari 2020]. Available from: <https://www.cdc.gov/cholera/pdf/Laboratory-Methods-for-the-Diagnosis-of-Vibrio-cholerae-chapter-6.pdf>.

Corry, et al. *Thiosulphate citrate bile-salt sucrose (TCBS) agar*. 2003. *Progress in Industrial Microbiology*, 612–614.

Crump, J.A., Bopp, C.A., Greene, K.D., Kubota, K.A., Middendorf, R.L., Wells, J.G. and Mintz, E.D., 2003. *Toxigenic Vibrio cholerae serogroup O141–associated cholera-like diarrhea and bloodstream infection in the United States*. *The Journal of infectious diseases*, **187**(5), pp.866-868.

Czerkinsky, C. and Holmgren, J., 2010. *Mucosal delivery routes for optimal immunization: targeting immunity to the right tissues*. In *Mucosal Vaccines* (pp. 1-18). Springer, Berlin, Heidelberg.

Dahlan, M. S. 2014. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan: Deskriptif, Bivariat, dan Multivariat, Dilengkapi dengan Menggunakan SPSS*, Salemba.

Datta, S. K., Sabet, M., Nguyen, K. P. L., Valdez, P. A., Gonzalez-Navajas, J. M., Islam, S., ... Raz, E., 2010. *Mucosal adjuvant activity of cholera toxin requires Th17 cells and protects against inhalation anthrax*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(23), 10638–10643.

Elabscience. Mouse sIgA (Secretory Immunoglobulin A) ELISA Kit [Internet]. 2019 [diakses 10 Oktober 2019]. Available from: [https://www.elabscience.com/p-mouse-siga\(secretory-immunoglobulin-a\)-elisa-kit-20952.html](https://www.elabscience.com/p-mouse-siga(secretory-immunoglobulin-a)-elisa-kit-20952.html).

Fagarasan, S., Magri, G. and Cerutti, A., 2015. *The Mucosal Immune System: Host-Bacteria Interaction and Regulation of Immunoglobulin A Synthesis*. In *Molecular Biology of B Cells* (pp. 277-291). Academic Press.

Faisal, F., Sumarno, S. and Handono, K., 2013. *Susu Kuda Sumbawa Terfermentasi sebagai Immunostimulant untuk 37.8 kDa V. Cholerae Vaccine*. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, **26**(2), pp.69-74.

Federer, W. T. 1963. *Procedures and Designs Useful for Screening Material in Selection and Allocation, with a Bibliography*. *Biometrics*, **19**(4), 553.

Finkelstein, R. A., Boesman-Finkelstein, M., & Holt, P., 1983. *Vibrio cholerae hemagglutinin/lectin/protease hydrolyzes fibronectin and ovomucin: F. M. Burnet revisited*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **80**(4), 1092-1095.

Gladiator, A., Wangler, N., Trautwein-Weidner, K., & LeibundGut-Landmann, S. 2012. *Cutting Edge: IL-17-Secreting Innate Lymphoid Cells Are Essential for Host Defense against Fungal Infection*. *The Journal of Immunology*, **190**(2), 521-525.

Grzych, J. M., Grezel, D., Xu, C.B., Neyrinck, J. L., Capron, M., Ouma, J. H., Butterworth, A. E., Capron, A., 1993. *IgA antibodies to a protective antigen in human Schistosomiasis mansoni*. *The Journal of Immunology* January 15, **150** (2) 527-535.

Hansen, P. G., Hennessy, E. J., Blake, H., Clancy, R. L., Kamath, R., Molenaar, C., ... Jackson, G. D., 1989. *Appearance of IgG and IgA antibodies in human bile after tetanus toxoid immunization*. *Clinical and experimental immunology*, **77**(2), 215-220.

Herwana E, Surjawidjaja JE, Salim OC, 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-S53.

Ivanov, I.I., Zhou, L. and Littman, D.R., 2007. *Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation*. In *Seminars in immunology* (Vol. 19, No. 6, pp. 409-417). Academic Press.

Jennison, A. V., & Verma, N. K., 2004. *Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development*. *FEMS Microbiology Reviews*, **28**(1), 43-58.

Jin, W., & Dong, C., 2013. *IL-17 cytokines in immunity and inflammation*. *Emerging Microbes & Infections*, **2**(9), e60-e60.

JM Grzych, D Grezel, CB Xu, JL Neyrinck, M Capron, JH Ouma, AE Butterworth, A Capron., 1993. *The Journal of Immunology*. **150** (2) 527-535.

Kadim M. 2011. CHOLERA UPDATES in Indonesia.

Kang, J.-O., Lee, J.-B., & Chang, J., 2016. *Cholera Toxin Promotes Th17 Cell Differentiation by Modulating Expression of Polarizing Cytokines and the Antigen-Presenting Potential of Dendritic Cells*. PLOS ONE, **11**(6), e0157015.

Kasper Dennis L., Fauci Anthony S., Hauser Stephen L., et al. 2016. *Harrison's Manual of Medicine*. Edisi ke-19. New York: McGraw Hill Education, hal. 386-396.

Keith, Stephen. 2001. *Antex's Traveler's Diarrhea Vaccine 100 Percent Effective in Animals*. [diakses 8 Oktober 2019]. Available from: <https://www.newswise.com//articles/antexs-travelers-diarrhea-vaccine-100-percent-effective-in-animals>.

Kementerian Kesehatan. HASIL UTAMA RISKESDAS 2018. 2018.

Kirkham, B.W., Kavanaugh, A. and Reich, K., 2014. *Interleukin-17A: a unique pathway in immune-mediated diseases: psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis*. *Immunology*, **141**(2), pp.133-142.

Kilian, M. and Russell, M. W. 1994. in *Handbook of Mucosal Immunology* (Ogra, P. L., Mestecky, J., Lamm, M. E., Strober, W., McGhee, J. R. and Bienenstock, J., eds.), pp. 127-137, Academic Press, San Diego, CA.

Kitchin, N.R., 2011. *Review of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines in clinical development*. *Expert review of vaccines*, **10**(5), pp.605-615.

Kliegman R, Behrman R, Jenson H., 2007. *Nelson Textbook of Pediatric*, Edisi ke-18. Philadelphia: Elsevier.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K., 2009. *IL-17 and Th17 Cells*. *Annual Review of Immunology*, **27**(1), 485–517.

Kumar, R., & Kumar, P., 2019. *Yeast-based vaccines: New perspective in vaccine development and application*. *FEMS Yeast Research*.

Levinson, Warren. 2014. *Review of Medical Microbiology*, Edisi ke-13. New York: McGraw Hill Education; hal. 354-357.

López, M. C., 2017. *Chronic alcohol consumption regulates the expression of poly immunoglobulin receptor (pIgR) and secretory IgA in the gut*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **333**, 84–91.

Longet, S., 2014. *Generation of reconstituted human plasma-derived secretory-like IgA and IgM and their protective effect on intestinal epithelium* (Doctoral dissertation, Université de Lausanne, Faculté de biologie et médecine).

Lima, I. F. N., Havt, A., & Lima, A. A. M., 2015. *Update on molecular epidemiology of Shigella infection*. *Current Opinion in Gastroenterology*, **31**(1), 30–37.

Maheshwari, Mani & Nelapati, Krishnaiah & Kiranmayi, Bindu. 2011. *Vibrio cholerae* - A Review. *Veterinary World*. 4. 423.

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

McKenzie R., Walker R., Nabors G., et al., 2006. *Safety and immunogenicity of an oral, inactivated, whole-cell vaccine for Shigella sonnei: preclinical studies and phase 1 trial*. *Vaccine* 24: 3735–3745 [PubMed] [Google Scholar].

Meller, S., Di Domizio, J., Voo, K. S., Friedrich, H. C., Chamilos, G., Ganguly, D., ... Gilliet, M., 2015. *TH17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26*. *Nature Immunology*, 16(9), 970–979.

Morris, G.K., Koehler, J.A., Gangarosa, E.J. and Sharrar, R.G., 1970. *Comparison of media for direct isolation and transport of shigellae from fecal specimens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 19(3), pp.434-437.

Muranski, P., & Restifo, N. P., 2013. *Essentials of Th17 cell commitment and plasticity*. *Blood*, 121(13), 2402–2414.

Murray, Patrick R., Rosenthal, Patrick R., Pfaller, Michael A., 2013. *Medical Microbiology*, Edisi ke-7. Philadelphia: Elsevier Saunders; hal. 100; 273–279.

NCBI. *Vibrio cholerae* (Internet). 2019 [diakses 21 Desember 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=666>.

Nilssen, D. E., Brandtzaeg, P., Frøland, S. S., & Kausa, O., 1992. *Subclass composition and J-chain expression of the "compensatory" gastrointestinal IgG cell population in selective IgA deficiency*. *Clinical & Experimental Immunology*, 87(2), 237–245.

Octavia, S., & Lan, R., 2015. *Shigella and Shigellosis*. *Molecular Medical Microbiology*, 1147–1168.

Perez-Lopez, A., Behnsen, J., Nuccio, S.-P., & Raffatellu, M., 2016. *Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria*. *Nature Reviews Immunology*, 16(3), 135–148.

Rabbi, F., Sultana, N., Rahman, T., Al-Emran, H.M., Uddin, M.N., Hossain, M., Anwar, K.S., Yasmin, M., Nessa, J. and Ahsan, C.R., 2008. *Analysis of immune responses and serological cross reactivities among Vibrio cholerae O1, Shigella flexneri 2a and Haemophilus influenzae b*. *Cellular & molecular immunology*, 5(5), p.393.

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

Rothenbacher, F. P., & Zhu, J., 2013. *Efficient responses to host and bacterial signals during Vibrio cholerae colonization*. Gut Microbes, **5**(1), 120–128.

Sansonetti, P. J. 2001. III. *Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, **280**(3), G319–G323.

Sarwono, J. 2013. 12 Jurus Ampuh SPSS untuk Riset Skripsi. Jakarta: Elex Media Komputindo; hal. 273.

Schauer, Sonja, Sommer, Regina, Farnleitner, Andreas H., Kirschner, Alexander K. T., 2012. *Rapid and Sensitive Quantification of Vibrio cholerae and Vibrio mimicus Cells in Water Samples by Use of Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization Combined with Solid Phase Cytometry*. Applied and Environmental Microbiology, **78** (20) 7369-7375.

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, Dwi, Utami, Yulian Dwi, Widjayanto, Edi, Winarsih, Sri, Noorhamdani, A.S., Sumarno, 2013. *Protectivity of Adhesion Molecules Pili 49,8 kDa Shigella dysenteriae Conjugated with ISCOM against Bacterial Colonization and Colonic Epithelial Cells Damage in Mice*. International Journal of Tropical Medicine, **8**: 19-26.

Shabgah, A. G., Fattahi, E., & Shahneh, F. Z., 2014. *Interleukin-17 in human inflammatory diseases*. Advances in Dermatology and Allergology, **4**, 256–261.

Siegrist, C. 2008. Section 1: General Aspects of Vaccination How Do Vaccines Mediate Protection?

Sim, Doo-Hee dan Kweon, Mi-Na., 2008. *Characterization of invasion pattern of Shigella flexneri in the small intestine of infant mice*. The FASEB Journal, **22** (1).

Sperandio, V., Giron, J.A., Silveira, W.D. and Kaper, J.B., 1995. *The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of Vibrio cholerae*. Infection and immunity, **63**(11), pp.4433-4438.

Stratmann, T., 2015. *Cholera toxin subunit B as adjuvant—an accelerator in protective immunity and a break in autoimmunity*. Vaccines, **3**(3), pp.579-596.

Sumarno. *Karakteristik Molekuler Protein Adesi Vibrio cholerae O1 M094V dan Protein Reseptornya pada Sel Epitel Usus Halus Tikus Putih (Wistar)* [Internet]. 2000. Available from: <http://repository.unair.ac.id/31912/>.

Sumarno, Susanto A, Ismanoe G, Wienarsih., 2011. *Combinations of Protein Sub-Unit 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. J Pharm Biomed Sci. **1**(8):154–60.

Sumarno, S. Winarsih, S. Hidayat and Y.W. Utami, 2015. *Shigella dysenteriae Pili Proteins as an Adhesive Molecule Can Protect Moving Solution by Using Mice Ligated Ileal Loop Model.* International Journal of Tropical Medicine, **10**: 1-4.

Sumarno, et al., 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, **7** (2): 19-30.

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.

Tankeshwar, Acharya. *Salmonella-Shigella (SS) Agar: Composition, Principle, Procedure and Results* [Internet]. 2019 [diakses 22 Desember 2019]. Available from: <https://microbeonline.com/salmonella-shigella-ss-agar-composition-principle-procedure-results/>.

Taylor, R. K., Miller, V. L., Furlong, D. B. & Mekalanos, J. J., 1987. *Use of phoA gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin.* Proc Natl Acad Sci U S A **84**, 2833–2837.

Todar, K. Online textbook of bacteriology: *Vibrio cholerae* and Asiatic Cholera (Internet). 2012 [diakses 21 Desember 2019]. Available from: <http://textbookofbacteriology.net/cholera.html>.

Tokuhara, D., Yuki, Y., Nochi, T., Kodama, T., Mejima, M., Kurokawa, S., ... Kiyono, H., 2010. *Secretory IgA-mediated protection against V. cholerae and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic Escherichia coli by rice-based vaccine.* Proceedings of the National Academy of Sciences, **107**(19), 8794–8799.

Walker, R.I., 2005. *Considerations for development of whole cell bacterial vaccines to prevent diarrheal diseases in children in developing countries.* Vaccine, **23**(26), pp.3369-3385.

Wang, Y., & Yang, G., 2016. *Alteration of Polymeric Immunoglobulin Receptor and Neonatal Fc Receptor Expression in the Gut Mucosa of Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques.* Scandinavian Journal of Immunology, **83**(4), 235–243.

World Health Organization (WHO). Cholera [Internet]. 2019 [diakses 8 Oktober 2019]. Available from: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cholera>.

World Health Organization (WHO). Diarrhoeal disease [Internet]. 2017 [diakses 8 Oktober 2019]. Available from: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/diarrhoeal-disease>.

World Health Organization (WHO). Immunization [Internet]. 2020 [diakses 8 Januari 2020]. Available from: <https://www.who.int/topics/immunization/en/>.

World Health Organization (WHO). Pertussis [Internet]. 2009 [diakses 8 Oktober 2019]. Available from: <https://www.who.int/immunization/diseases/pertussis/en/>.

World Health Organization (WHO). Vibrio cholerae [Internet]. 2019 [diakses 21 Desember 2019]. Available from: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/admicrob6.pdf.

Ye, L., Jiang, B., Deng, J., Du, J., Xiong, W., Guan, Y., ... Huang, Z., 2015. *IL-37 Alleviates Rheumatoid Arthritis by Suppressing IL-17 and IL-17-Triggering Cytokine Production and Limiting Th17 Cell Proliferation*. The Journal of Immunology, **194**(11), 5110–5119.

Zhang, J., Cheng, Y., Cui, W., Li, M., Li, B., & Guo, L., 2014. *MicroRNA-155 modulates Th1 and Th17 cell differentiation and is associated with multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis*. Journal of Neuroimmunology, **266**(1-2), 56–63.



LAMPIRAN

Lampiran 1. 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. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755

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 Guntur Rizal H
Gentiri Indraswari Jaya Purna K
Elsa Larissa Safira Nur Alitha P
Merika Soraya Dea Aninditha
Aisyah Amalia Rafif Ulyya Aditya
Andrian Prasetya

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

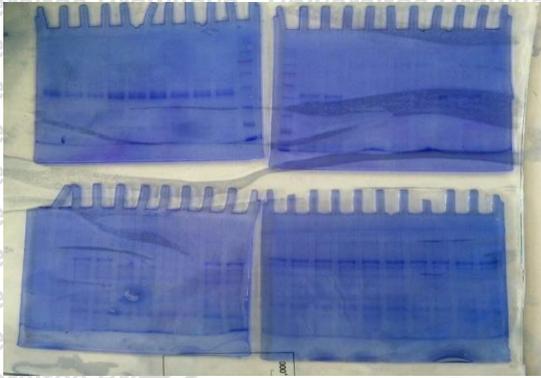
Prof. Dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr.H.
NIK: 160746683

Catatan :

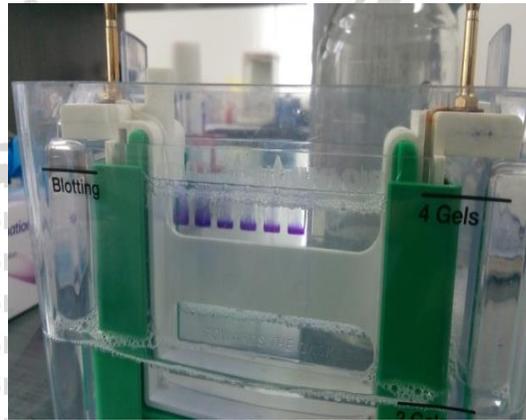
Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Hasil Pelaksanaan Penelitian Wajib Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik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

Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian

2.1 Prosedur SDS-PAGE



2.2 Prosedur Purifikasi Protein dengan Elektroelusi



2.3 Proses Vaksinasi dan Metode MLIL



Lampiran 3. Pernyataan Submitted Journal



Genitri Indraswari <genitrindraswr@gmail.com>

[IJMM]:Acknowledgment of Online Submission:IJMM_19_411

Indian Journal of Medical Microbiology <editor@ijmm.org>
Reply-To: aisyahamalia@student.ub.ac.id
To: genitrindraswr@gmail.com

Mon, Oct 28, 2019 at 10:37 AM

If you cannot see this page properly, please [click here](#).

Dear Miss. Indraswari,

NOTE: This e-mail is sent to you as one of the contributing authors. If you are not corresponding author, please coordinate with the author designated by your group as the corresponding author for this manuscript

A manuscript has been submitted to our journal Indian Journal of Medical Microbiology by Aisyah Amalia titled 'Generating Mucosal and Systemic Immune Response Following Vaccination of Vibrio cholerae Adhesion Molecule against Shigella flexneri Infection'. A copy of the acknowledgment mail is attached here with for your reference.

Thanking you
Editorial Team
Indian Journal of Medical Microbiology

Dear Dr. Amalia,

Indian Journal of Medical Microbiology has received your manuscript entitled "Generating Mucosal and Systemic Immune Response Following Vaccination of Vibrio cholerae Adhesion Molecule against Shigella flexneri Infection" for consideration for publication. The reference number for this manuscript is "IJMM_19_411". Kindly quote this in correspondence related to this manuscript. Please note that the journal charges article publication fee, which is required to be paid on acceptance of the manuscript.

The manuscript is being reviewed for possible publication with the understanding that it is being submitted to one journal at a time and have not been published, simultaneously submitted, or already accepted for publication elsewhere either as a whole or in part. Online submission of this article implies that the corresponding author has the written consent from all the contributors to act as corresponding author.

You are requested to send the signed copyright/contributor form within two weeks. The form can be uploaded as an scanned image from your area. The decision about the manuscript will be conveyed only on receipt of the form. High resolution images are required at the time of acceptance, you should be notified separately for the same, if images uploaded by you are not of printable quality.

The Editors will review the submitted manuscript initially. If found suitable, it will follow a double-blinded peer review. We aim to finish this review process within a short time frame, at the end of which a decision on the suitability or otherwise of the manuscript will be conveyed to you via this system. During this process you are free to check the progress of the manuscript through various phases from our online manuscript processing site <http://www.journalonweb.com/ijmm>.

We thank you for submitting your valuable work to the Indian Journal of Medical Microbiology.

Yours sincerely,
The Editorial Team
Indian Journal of Medical Microbiology



Lampiran 4. Surat Keterangan Bebas Plagiasi



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 756 /UN10.F08.08/PP12019

Yang bertanda tangan dibawah ini,

nama : Dr Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes
 NIP : 197511252005012
 pangkat dan golongan : Penata Muda, III/a
 jabatan : Ketua Badan Penerbitan Jurnal Fakultas Kedokteran

dengan ini menerangkan bahwa,

nama : Genitri Indraswari
 nim : 166070122011001
 program studi : Magister Ilmu Biomedik
 judul : Vaksinasi Molekul Adhesin 37,8 kDa Subunit Pili Vibrio Cholerae
 Terhadap Kadar IL-17A, Kadar Secretory-IgA Dan Jumlah Koloni
 Bakteri Pada Mencit Model Diare Shitella Flexneri
 jenis artikel : Tesis
 jumlah halaman : 137

berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal Fakultas
 Kedokteran menyatakan bahwa Artikel ilmiah tersebut diatas memiliki kemiripan 4 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

30 DEC 2019

Ketua Badan Penerbitan Jurnal,



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



Lampiran 5. Analisis Data Kadar IL-17A

5.1 Uji Normalitas Kadar IL-17A

Tests of Normality							
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	perlakuan	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kontrol	kontrol	,248	15	,014	,812	15	,005
	perlakuan	,294	10	,015	,705	10	,001

5.2 Uji Homogenitas Kadar IL-17A

Test of Homogeneity of Variance					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
kontrol	Based on Mean	,098	1	23	,757
	Based on Median	,134	1	23	,717
	Based on Median and with adjusted df	,134	1	22,832	,717
	Based on trimmed mean	,143	1	23	,709

5.3 Uji Mann Whitney Kadar IL-17A

Ranks				
	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
kontrol	kontrol	15	9,67	145,00
	perlakuan	10	18,00	180,00
	Total	25		

Test Statistics ^a	
	kontrol
Mann-Whitney U	25,000
Wilcoxon W	145,000
Z	-2,774
Asymp. Sig. (2-tailed)	,006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.



Lampiran 6. Analisis Data Kadar *secretory-IgA*

6.1 Uji Normalitas Kadar *secretory-IgA*

Tests of Normality

kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kadar kontrol	,168	15	,200 [*]	,877	15	,043
perlakuan	,194	10	,200 [*]	,859	10	,074

6.2 Uji Homogenitas Kadar *secretory-IgA*

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
kadar	Based on Mean	2,097	1	23	,161
	Based on Median	1,470	1	23	,238
	Based on Median and with adjusted df	1,470	1	17,946	,241
	Based on trimmed mean	1,931	1	23	,178

6.3 Uji Mann Whitney Kadar *secretory-IgA*

Ranks

kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
kadar kontrol	15	10,47	157,00
perlakuan	10	16,80	168,00
Total	25		

Test Statistics^a

		kadar
Mann-Whitney U		37,000
Wilcoxon W		157,000
Z		-2,108
Asymp. Sig. (2-tailed)		,035
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		,036 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.



Lampiran 7. Analisis Data Jumlah Koloni Bakteri

7.1 Uji Normalitas Jumlah Koloni Bakteri

Tests of Normality^{a,d}

jumlah koloni	kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^b			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
jumlah koloni	KPS	,356	5	,037	,776	5	,051
	KPV	,227	5	,200*	,910	5	,468
	P1	,367	5	,026	,712	5	,013

7.2 Uji Homogenitas Jumlah Koloni Bakteri

Test of Homogeneity of Variance^{a,b}

jumlah koloni		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
		Based on Mean	28,794	2	12
jumlah koloni	Based on Median	1,531	2	12	,256
	Based on Median and with adjusted df	1,531	2	5,571	,295
	Based on trimmed mean	23,527	2	12	,000

7.3 Uji *Kruskal Wallis* Jumlah Koloni Bakteri

Ranks

jumlah koloni	kelompok	N	Mean Rank
jumlah koloni	KN	5	7,50
	KPS	5	19,90
	KPV	5	17,00
	P1	5	13,10
	P2	5	7,50
	Total		25

Test Statistics^{a,b}

jumlah koloni	
Chi-Square	13,894
df	4
Asymp. Sig.	,008



a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kelompok

7.4 Uji Mann Whitney Jumlah Koloni Bakteri

7.4.1 Kontrol Negatif vs Kontrol Positif *Shigella*

Ranks		N	Mean Rank	Sum of Ranks
kontrol	kontrol negatif	5	3,50	17,50
	kontrol positif shigella	5	7,50	37,50
	Total	10		

Test Statistics ^a		jumlah koloni
Mann-Whitney U		2,500
Wilcoxon W		17,500
Z		-2,362
Asymp. Sig. (2-tailed)		,018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		,032 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

7.4.2 Kontrol Negatif vs Kontrol Positif *Vibrio*

Ranks		N	Mean Rank	Sum of Ranks
kontrol	kontrol negatif	5	3,00	15,00
	kontrol positif vibrio	5	8,00	40,00
	Total	10		



Test Statistics^a

	kontrol
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,785
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

7.4.3 Kontrol Positif *Shigella* vs P1

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah koloni	KPS	5	6,90	34,50
	P1	5	4,10	20,50
	Total	10		

Test Statistics^a

	jumlah koloni
Mann-Whitney U	5,500
Wilcoxon W	20,500
Z	-1,519
Asymp. Sig. (2-tailed)	,129
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,151 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

7.4.4 Kontrol Positif *Vibrio* vs P2

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
kontrol	kontrol positif vibrio	5	8,00	40,00
	perlakuan 2	5	3,00	15,00
	Total	10		

Test Statistics^a

	jumlah koloni
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,785
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

7.4.5 P1 vs P2

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah koloni	P1	5	6,50	32,50
	P2	5	4,50	22,50
	Total	10		

Test Statistics^a

	jumlah koloni
Mann-Whitney U	7,500
Wilcoxon W	22,500
Z	-1,500
Asymp. Sig. (2-tailed)	,134
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,310 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.



RIWAYAT HIDUP

Genitri Indraswari, lahir di Tulungagung, 20 Juni 1996 merupakan putri dari Sutoko, SE dan Sih Triani. Ia lulus dari SD Taman Harapan pada tahun 2008, dari SMP Negeri 3 Malang pada tahun 2011, dan dari SMA Negeri 4 Malang pada tahun 2013. Pada tahun 2013, ia melanjutkan studi ke Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dan lulus pada tahun 2019. Pada tahun 2017, ia mengambil program *Fast Track* Magister Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pada tahun 2020, ia telah mendapatkan gelar Magister Biomedik dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Kemudian, pada tahun 2020 ini, ia akan menjalani program internsip selama satu tahun ke depan untuk kemudian dapat memperoleh SIP Dokter.

Malang, Februari 2020

