

**KONJUGASI MOLEKUL ADHESI PILI *Vibrio cholerae* BM 37,8 kDa
dengan *CHOLERA TOXIN B (CTB)* BEREFEK PROTEKTIF
TERHADAP INFEKSI *Shigella flexneri***

THESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



Oleh :

Elsa Larissa Widayani

166070122011007

PROGRAM STUDI MAGISTER

ILMU BIOMEDIK

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum wr. wb.

Alhamdulillahirrobbil'alamin. Segala puji hanya bagi Allah SWT atas semua kasih sayang-Nya. Atas semua petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Thesis yang berjudul "Konjugasi Molekul Adhesi Pili *Vibrio cholerae* Berat Molekul 37,8 kDa dengan *Cholerae Toxin B* (CTB) Berefek Protektif terhadap Infeksi *Shigella flexneri*" dengan lancar.

Dalam tesis ini ditunjukkan efek protektif dari Molekul Adhesi Pili *Vibrio cholerae* Berat Molekul 37,8 kDa dengan *Cholerae Toxin B* (CTB) dalam meningkatkan respon imun β -defensin dan menghambat diare. Tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga saran dan kritik yang membangun akan sangat diterima oleh penulis. Selesaiannya Thesis ini adalah karena adanya dorongan, bantuan, dan motivasi dari berbagai pihak. Untuk itu, penyusun ingin mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Allah SWT
2. Papa, Mama, dan Adik
3. Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, Sp. MK (K)
4. Dr. dr. Sri Poeranto, M. Kes, Sp. ParK
5. Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H, M.Sc, Sp.ParK
6. dr. Happy Kurnia Permatasari, Ph. D
7. dr. Exgha Dwi Putra Manggala
8. Tim molekul adhesi : dr. Septha Rully D.P., dr. Merika Soraya, dr. Genitri Indraswari, dr. Aisyah Amalia, dr. Adrian Prasetya
9. Mas Yayan sebagai admin S2 biomedik
10. Mas Memet dan Mas Slamet
11. Semua teman-teman dan pihak yang tidak sempat saya sebutkan satu persatu.

Semoga thesis ini bermanfaat bagi yang ingin melakukan pendalaman ilmu dan penelitian di bidang serupa

Malang, 5 Februari 2020

Penulis

IDENTITAS KOMITE PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS

Judul Tesis: Konjugasi Molekul Adhesi Pili *Vibrio cholerae* BM 37,8 kDa dengan *cholerae toxin B* (CTB) Berefek Protektif Terhadap Infeksi *Shigella flexneri*

Nama : Elsa Larissa Widyani

NIM : 166070122011007

PS : Ilmu Biomedik

Komite Pembimbing

Ketua : Dr. dr. Sri Poeranto, M.Kes., Sp.Park

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

Komite Penguji

Penguji 1 : Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H, M.Sc, Sp.Park

Penguji 2 : dr. Happy Kurnia Permatasari, Ph. D

Komite Monitoring dan Evaluasi

Dr. dr. Endang Sriwahyuni, MS

Tanggal Ujian : 5 Februari 2020

RINGKASAN

Elsa Larissa Widayani, NIM. 166070122011007. Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, 9 Januari 2020. Konjugasi Molekul Adhesi Pili *Vibrio cholerae* BM 37,8 kDa dengan *Cholerae Toxin B* (CTB) Berefek Protektif terhadap Infeksi *Shigella flexneri*. Pembimbing : (1) Dr. dr. Sri Poeranto, M. Kes, Sp. Park, (2) Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, Sp. MK (K).

Diare adalah penyakit endemis di Indonesia yang memiliki angka prevalensi sebesar 8% pada Rikesdas 2018. Penyebab terbanyak diare adalah *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri* sehingga dibutuhkan intervensi yang dapat menurunkan penyakit shigella dan kolera berupa vaksinasi. Vaksinasi yang telah ada hanya memberikan efek proteksi sebesar 2% pada anak usia <5 tahun terhadap kolera saja. Vaksin yang ada untuk mengatasi kolera dan shigella belum ada. Diketahui bahwa vaksin molekul adhesi *Vibrio cholerae* pada subunit pili dengan berat molekul 37,8 kDa yang dikonjugasikan dengan *cholerae toxin subunit B* (CTB) dapat menghambat proses *attachment* dan diare pada kolera. Molekul adhesi memiliki sifat yaitu saling bereaksi silang. Terdapat informasi bahwa terjadi reaksi silang antigenik antara molekul adhesi *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri*. Sehingga dibuatlah penelitian untuk mengevaluasi apakah vaksinasi konjugasi molekul adhesi pili *Vibrio cholerae* BM 37,8 kDa dengan CTB dapat memberikan efek protektif terhadap infeksi *Shigella flexneri*. Penelitian dilakukan secara *in vivo* pada mencit balb/c yang diberikan vaksinasi oral dengan dosis 250µg pada hari ke-7, 14, 21, dan 28. Selanjutnya mencit dibedah dan *discrapping* mukosa ususnya untuk dilakukan pengukuran kadar protein β -defensin menggunakan metode ELISA. Didapatkan hasil kadar β -defensin meningkat secara signifikan pada mencit yang divaksinasi. Penelitian dilanjutkan dengan mengevaluasi progresifitas diare menggunakan metode *mice ligated ileal loop* (MLIL) secara *ex vivo* untuk selanjutnya dilakukan pengukuran massa usus. Didapatkan hasil bahwa mencit yang tidak divaksinasi namun diinfeksi oleh *Shigella flexneri* atau *Vibrio cholerae*, terdapat peningkatan massa usus hingga menit ke-60 tanpa ada penurunan massa usus. Sedangkan mencit yang divaksinasi lalu diinfeksi dengan *Shigella flexneri* atau *Vibrio cholerae*, massa usus meningkat namun dengan cepat kembali turun ke massa awal. Hasil ini menunjukkan adanya hambatan progresifitas diare selama infeksi *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri*. Kesimpulannya, vaksinasi molekul adhesi *Vibrio cholerae* pada subunit pili dengan berat molekul 37,8 kDa yang dikonjugasikan dengan CTB memberikan efek protektif terhadap infeksi *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri*.

SUMMARY

Elsa Larissa Widayani, NIM. 166070122011007. Magister of Biomedical Science Faculty of Medicine University of Brawijaya, Malang, Indonesia 9th January 2020. Conjugation of Adhesion Molecule of Pili Subunit *Vibrio cholerae* MW 37,8 kDa with *Cholerae Toxin B* (CTB) Has Protective Effect against *Shigella flexneri*'s infection. Supervisors : (1) Dr. dr. Sri Poeranto, M. Kes, Sp. Park, (2) Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, Sp. MK (K).

Diarrhea is an endemic disease in Indonesia which has prevalence 8% in Rikesdas 2018. The most common causes of diarrhea is *Vibrio cholerae* and *Shigella flexneri*, which needs intervention in the form of vaccination. Existing vaccination only provides 2% protective effect against cholerae in children <5 years old. There is no vaccine available to treat both cholerae and shigellae. It is known that the *Vibrio cholerae*'s adhesion molecule in pili subunit with molecular weight of 37.8 kDa conjugated with cholerae toxin subunit B (CTB) can inhibit the process of attachment and diarrhea in cholera. Adhesion molecules have the property of cross-reacting with each other. There is information that antigenic cross-reactivity occurs between the adhesion molecule of *Vibrio cholerae* and *Shigella flexneri*. So this study was conducted to evaluate whether the conjugated vaccine of *Vibrio cholerae*'s adhesion molecule MW 37.8 kDa with CTB can have a protective effect against *Shigella flexneri*'s infection. The study was conducted *in vivo* on balb/c mice given vaccination orally 250 µg on day 7, 14, 21, and 28. Furthermore, mice were sacrificed and their intestinal mucosa was scrapped for measurement of β -defensin protein levels using the ELISA method. The results showed that β -defensin levels increased significantly in vaccinated mice. The study was continued by evaluating the progression of diarrhea using the mice ligated ileal loop (MLIL) method *ex vivo* for subsequent measurement of intestinal mass. The results showed that mice that were not vaccinated but were infected with *Shigella flexneri* or *Vibrio cholerae*, had an increase in intestinal mass up to the 60th minute without further decrease in intestinal mass. Whereas the vaccinated mice that were infected with *Shigella flexneri* or *Vibrio cholerae*, the intestinal mass increased but quickly returned to the initial mass. These results indicate the inhibition of diarrhea's progression during infection of *Vibrio cholerae* and *Shigella flexneri*. In conclusion, vaccination of *Vibrio cholerae*'s adhesion molecule in pili subunit with molecular weight 37.8 kDa conjugated with CTB has a protective effect against infections of *Vibrio cholerae* and *Shigella flexneri*.

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Kata Pengantar	iv
Identitas Komite Pembimbing dan Penguji Tesis	v
Ringkasan	vi
Summary	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Gambar	xii
Daftar Tabel	xiii
Daftar Lampiran	xiv
Daftar Singkatan	xv
 BAB I. PENDAHULUAN	 1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.4. Manfaat Penelitian	6
 BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	 8
2.1. Diare	8
2.1.1. Definisi Diare	8
2.1.2. Epidemiologi Diare	9
2.1.3. Etiologi Diare	11
2.1.4. Patogenesis Diare	11
2.1.5. Tanda dan Gejala Diare	13
2.1.6. Diagnosis Diare	14
2.1.7. Tatalaksana Diare secara Umum	14
2.1.8. Tatalaksana Diare yang Berkaitan dengan Dehidrasi	15
2.1.9. Pencegahan Diare secara Umum	18
2.2. Penyakit Kolera	19
2.2.1. Definisi dan Epidemiologi Kolera	19
2.2.2. Etiologi Penyakit Kolera	21
2.2.3. Patogenesis Kolera	23
2.2.4. Tanda dan Gejala Kolera	26

2.2.5.	Diagnosis Kolera	26
2.2.6.	Tatalaksana Kolera	27
2.2.7.	Perkembangan Vaksin Kolera	28
2.3.	Shigellosis	32
2.3.1.	Definisi dan Epidemiologi Shigellosis	32
2.3.2.	Etiologi Shigellosis	34
2.3.3.	Patogenesis Shigellosis	36
2.3.4.	Tanda dan Gejala Shigellosis	38
2.3.5.	Diagnosis Shigellosis	38
2.3.6.	Tatalaksana Shigellosis	39
2.3.7.	Perkembangan Vaksin Shigella	41
2.4.	Molekul Adhesi.....	43
2.4.1.	Definisi Molekul Adhesi	43
2.4.2.	Peran Molekul Adhesi dalam Menginduksi Respon Imun	44
2.4.3.	Reaksi Silang antar Molekul Adhesi	45
2.5.	Cholerae toxin subunit B (CTB)	47
2.5.1.	Definisi CTB	47
2.5.2.	Peran CTB dalam Menginduksi Respon Imun	48
2.5.3.	Peran CTB sebagai Adjuvan	48
2.6.	Defensin	49
2.6.1.	Definisi Defensin	49
2.6.2.	Struktur Defensin	50
2.6.3.	Tempat Diproduksinya Defensin	52
2.6.4.	Saat Diproduksinya Defensin	52
2.6.5.	Cara Kerja Defensin dalam Membunuh Bakteri	53
2.7.	Ligated Ileal Loop.....	55
2.7.1.	Definisi <i>Ligated Ileal Loop</i>	55
2.7.2.	Metode <i>Ligated Ileal Loop</i> dengan <i>Vibrio cholerae</i>	55
2.7.3.	<i>Mice Ligated Ileal Loop</i> oleh Sumarno <i>et. al.</i>	57
2.8.	Kerangka Teori dan Deskripsi Kerangka Teori	58
2.8.1.	Kerangka Teori.....	58
2.8.2.	Deskripsi Kerangka Teori.....	59
BAB III.	KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	60
3.1.	Kerangka <i>Grand Desain</i> Penelitian Besar	60
3.2.	Kerangka Konsep Desain Penelitian secara Khusus	61
3.3.	Deskripsi Kerangka Konsep	62

3.4.	Hipotesis.....	64
BAB IV. METODE PENELITIAN.....		65
4.1.	Rancangan Penelitian.....	65
4.2.	Populasi dan Jumlah Sampel	66
4.3.	Lokasi dan Waktu Penelitian	67
4.4.	Variabel Penelitian	67
4.4.1.	Variabel Bebas.....	67
4.4.2.	Variabel Terikat.....	68
4.5.	Definisi Operasional	68
4.5.1.	Mencit balb/c	68
4.5.2.	Bakteri <i>Vibrio cholerae</i> O1	68
4.5.3.	Bakteri <i>Shigella flexneri</i>	68
4.5.4.	Vaksin Konjugasi.....	68
4.5.5.	Protein adhesi pili 37,8 kDa	69
4.5.6.	CTB	69
4.5.7.	Vaksinasi protein adhesi konjugasi CTB	69
4.5.8.	B-defensin	70
4.5.9.	Massa usus	70
4.5.10.	Metode MLIL	70
4.6.	Alat dan Bahan Penelitian.....	71
4.6.1.	Perawatan Hewan Coba	71
4.6.2.	Kultur <i>Shigella flexneri</i>	71
4.6.3.	Kultur <i>Vibrio cholerae</i>	71
4.6.4.	Isolasi Protein Pili <i>Vibrio cholerae</i>	72
4.6.5.	SDS PAGE	72
4.6.6.	Elektroelusi dan Dialisis	72
4.6.7.	Konjugasi Vaksin dan Pemberian Vaksinasi	73
4.6.8.	Pembedahan Mencit dan MLIL.....	73
4.6.9.	Pengukuran β -defensin dengan Metode ELISA.....	73
4.6.10.	Pengukuran Massa Usus	74
4.7.	Prosedur Penelitian.....	74
4.7.1.	Perawatan Hewan Coba.....	74
4.7.2.	Kultur <i>Shigella flexneri</i>	75
4.7.3.	Kultur <i>Vibrio cholerae</i>	75
4.7.4.	Isolasi Pili <i>Vibrio cholerae</i>	76
4.7.5.	SDS-PAGE.....	77
4.7.6.	Elektroelusi dan Dialisis.....	79

4.7.7.	Konjugasi Vaksin dan Pemberian Vaksin	80
4.7.8.	Pembedahan Mencit	81
4.7.9.	Pengukuran Kadar β -defensin (ELISA)	82
4.7.10.	MLIL dan Pengukuran Massa Usus	84
4.8.	Alur Penelitian	85
4.8.1.	Alur Penelitian Parameter β -defensin	85
4.8.2.	Alur Penelitian Parameter Massa Usus	86
4.8.3.	Deskripsi Alur Penelitian	87
4.9.	Analisis Data	88
BAB V. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA		90
5.1.	Hasil Penelitian	90
5.1.1.	Hasil Identifikasi Pili <i>Vibrio cholerae</i> dengan Menggunakan SDS-PAGE	90
5.1.2.	Hasil Pengukuran Kadar β -defensin pada Mukosa Usus Mencit	91
5.1.3.	Hasil Pengukuran Berat Usus Mencit menggunakan Metode MLIL	92
5.2.	Hasil Analisis Data	95
5.2.1.	Hasil Analisis Data Kadar β -defensin	95
5.2.2.	Hasil Analisis Data Massa Usus	95
BAB VI. PEMBAHASAN		98
6.1.	Pemberian Vaksinasi Meningkatkan Kadar β -defensin	98
6.2.	Pemberian Vaksinasi Menurunkan Massa Usus Mencit	100
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN		102
7.1.	Kesimpulan	102
7.2.	Saran	102
DAFTAR PUSTAKA		103
LAMPIRAN		118

DAFTAR GAMBAR

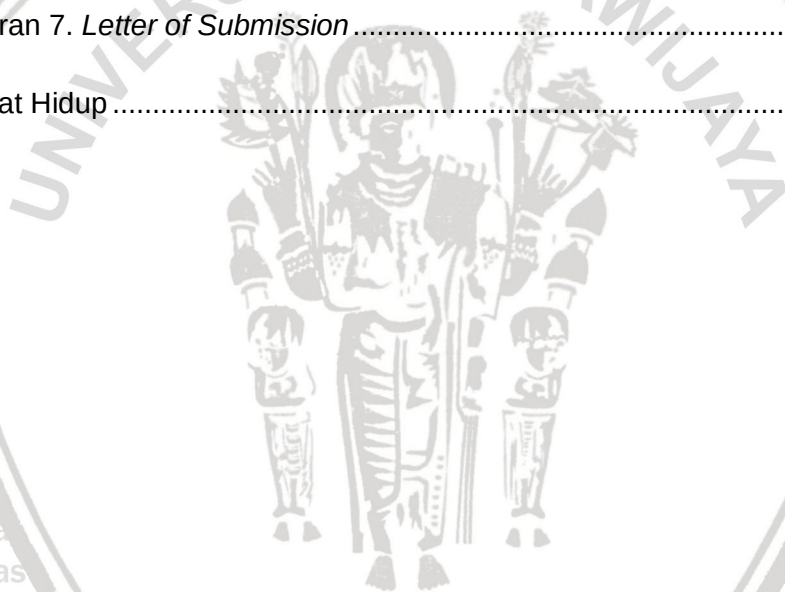
2.1. Rencana Terapi C Diare Dehidrasi Berat.....	17
2.2. Rencana Terapi B Diare Dehidrasi Ringan-Sedang.....	18
2.3. Rencana Terapi A Diare Tanpa Dehidrasi	21
2.4. Hasil pewarnaan gram pada <i>Vibrio cholerae</i>	22
2.5. Koloni <i>Vibrio cholerae</i> yang terbentuk pada media agar TCBS.....	25
2.6. Patogenesis dari infeksi <i>Vibrio cholerae</i> pada enterosit.....	35
2.7. Struktur antigenik <i>Enterobacteriaceae</i> secara umum.....	39
2.8. Spesies <i>Shigelle</i> pada media kultur	47
2.9. Struktur <i>crystalography</i> dari <i>cholera toxin</i> (CT).....	50
2.10. Struktur dari <i>defensin</i>	51
2.11. Ekspresi peptida antimikroba <i>defensin</i> pada tubuh	57
2.12. Peningkatan massa usus yang dilakukan induksi toksin <i>Vibrio cholerae</i> dengan metode MLIL	58
2.13. Bagan Kerangka Teori.....	60
3.1. Bagan Kerangka Konsep <i>Grand Design</i> Penelitian	61
3.2. Bagan Kerangka Konsep <i>Grand Design</i>	85
4.1. Bagan Alur Penelitian Parameter β -defensin.....	86
4.2. Bagan Alur Penelitian Parameter Massa Usus	90
5.1. Hasil SDS PAGE protein pili <i>Vibrio cholerae</i>	91
5.2. Diagram kolom rerata kadar β -defensin pada kelompok kontrol dan kelompok yang divaksinasi	92
5.3. Temuan makroskopik metode MLIL.....	93
5.4. Grafik rerata keseluruhan hasil penimbangan massa usus.....	94
5.5. Grafik perbedaan hasil analisis <i>Tukey</i>	

DAFTAR TABEL

2.1. Tabel Insidens dan Mortalitas akibat diare pada anak usia 0-4 tahun di daerah yang dinaungi WHO tahun 2010.	10
2.2. Tabel Diagnosis Diare	14
2.3. Tabel Klasifikasi Diare berdasarkan Derajat Dehidrasi	16
2.4. Tabel efek vaksinasi <i>whole cell-cholerae toxin B</i> (WC-CTB) dan <i>whole cell</i> (WC).	29
2.5. Tabel Perbedaan keempat tipe <i>Shigella sp.</i> dalam sifat memfermentasi manitol dan <i>ornithine decarboxylase</i>	36
2.6. Reaksi <i>Ileal Loop</i> Hewan Coba terhadap <i>Vibrio cholerae</i> 569B	56
2.7. Reaksi <i>Ileal Loop</i> Hewan Coba terhadap crude toxin <i>Vibrio cholerae</i>	56
4.1. Tabel jumlah sampel tiap perlakuan.	67
5.2. Tabel Rerata Massa Usus Mencit	93

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Lembar Keterangan Kelaikan Etik	118
Lampiran 2. Surat Keterangan Bebas Plagiasi	119
Lampiran 3. Hasil Uji Statistik Parameter β -defensin	120
Lampiran 4. Statistik Parameter Massa Usus	121
Lampiran 5. Dokumentasi	128
Lampiran 6. Hasil Uji Nanodrop dan rerata beta defensin	131
Lampiran 7. <i>Letter of Submission</i>	132
Riwayat Hidup	133



DAFTAR SINGKATAN

CDC	: Centers of Disease Control and Prevention
CTA	: Cholerae Toxin Sub-unit A
CTB	: Cholerae Toxin Subunit B
WC-rBS	: Whole cell – recombinant cholerae toxin B subunit
UNICEF	: The United Nations Children's Fund
WHO	: World Health Organization
Oag	: O antigen
LPS	: Lipopolisakarida / Lipopolysaccharide
GM1	: monosialotetrahexosylganglioside
c-AMP	: cyclic adenosine monophosphate
kDa	: kilo dalton
s-IgA	: secretory Immunoglobulin A
IgA	: Immunoglobulin A
OMP	: Outer Membrane Protein
IL-17	: Interleukin-17
Th17	: T helper 17
Treg	: T regulatory
balb/c	: B albino clone
Rikesdas	: Riset Kesehatan Dasar
TCBS	: Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose
BM	: Berat Molekul
Gs	: G stimulatory
AC	: Adenylat cyclase
WC-CTB	: Whole cell – cholera toxin subunit B
WC	: Whole cell

LT-ETEC	: <i>heat-labile toxin enterotoxigenic Escherichia coli</i>
ETEC	: <i>enterotoxigenic Escherichia coli</i>
IHME	: <i>Institute for Health Metrics and Evaluation</i>
EMB	: <i>Eosin methylene blue</i>
HE	: <i>Hektoen enteric</i>
TSI	: <i>Triple Sugar Iron</i>
IV	: <i>Intravena</i>
hBD	: <i>human beta defensin</i>
HD	: <i>human alfa defensin</i>
mRNA	: <i>messenger ribonucleic acid</i>
MLIL	: <i>mice ligated ileal loop</i>
EGTA	: <i>ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
TCG	: <i>Thioprolin Carbonate Glutamate</i>
PBS	: <i>Phosphate buffered saline</i>
FKUB	: <i>Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya</i>
SDS-PAGE	: <i>sodium dodecyl(lauryl) sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
ELISA	: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
CFU	: <i>colony forming unit</i>
RPMI	: <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SPSS	: <i>Statistical Package for Social Sciences</i>
OD	: <i>optical density</i>
TCA	: <i>Trichloroacetic acid</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diare adalah kondisi saat tinja atau feses menjadi lembek atau cair yang terjadi setidaknya tiga kali per hari, atau lebih sebagai akibat dari infeksi gastrointestinal yang disebabkan oleh pathogen berupa bakteri, virus, atau parasit (UNICEF, 2009). Di dunia, setiap tahunnya diare menyumbang angka mortalitas sebesar 525.000 jiwa pada populasi anak di bawah lima tahun (WHO, 2017). Diare yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae* menyebabkan 21.000-143.000 kematian per tahun (WHO, 2019) dan yang disebabkan oleh *Shigella flexneri* menyebabkan 600.000 kematian per tahun (CDC, 2019).

Studi surveilans di Indonesia pada tahun 2002 menjelaskan bahwa dari 587 pasien yang terkena diare, 39% disebabkan oleh *Shigella flexneri* dan 17% disebabkan oleh *Vibrio cholerae*, dan sisanya disebabkan oleh patogen lainnya (Oyofa *et al.*, 2002). Diare merupakan penyakit endemis di Indonesia yang menyebabkan kematian nomor tiga pada anak dan dewasa dengan prevalensi sebesar 9% serta merupakan penyebab kematian nomor satu bagi bayi usia 29 hari-11 bulan dan 12-59 bulan (Rikesdas, 2007). Puspandari *et al.*, (2010) menyatakan bahwa pada periode Mei-Agustus 2008 terdapat kejadian luar biasa penyakit kolera dan shigella yang menyebabkan 105 orang meninggal di Nabire dan Paniai. Data terbaru dari Rikesdas (2018) juga menunjukkan bahwa dari seluruh penyakit infeksi, prevalensi diare di Indonesia mencapai angka 8%, 18,5% terjadi di antaranya terjadi pada bayi.

Melihat besarnya angka kejadian diare, pemerintah telah melakukan upaya untuk mengendalikan diare di Indonesia berupa upaya preventif dan kuratif. Upaya kuratif dikenal dengan LINTAS DIARE (Lima Langkah Tuntaskan Diare) yang telah tersusun di Bulein Diare tahun 2011. LINTAS DIARE terdiri dari pemberian oralit, zinc, ASI/makanan, antibiotika selektif (jika dibutuhkan), dan nasehat (komunikasi informasi edukasi/KIE untuk kembali bila diare semakin parah). Upaya kuratif ini sudah dilaksanakan dengan baik oleh tenaga kesehatan di seluruh Indonesia, namun upaya preventif masih belum maksimal. Hal ini terlihat dari masih buruknya tingkat sanitasi di Indonesia yang mana Indonesia menempati peringkat ke-3 negara yang memiliki sanitasi terburuk setelah Tiongkok dan India (WHO & UNICEF, 2015). Tingkat prevalensi diare pada Rikesdas tahun 2018 juga masih tinggi dengan penurunan prevalensi hanya sebesar 1% dibandingkan dengan data dari 11 tahun yang lalu pada Rikesdas tahun 2007. Dari informasi tersebut, diperlukan upaya preventif lain untuk mencegah terjadinya infeksi yang menyebabkan diare. Mengingat tingginya angka kejadian yang disebabkan oleh *Shigella flexneri* dan kejadian luar biasa yang disebabkan *Vibrio cholerae* sangat penting untuk di kemudian hari dikembangkan adanya vaksinasi yang dapat mengeradikasi *Shigella flexneri* dan *Vibrio cholerae*.

Terdapat beberapa vaksinasi berlisensi untuk kolera namun vaksinasi yang ada mengandung *whole cell* sehingga dapat menyebabkan demam dan rewel pada anak. Vaksinasi untuk shigella saat ini belum tersedia. Vaksinasi untuk penyakit kolera, yang berkembang saat ini di seluruh dunia yang terkenal adalah Sanchol dan Dukoral. Sanchol merupakan vaksinasi yang berisi *inactivated whole cell* bivalen yang mengandung *Vibrio cholerae* serotipe O1 dan

O139 (dengan dosis vaksinasi dua kali dengan jarak vaksinasi antara vaksinasi pertama dan kedua adalah 14 hari (Akter *et al.*, 2019)). Dukoral merupakan vaksinasi yang berisi *inactivated whole cell* yang dikongjugasikan dengan *cholerae toxin subunit B* rekombinan atau *whole cell recombinant B subunit toxin* (WC-rBS) dan merupakan vaksinasi pilihan utama yang digunakan di negara endemis kolera seperti Bangladesh dan Haiti (Akter *et al.*, 2019). Kedua vaksin tersebut memiliki efektivitas yang cukup baik bagi anak >2 tahun dan dewasa. Namun dikarenakan kedua vaksin ini menggunakan *whole cell* maka kedua vaksin ini menghasilkan reaksi lokal yang signifikan di tempat injeksi serta dapat menyebabkan demam tinggi (Akter *et al.*, 2019). Selain itu, dibuat vaksin WC-rBS yang dikombinasikan dengan CVD 103HgR yang dikenal dengan Vaxchora. CVD 103 HgR yang terkandung dalam vaksin tersebut merupakan *Vibrio cholerae* dengan penghapusan gen *cholerae toxin subunit A* sebesar 93%. Vaksin ini pernah diterapkan penggunaannya di Jakarta, namun hasilnya masih kurang memuaskan (Sumarno *et al.*, 2011; Ryan & Calderwood, 2000). Dalam perkembangan vaksin untuk Shigellosis, meskipun telah dilakukan penelitian selama 60 tahun, hingga saat ini belum ditemukan vaksin berlisensi untuk shigellosis (Ashkenazi & Cohen, 2013; Kim *et al.*, 2018). Hal ini dikarenakan *Shigella sp.* memiliki struktur dari O-antigen (Oag) yang berbeda-beda sehingga sulit mengembangkan vaksin dengan LPS (lipopolisakarida) sebagai target spesifik (Kim *et al.*, 2018).

Selain vaksinasi usaha berupa pemberian CTB, yang imunogenik, telah diteliti dan telah terbukti secara kuat menginduksi respon imun (Tokuhara *et al.*, 2010). CTB merupakan protein yang berfungsi untuk mengikat *ganglioside* GM1 pada sel mamalia dengan afinitas yang tinggi. Ditemukan bahwa dengan

menggabungkan antigen ke CTB dan diberikan via oral, respons imun yang terjadi jauh lebih kuat (Guo et al., 2012). Adapun penggunaan CTB yang telah ada saat ini adalah sebagai adjuvan pada vaksin Dukoral dimana CTB yang digunakan adalah CTB yang diproduksi secara rekombinan (Aker et al., 2019).

Dari rangkuman perkembangan vaksin kolera dan shigella ini, dapat dinyatakan bahwa diperlukan pengembangan vaksin baru yang lebih efektif di masa mendatang. Untuk mengembangkan vaksin tersebut, diperlukan pemahaman yang baik dari patogenesis penyakit kolera dan shigella. Patogenesis diawali dengan proses *attachment* (perlekatan antara molekul adhesi pada bakteri dengan reseptor pada enterosit), yang selanjutnya diikuti dengan proses kolonisasi bakteri, pengeluaran produk metabolik, lalu terjadilah diare. Dalam hal ini peneliti melihat potensi untuk mengintervensi pada tahap awal patogenesis yaitu pada proses *attachment* dengan mengembangkan vaksin dari molekul adhesi yang merupakan molekul yang penting dalam proses *attachment*. Sebelumnya telah dibuktikan bahwa pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa merupakan molekul adhesi dan terkonfirmasi dengan uji hemagglutinin (Sumarno, 2000, 2003). Pada penelitian oleh Rabbi et. al. (2008) dinyatakan bahwa terdapat reaksi silang antigenik secara serologis pada komponen permukaan bakteri *Vibrio cholera* O1, *Shigella flexnerii* 2a dan *Haemophilus influenzae* b. Namun pada penelitian tersebut tidak diketahui apakah komponen permukaan yang dimaksud adalah *outer membrane protein* atau pili. Molekul adhesi pada pili *Vibrio cholerae* yang dikongjugasikan dengan CTB telah terbukti berhasil menginduksi s-IgA pada usus mencit dan menghambat sekresi cairan akibat infeksi *Vibrio cholerae* (Sumarno et al., 2011). Dari penelitian Sumarno et. al. (2011) dan Rabbi et. al. (2008), kemudian

dikembangkan lagi penelitian yang lebih besar dengan tujuan untuk mengetahui apakah terjadi reaksi silang antara *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri*. Lanjutan dari penelitian Sumarno *et. al.* tahun 2011 akan dilakukan pada mencit balb/c dengan menganalisa sifat hemagglutinin dan anti-hemagglutinin antara molekul adhesi *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa dan *Shigella flexneri* dengan berat molekul 49,8 kDa/ Selain itu, dilakukan juga analisa efek dari kedua molekul adhesi ini dalam kemampuannya untuk menginduksi respon imun. Adapun parameter yang diukur dalam lanjutan penelitian ini adalah kadar secretory IgA (s-IgA) pada darah, IL-17 pada darah; Th17; dan Treg pada lien mencit dan β -defensin pada usus mencit. s-IgA diukur untuk melihat efek respon imun humoral adaptif terhadap vaksinasi. IL-17, Th-17, dan Treg dianalisa untuk melihat efek respon imun seluler adaptif terhadap vaksinasi. β -defensin diukur untuk melihat respon imun innate terhadap vaksinasi. Vaksinasi dilakukan selama 4 kali yang diberikan setiap minggu selama 28 hari. Selain itu dilakukan juga analisa efek dari penyilangan pada perlakuan yang mana vaksinasi pili *Vibrio cholerae* 37,8 kDa akan diinfeksi dengan *Shigella flexneri*. Dilakukan juga analisa efek vaksinasi pili *Shigella flexneri* 49,8 kDa akan diinfeksi oleh *Vibrio cholerae*. Dari penyilangan perlakuan tersebut, dilihat hasilnya dalam menghambat kolonisasi bakteri dan massa usus. Dari penelitian tersebut, peneliti tertarik untuk meneliti efek molekul adhesi pili *Vibrio cholerae* BM 37,8 kDa dalam membangkitkan respon imun humoral berupa β -defensin dan efek vaksinasi terhadap massa usus mencit balb/c yang diinfeksi *Shigella flexneri* maupun *Vibrio cholerae* dikarenakan belum ada penelitian mengenai hal tersebut.

Parameter β -defensin dipilih karena β -defensin adalah molekul yang diproduksi selama infeksi natural akut oleh *Vibrio cholerae* (Borque et. al., 2018) dan merupakan respon imun host yang dominan diproduksi ketika infeksi *Vibrio cholerae* (Destoumieux-Garzón, 2014). Begitu juga dengan massa usus merupakan parameter yang digunakan untuk merepresentasikan akumulasi cairan dari hewan coba yang diinfeksi dengan suatu bakteri sehingga dapat digunakan untuk mengevaluasi hasil dari pemberian vaksinasi.

1.2. Rumusan Masalah

- 1.2.1. Apakah vaksinasi dengan molekul adhesi pada pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang dikonjugasikan dengan CTB dapat meningkatkan kadar β -defensin mencit?
- 1.2.2. Apakah vaksinasi dengan molekul adhesi pada pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang dikonjugasikan dengan CTB dapat menurunkan massa usus (menghambat progresifitas keluarnya cairan) pada mencit yang diinfeksi *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri*?

1.3. Tujuan Penelitian

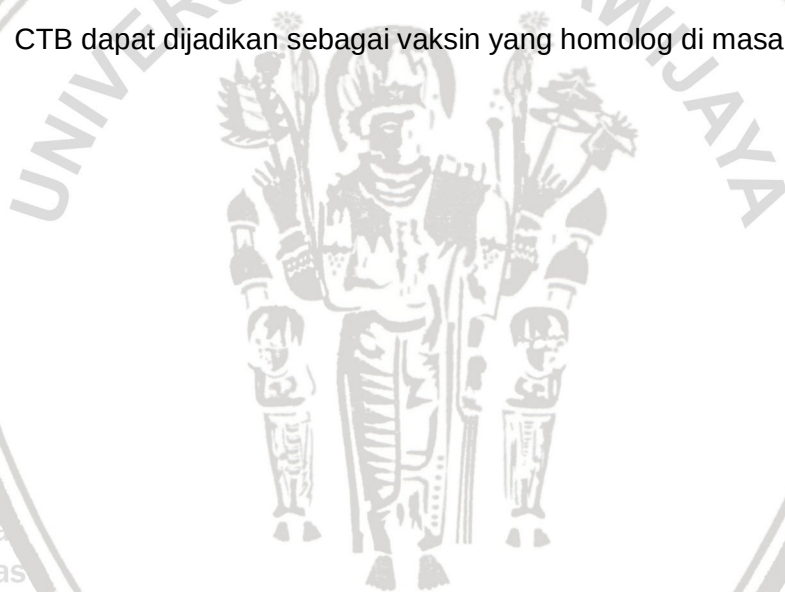
- 1.3.1. Membuktikan bahwa vaksinasi dengan molekul adhesi pada pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang dikonjugasikan dengan CTB dapat meningkatkan kadar β -defensin mencit
- 1.3.2. Membuktikan bahwa vaksinasi dengan molekul adhesi pada pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang dikonjugasikan dengan CTB dapat menurunkan massa usus (menghambat progresifitas

keluarnya cairan) mencit yang diinfeksi *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri*

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Menambah khasanah tentang molekul adhesi pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang dikonjugasikan dengan CTB dalam peranannya untuk membangkitkan repon imun dan menghambat progresifitas keluarnya cairan pada mencit.

1.4.2. Menambah sudut pandang baru bahwa molekul adhesi pada pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang dikonjugasikan dengan CTB dapat dijadikan sebagai vaksin yang homolog di masa mendatang.



BAB II**TINJAUAN PUSTAKA****2.1. Diare****2.1.1. Definisi Diare**

Diare secara umum didefinisikan sebagai kondisi keluarnya feses berwujud cair (tidak normal) yang berhubungan dengan peningkatan frekuensi buang air besar sebanyak tiga kali atau lebih dalam sehari (Navaneethan & Giannella, 2014). Sebagian besar pasien lebih mendasarkan istilah diare pada konsistensi tinja yang cair dibandingkan dengan jumlah frekuensi buang air besar yang meningkat. Pada diet normal berat feses seharusnya 100-200 gram per hari dan pada vegetarian (atau diet tinggi serat) berat feses 300 gram per hari masih termasuk normal (Navaneethan & Giannella, 2014). Apabila berat feses melebihi kriteria tersebut, maka dapat dikatakan diare. Namun kombinasi antara informasi frekuensi, konsistensi feses, dan berat feses harus diperhitungkan untuk menentukan diagnosis diare (Navaneethan & Giannella, 2010, Navaneethan & Giannella, 2014).

Diare dapat diklasifikasikan lebih lanjut secara klinis sebagai diare akut bila memiliki durasi kurang dari 2 minggu, persisten jika memiliki durasi 2-4 minggu, dan kronis jika memiliki durasi >4 minggu. Perbedaan ini penting karena etiologi masing-masing diare berbeda dan pendekatan klinis serta intervensi bervariasi (Navaneethan & Giannella, 2010, 2014).

Diare dapat juga diklasifikasikan sesuai penyebabnya yang terdiri dari diare osmotik dan diare sekretorik. Diare osmotik adalah diare yang disebabkan

karena malabsorpsi makanan yang dimakan, contohnya pada intoleransi laktosa yang menimbulkan malabsorpsi laktosa sehingga menimbulkan gas, nyeri perut, dan feses yang asam (Marcdante *et al.*, 2014). Diare sekretorik terjadi karena sekresi cairan dan elektrolit oleh enterosit yang disebabkan oleh inflamasi karena mikroorganisme (Marcdante *et al.*, 2014). Sejumlah mikroorganisme dapat menyebabkan diare sekretorik. Salah satu mikroorganisme menyebabkan diare dengan memproduksi enterotoksin yang memengaruhi proses penyerapan atau sekresi enterosit tanpa menyebabkan peradangan akut yang hebat atau kerusakan mukosa. Penyebab mikroba untuk diare yang diinduksi enterotoksin salah satu contohnya adalah *Vibrio cholerae* (Navaneethan & Giannella, 2010; Dowling & Yap, 2014).

2.1.2. Epidemiologi Diare

Jumlah kematian anak-anak diperkirakan oleh WHO sekitar 12 juta per tahun pada tahun 1990, yang turun menjadi sekitar tujuh juta pada per tahun tahun 2011 sementara kematian ibu turun dari sekitar 500.000 pada tahun 1990 menjadi di bawah 300.000 pada tahun 2010. Walker *et al.* melakukan penelitian pada tahun 2013 tentang kejadian diare di negara-negara berpenghasilan rendah dan menengah dan memperkirakan bahwa kejadian diare pada anak telah menurun sangat lambat dari 3,4 episode per tahun pada tahun 1990 menjadi 2,9 episode per tahun pada tahun 2010. Kelompok yang paling rentan adalah bayi berusia antara 6 hingga 11 bulan yang mana bisa menderita hingga 4,5 episode per tahun pada 2010 (Walker *et al.*, 2013). Pada tabel 2.1. terlihat bahwa angka mortalitas akibat diare di Asia Tenggara merupakan yang tertinggi kedua setelah Afrika. Angka kematian dapat diturunkan terjadi karena berhasilnya penyebaran informasi tatalaksana berupa rehidrasi oral (Dowling & Yap, 2014). Namun

meskipun terdapat penurunan kematian pada diare, diare tetap penting untuk diwaspadai karena dapat terjadi kapan saja.

Tabel 2.1. Tabel Insidens dan Mortalitas akibat diare pada anak usia 0-4 tahun di daerah yang dinaungi WHO tahun 2010. (Walker et al., 2013)

	Incidence*	Total deaths ('000)
African region	3.3	353.3
American region	3.2	11.0
Eastern Mediterranean region	2.9	96.6
European region	2.8	6.3
Southeast Asian region	2.4	227.7
Western Pacific region	2.2	16.9
World	2.7	711.8

Diare tetap menjadi salah satu penyebab utama kematian anak di bawah usia lima tahun. Namun tidak menutup kemungkinan bahwa usia dewasa juga terkena diare. Secara global, diperkirakan 1,8 juta jiwa yang meninggal karena penyakit diare setiap tahunnya (untuk semua umur), dengan lebih dari 80% adalah anak-anak di bawah usia lima tahun (Dowling & Yap, 2014). Beban penyakit diare sangat berat pada bayi terutama di negara berk embang, yaitu pada keluarga yang berpenghasilan rendah dan menengah. Kematian akibat diare terjadi sebesar 525.000 kematian setiap tahun pada anak di bawah lima tahun (WHO, 2017)

Di Indonesia, diare merupakan penyebab kematian nomor tiga bagi bayi dan balita dengan prevalensi diare sebesar 9% (Rikesdas, 2007). Dari data tersebut, diare merupakan penyebab kematian nomor satu bagi bayi berusia 29 hari-11 bulan dan bayi berusia 1 tahun-5 tahun. Prevalensi diare pada tahun 2018 mencapai angka 8% dari seluruh penyakit infeksi dengan 18,5% terjadi pada bayi (Rikesdas, 2018).

2.1.3. Etiologi Diare

Semua *agent* dapat berkontribusi dalam menyebabkan diare baik itu bakteri, jamur, virus maupun parasit. Patogen penyebab diare tersering di seluruh dunia diantaranya adalah : *Rotavirus* (40%), *E. coli* (25%), *Campylobacter jejunii* (10-18%), dan *Shigella sp.* serta *Salmonella sp.* (5%).

Studi surveilans di Indonesia pada tahun 2002, menjelaskan bahwa dari 587 pasien yang terkena diare, 39% disebabkan oleh *Shigella flexneri* dan 17% disebabkan oleh *Vibrio cholerae*, dan sisanya disebabkan oleh patogen lainnya (Oyofa *et al.*, 2002). Di Indonesia pada periode Mei-Agustus 2008 terdapat kejadian luar biasa penyakit kolera dan shigella yang menyebabkan 105 orang meninggal di Nabire dan Paniai (Puspandari *et al.*, 2010). Hal ini membuktikan bahwa diare yang disebabkan oleh kolera dan shigella sangat perlu diwaspadai serta perlu dieradikasi.

2.1.4. Patogenesis Diare

Semua bakteri yang menyebabkan diare memulai patogenesisnya dengan melakukan proses perlekatan (*adhesi*) yang terjadi antara molekul adhesi pada permukaan mikroorganisme dan reseptor pada usus. Setelah terjadi perlekatan, terjadi kolonisasi dari patogen yang dilanjutkan dengan sekresi toksin atau produksi metabolit dan terjadilah diare (Navaneethan & Giannella, 2014).

Patogenesis penyakit kolera dan shigella diawali dengan proses patogenesis yang sama, yaitu dengan proses *attachment* (perlekatan antara molekul adhesi pada bakteri dengan reseptor pada enterosit), yang selanjutnya diikuti dengan proses kolonisasi bakteri. Tahap selanjutnya berbeda antara *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri*. *Vibrio cholerae* akan mengeluarkan toksin yang

mengaktivasi adenilat siklase yang menghasilkan *cyclic adenosine monophosphate* (c-AMP). Selanjutnya c-AMP menyebabkan keluarnya natrium, klorida, dan air ke lumen usus. Hal ini menyebabkan diare disertai air sehingga feses akan terlihat seperti air cucian beras (*watery diarrhea* atau *water rice diarrhea*) yang apabila terjadi terus menerus akan menyebabkan dehidrasi dan lebih fatalnya kematian akibat syok hipovolemik (Akingbade, 2018; Zeeshan Zafar & Gulzar, 2016). Tidak seperti patogen yang menginvasi jaringan mukosa usus, *Vibrio cholerae* tidak dominan dalam menimbulkan inflamasi, namun lebih dominan dalam menimbulkan respon imun *innate* seperti laktoferin, defensin, dan oksidase (Bourque *et al.*, 2018). *Shigella flexneri* dari awal sudah menginvasi enterosit, lalu memicu inflamasi dengan akumulasi neutrofil yang menyebabkan kerusakan pada jaringan usus (Perez-Lopez *et al.*, 2016). Dalam hal ini peneliti melihat potensi untuk mengintervensi pada tahap awal patogenesis yaitu pada proses *attachment* dengan mengembangkan vaksin dari molekul adhesi yang merupakan molekul yang penting dalam proses *attachment*.

Selain penyebab suatu mikroorganisme, diare dapat disebabkan oleh intoleransi laktosa, alergi susu sapi atau makanan tertentu, imunodefisiensi, dan terapi obat. Intoleransi laktosa terjadi karena kurangnya enzim laktase pada tubuh (Marcdante *et al.*, 2014). Enzim laktase merupakan enzim yang memecah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Bila laktosa tidak terpecah, maka laktosa akan dipecah oleh bakteri pada usus halus melalui proses fermentasi. Proses fermentasi yang ada menimbulkan gas yang menyebabkan kembung dan rasa nyeri pada perut (Marcdante *et al.*, 2014). Selain itu penyebab diare lainnya adalah alergi susu sapi (ASS) yang terjadi dikarenakan terjadinya hipersensitivitas tipe I yang diperantarai oleh IgE dan hal ini menimbulkan

manifestasi klinis berupa diare (50-60%) (Marcdante *et al.*, 2014). Selanjutnya, diare karena imunodefisiensi terjadi karena tubuh gagal untuk menjaga keseimbangan antara supresi dan toleransi ketika terdapat benda asing masuk ke dalam tubuh. Kegagalan ini menyebabkan inflamasi mukosa dan kerusakan jaringan gastrointestinal yang ditandai dengan manifestasi diare (Marcdante *et al.*, 2014).

2.1.5. Tanda dan Gejala Diare

Dalam menentukan diagnosis diare, diperlukan anamnesis yang tepat mengenai tanda dan gejala terjadinya diare. Tanda dan gejala dari diare secara umum adalah sebagai berikut (ICHRC, 2016).

- Konsistensi tinja lembek atau cair
- sakit perut/ kram perut
- frekuensi BAB >3x dalam sehari
- dapat disertai mual muntah
- dapat disertai dehidrasi
- dapat disertai darah pada feses
- dapat berupa diare berair atau seperti air cucian beras
- pusing, lemas, kulit kering

Pada anak, melakukan anamnesis sangat sulit sehingga perlu diwaspadai mengenai terjadinya dehidrasi apabila terjadi diare. Berikut adalah tanda dan gejala dehidrasi pada anak (ICHRC, 2016).

- Rewel atau gelisah
- Letargis/ kesadaran berkurang

- Mata cekung
- Cubitan perut kembali lambat atau sangat lambat
- Haus/minum dengan lahap
- Bila dehidrasi berat anak menjadi malas minum

2.1.6. Diagnosis Diare

Diare secara umum dapat terjadi oleh karena berbagai hal mulai dari karena infeksi hingga non-infeksi. Berikut adalah tabel mengenai kemungkinan diagnosis diare (ICHRC, 2016).

Tabel. 2.2. Tabel Diagnosis Diare

Tanda dan Gejala	Diagnosis
• Diare lebih dari 3 kali sehari berlangsung kurang dari 14 hari • Tidak mengandung darah	Diare Cair Akut
• Diare air cucian beras yang sering dan banyak dan cepat menimbulkan dehidrasi berat, atau • Diare dengan dehidrasi berat selama terjadi KLB kolera, atau • Diare dengan hasil kultur tinja positif untuk <i>V. cholerae</i> O1 atau O139	Kolera
Diare berdarah	Disentri
Diare berlangsung ≥ 14 hari	Diare persisten
Diare setelah mendapatkan pengobatan antibiotik oral spektrum luas	Diare terkait antibiotik
• Dominan darah dan lendir dalam tinja • Massa intrabdominal • Tangisan keras dan kepuatan pada bayi	Invaginasi

2.1.7. Tatalaksana Diare secara Umum

Tatalaksana diare secara umum yang digalakkan oleh Kementerian Kesehatan Indonesia dikenal dengan LINTAS DIARE (Lima langkah tuntas diare). Lima langkah tuntas diare terdiri dari (Soepardi, 2011):

- Pemberian oralit untuk mencegah terjadinya dehidrasi. Pemberian dapat dilakukan di rumah dengan memberikan oralit osmolaritas rendah.
- Pemberian zinc untuk mengurangi lama dan tingkat keparahan diare, mengurangi frekuensi buang air besar, mengurangi volume tinja, serta menurunkan kekambuhan kejadian diare pada 3 bulan berikutnya.
- Pemberian ASI (air susu ibu) atau makanan yang bertujuan untuk memberikan gizi pada penderita terutama pada anak agar tetap kuat dan mencegah menurunnya berat badan.
- Pemberian antibiotika yang hanya diberikan pada diare berdarah (shigellosis) dan diare karena *Vibrio cholerae*.
- Pemberian nasehat yaitu berupa kontrol segera diare lebih sering, terdapat muntah berulang, kondisi sangat haus, makan/minum semakin malas/sedikit, demam, tinja berdarah, tidak membaik dalam 3 hari.

2.1.8. Tatalaksana Diare yang Berkaitan dengan Dehidrasi

Terjadinya diare sangat erat kaitannya dengan dehidrasi. Semua anak dengan diare harus diklasifikasikan status dehidrasinya apakah mengalami dehidrasi berat, dehidrasi ringan-sedang, atau tanpa dehidrasi. Klasifikasi diare dan tatalaksana diare tersebut terdapat pada tabel 2.3.

Tabel 2.3. Tabel Klasifikasi Diare berdasarkan Derajat Dehidrasi

Klasifikasi	Tanda dan Gejala	Tatalaksana
Dehidrasi berat	Terdapat dua atau lebih tanda di bawah ini : • Letargis/tidak sadar • Mata cekung • Tidak bisa minum atau malas minum • Cubitan kulit perut kembali sangat lambat (≥ 2 detik)	Beri cairan untuk diare dengan dehidrasi berat (Rencana Terapi C)
Dehidrasi Ringan-Sedang	Terdapat dua atau lebih tanda di bawah ini : • Rewel/gelisah • Mata cekung • Minum dengan lahap, haus • Cubitan kulit kembali lambat	Beri cairan dan makanan untuk dehidrasi ringan sedang (Rencana Terapi B). Kunjungan ulang dalam waktu 5 hari bila tidak membaik.
Tanpa dehidrasi	Tidak terdapat cukup tanda untuk diklasifikasikan sebagai dehidrasi ringan atau berat	Beri cairan dan makanan untuk menangani diare di rumah (Rencana Terapi A. Kunjungan ulang dalam waktu 5 hari bila tidak membaik.



Gambar 2.1. Rencana Terapi C Diare Dehirasi Berat. Pada gambar telah dijelaskan bahwa apabila menemui dua atau lebih dari empat kriteria diare dehidrasi berat maka akan dilakukan rencana terapi C berupa pemberian cairan untuk rehidrasi secara IV sesuai usia serta memberikan oralit dan zinc.



Gambar 2.2. Rencana Terapi B Diare Dehirasi Ringan-Sedang. Pada gambar telah dijelaskan bahwa apabila menemui dua atau lebih dari empat kriteria diare dehidrasi ringan maka akan dilakukan rencana terapi B berupa pemberian oralit sesuai dosis di atas, meneruska ASI/makanan, serta memberikan zinc.

Diare tanpa dehidrasi
Bila terdapat dua tanda atau lebih
Keadaan Umum baik, sadar
Mata tidak cekung
minum biasa, tidak haus
Cubitan kulit perut / turgor kembali segera

A

RENCANA TERAPI A UNTUK TERAPI DIARE TANPA DEHIDRASI
MENERANGKAN 5 LANGKAH TERAPI DIARE DI RUMAH
1. BERI CAIRAN LEBIH BANYAK DARI BIASANYA
• Teruskan ASI lebih sering dan lebih lama • Anak yang mendapat ASI eksklusif, beri oralit atau air matang sebagai tambahan • Anak yang tidak mendapat ASI eksklusif, beri susu yang biasa diminum dan oralit atau cairan rumah tangga sebagai tambahan (kuah sayur, air tajin, air matang, dsb) • Beri Oralit sampai diare berhenti. Bila muntah, tunggu 10 menit dan dilanjutkan sedikit demi sedikit. - Umur < 1 tahun diberi 50-100 ml setiap kali berak - Umur > 1 tahun diberi 100-200 ml setiap kali berak. • Anak harus diberi 6 bungkus oralit (200 ml) di rumah bila: - Telah diobati dengan Rencana Terapi B atau C. - Tidak dapat kembali kepada petugas kesehatan jika diare memburuk. • Ajari ibu cara mencampur dan memberikan oralit.

Gambar 2.3. Rencana Terapi A Diare Tanpa Dehidrasi. Pada gambar telah dijelaskan bahwa apabila menemui dua atau lebih dari empat kriteria diare tanpa dehidrasi maka akan dilakukan rencana terapi A berupa pemberian cairan, pemberian ASI lebih sering, dan pemberian oralit sesuai usia.

2.1.9. Pencegahan Diare secara Umum

Pencegahan diare secara umum sesuai dengan buletin diare yang dibuat oleh Kementerian Kesehatan Indonesia pada tahun 2011 dilakukan dengan (Soepardi, 2011):

- Menghindari makanan dan minuman yang tidak bersih
- Mencuci tangan dengan air dan sabun sebelum makan dan sesudah buang air besar.
- Merebus air minum
- Menggunakan air bersih untuk memasak
- Buang air besar di jamban

Selain itu, untuk mencegah terjadinya penyakit yang dapat ditularkan melalui air, maka penyediaan air bersih baik secara kualitas maupun kuantitas

diperlukan untuk memenuhi kebutuhan sehari-hari baik untuk menjaga kebersihan diri sendiri (*hygiene*) maupun kebersihan lingkungan (*sanitation*).

Disamping itu, perilaku hidup bersih dan sehat (PHBS) harus tetap dilaksanakan (Soepardi, 2011).

2.2. Penyakit Kolera

2.2.1. Definisi dan Epidemiologi Kolera

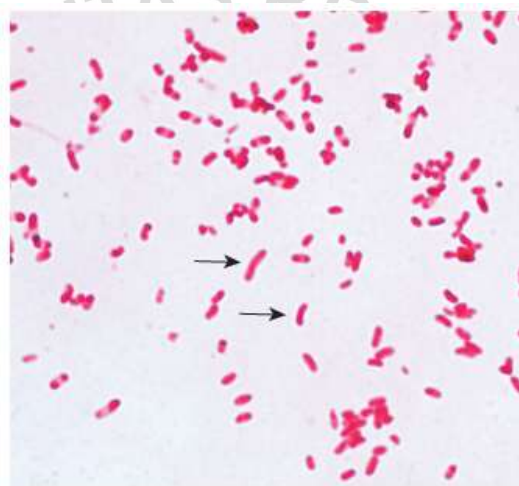
Definisi dari kolera adalah penyakit yang ditandai dengan diare berair yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae*. merupakan penyakit yang endemis di negara berkembang dengan kepadatan penduduk yang tinggi (Penrose *et al.*, 2010). Kolera endemik di lebih dari 50 negara dan juga dapat bermanifestasi sebagai epidemi, seperti yang baru-baru ini terjadi di Haiti (2010-sekarang) yang merupakan sebuah negara yang sebelumnya tidak pernah terkena kolera (Leung *et al.*, 2012; Orata *et al.*, 2014; Piarroux & Faucher, 2012). Epidemi kolera disebarkan terutama oleh air yang terkontaminasi dalam kondisi sanitasi yang buruk, terutama di mana tidak terdapat atau rusaknya pengolahan limbah (Orata *et al.*, 2014). Bencana alam (mis., banjir, angin musim, dan gempa bumi) juga berperan dalam penyebaran epidemi kolera (Orata *et al.*, 2014). Kolera pandemik di anak benua India dan Afrika dan selama dua abad terakhir penyebarannya ke luar daerah ke bagian lain di Asia, Indonesia, dan Eropa telah digambarkan dalam delapan pandemi besar, masing-masing berlangsung selama 5 hingga 25 tahun (Moore *et al.*, 2014). Insiden kolera di dunia dilaporkan meningkat dari tahun 2007 hingga mencapai puncaknya sekitar 600.000 kasus pada tahun 2011 (Baldauf *et al.*, 2015). Pada tahun 2012, jumlah kasus yang dilaporkan menurun menjadi sekitar 245.000 dengan 49% dari kasus yang disebabkan oleh wabah

yang sedang berlangsung di Haiti dan Republik Dominika. Namun, WHO memperkirakan jumlah kejadian secara global sebenarnya dari kolera yaitu antara 3-5 juta kasus per tahun dengan angka kematian sekitar 100.000 hingga 130.000 kematian per tahunnya (Baldauf *et al.*, 2015). Meskipun penyakit kolera yang simptomatik dapat terjadi pada semua umur, namun penyakit ini lebih banyak mengenai anak-anak (Ashkenazi *et al.*, 2016). Berdasarkan data di laman WHO, diare yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae* memiliki angka kejadian sekitar 1,3 juta hingga 4 juta dan angka kematian adalah sebesar 21.000-143.000 jiwa per tahun (WHO, 2019).

Adapun *strain* dominan abad ke-20 adalah biotipe *El Tor*, yang pertama kali diisolasi dari jemaah haji di perkemahan karantina *El Tor* pada tahun 1905. *Strain* ini bertahan sedikit lebih lama di alam dan menghasilkan kasus kolera subklinis. Pada tahun 1992, kasus kolera pertama karena serotipe selain O1 terdeteksi di India dan Bangladesh. Serotipe baru (O139 Bengal) sangat virulen dengan kemampuan untuk menghasilkan penyakit pada orang yang telah terpapar oleh serotipe lama. Perkembangan ini penting untuk mengetahui persebaran kolera secara global dan untuk membentuk strategi vaksin yang dirancang untuk mencegah terjadinya kolera (Moore *et al.*, 2014). WHO mengingatkan perlunya kesadaran akan penyebaran *strain* resisten antibiotik *Vibrio cholerae*. Hal ini telah ditunjukkan dengan *Vibrio cholerae* O139 dan beberapa isolat dari *Vibrio cholerae* O1 *El Tor*, yang telah resisten terhadap antibiotik kotrimoksazol dan streptomisin (Harris *et al.*, 2012). Hal ini menunjukkan bahwa kolera merupakan penyakit yang masih muncul dan memerlukan adanya usaha dalam eradikasi.

2.2.2. Etiologi Penyakit Kolera

Etiologi dari penyakit kolera adalah *Vibrio cholerae*. *Vibrio cholerae* merupakan pathogen gram negatif akuatik fakultatif yang *straight* anaerob berbentuk koma dengan ukuran 2-4 μm . *Vibrio cholerae* aktif bergerak dengan menggunakan flagellum polar (Ryan & Ray, 2003). *Vibrio* adalah salah satu bakteri paling umum yang terisolasi di perairan laut dan muara seluruh dunia (Riedel et al., 2019).



Gambar 2.4. Hasil pewarnaan gram pada *Vibrio cholerae*. Terlihat bakteri batang yang sedikit bengkok (berbentuk koma) berwarna merah yang menandakan bakteri gram negatif (Riedel et al., 2019).

Vibrio cholerae dapat tumbuh dalam kisaran suhu yang luas (14–40°C) dan semua spesies membutuhkan natrium klorida (NaCl) untuk tumbuh (Riedel et al., 2019). *Vibrio cholerae* menghasilkan koloni dengan permukaan cembung, halus, bulat serta opaque dan granuler. *Vibrio cholerae* tumbuh dengan baik pada suhu 37°C pada media agar rutin (misalnya, agar darah dan agar MacConkey). Agar selektif untuk spesies *Vibrio* yaitu media agar *thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose* (TCBS) dan *enrichment broth* (misalnya *alkaline peptone broth*) digunakan terutama apabila spesimen (misalnya tinja) diperoleh

dari spesimen yang mengandung banyak campuran bakteri. *Vibrio cholerae* tumbuh dengan baik pada media TCBS. *Vibrio cholerae* menghasilkan koloni berwarna kuning (yang tandanya memfermentasi sukrosa) pada agar TCBS yang mudah terlihat karena kontras dengan warna hijau-gelap dari agar TCBS. *Vibrio cholerae* tumbuh pada pH yang sangat tinggi (pH 8,5-9,5) dan mudah terbunuh oleh suasana asam. *Vibrio cholerae* memfermentasi sukrosa dan manosa tetapi tidak memfermentasi arabinosa dan positif pada test oksidase. (Riedel et al., 2019).



Gambar. 2.5. Koloni *Vibrio cholerae* yang terbentuk pada media agar TCBS. *Vibrio cholerae* adalah koloni yang berwarna kuning. Koloni memiliki diameter 2-3 mm dan plate berukuran diameter 10 cm. (Riedel et al., 2019).

Struktur antigenik *Vibrio cholerae* terdiri dari H antigen dan O antigen. H antigen terdapat pada flagella, yang labil terhadap suhu panas. *Vibrio cholerae* dan spesies *Vibrio* lainnya saling berbagi H antigen. *Vibrio cholerae* memiliki O lipopolysaccharides yang memberikan spesifisitas secara serologis. Antibodi terhadap antigen O cenderung melindungi hewan coba dari infeksi *Vibrio cholerae*. Berdasarkan antigen O, ada lebih dari 200 serogrup *Vibrio cholerae*.

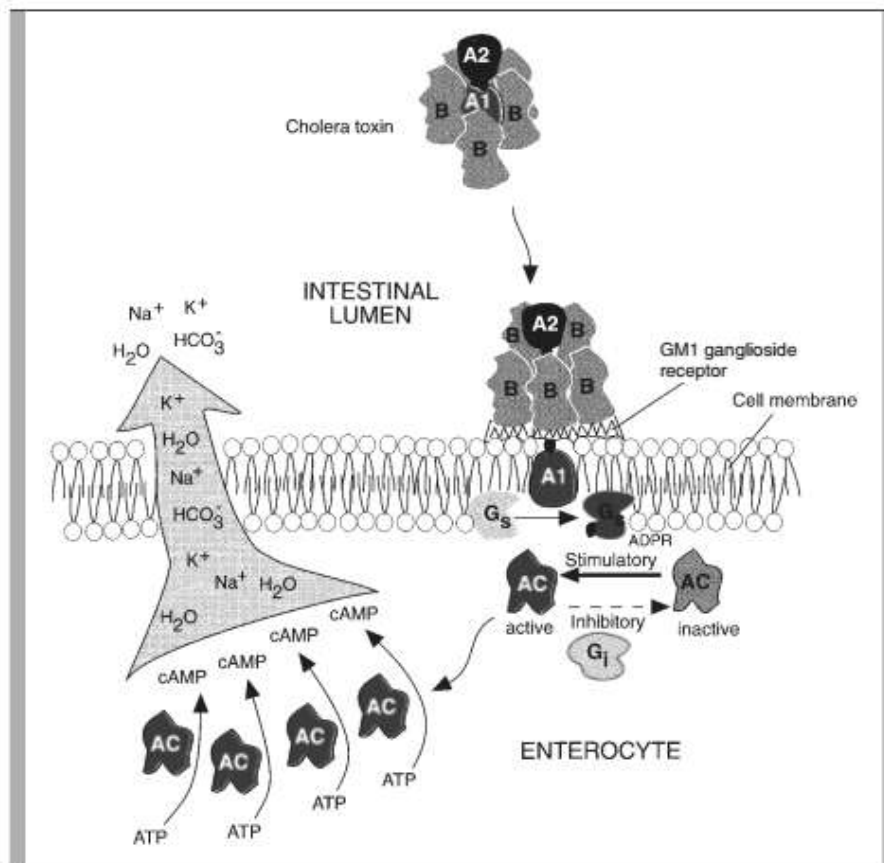
Namun, hanya strain *Vibrio cholerae* dari serogroup O1 dan O139 yang menyebabkan epidemi dan pandemi kolera. Strain O139 sendiri sudah jarang ditemukan pada kasus penyakit kolera dan O1 lebih banyak dijumpai. Strain O1 terbagi dalam tiga serotipe, yaitu Ogawa, Inaba, dan Hikojima (Riedel et al., 2019). Strain O1 juga terbagi dalam dua biotipe, yaitu *El tor* dan klasik. *El tor* merupakan biotipe penyebab pandemi kolera ketujuh, menggantikan biotipe klasik yang merupakan penyebab pandemi ke-enam sejak tahun 1961 (Leung et al., 2012). Biotipe *El tor* menghasilkan hemolisin yang memberikan hasil positif pada tes *Voges-Proskauer* dan resisten terhadap *Polimyxin B*. Biotipe *El tor* ini mirip dengan *Vibrio cholerae* strain O139. *Vibrio cholerae* strain O139 tidak memproduksi lipopolisakarida O1 namun memproduksi kapsul polisakarida. *Vibrio cholerae* O1 tidak memproduksi kapsul polisakarida (Riedel et al., 2019).

2.2.3. Patogenesis Kolera

Menelan 5 µg toksin kolera sudah cukup untuk menyebabkan gejala kolera (Levine et al., 1983; Harris, 2018). Dan menelan 10^{10} *Vibrio cholerae* dapat menyebabkan seseorang dengan asiditas lambung yang normal terinfeksi kolera (Riedel et al., 2019). Kolera lebih mungkin menginfeksi pada makanan atau minuman yang terkontaminasi dibandingkan dengan kontak langsung dari orang ke orang (Leung et al., 2012; Riedel et al., 2019). Setelah *Vibrio cholerae* masuk ke dalam tubuh, bakteri lalu berikatan (*attachment*) dengan enterosit.

Proses *attachment* merupakan tahap awal yang dilakukan oleh pili *Vibrio cholerae* (Sumarno et al., 2011). *Vibrio cholerae* selanjutnya melakukan penetrasi pada permukaan mukosa usus halus (Millet et al., 2014). Proses selanjutnya adalah proses kolonisasi oleh bakteri. *Vibrio cholerae* lalu menghasilkan enterotoksin yang labil terhadap panas dengan berat molekul (BM) sekitar 84.000 yang terdiri

dari subunit A (BM 28.000) dan subunit B (CTB), CTB berikatan dengan reseptor ganglioside GM1 yang terdapat pada permukaan mukosa usus yang memfasilitasi masuknya toksin sub-unit A. Aktivasi dari sub-unit A akan mengaktifkan protein regulator Gs (*G stimulatory*) yang merubah adenilat siklase yang inaktif menjadi aktif. Enzim adenilat siklase menyebabkan *adenosine triphosphate* (ATP) menjadi *cyclic AMP* (c-AMP). Meningkatnya c-AMP intraseluler akan menyebabkan hipersekresi dari air dan elektrolit seperti natrium (Na^+), klorida (Cl^-), kalium (K^+), dan bikarbonat (HCO_3^-) ke lumen usus (Ryan & Ray, 2003; Riedel *et al.*, 2019). Proses inilah yang menyebabkan terjadinya diare berair dengan volume 20-30 L per hari (Sumarno *et al.*, 2011; Gill, 1976; Epstein *et al.*, 1989; Janicot *et al.*, 1991; Riedel *et al.*, 2019). Selain itu elektrolit yang telah keluar tidak bisa masuk kembali karena terdapat inhibisi absorpsi natrium dan klorida, sehingga diare selain mengandung banyak air, juga mengandung banyak elektrolit yang dapat menyebabkan dehidrasi, syok hipovolemik, asidosis, dan kematian (Riedel *et al.*, 2019).



Gambar 2.6. Patogenesis dari infeksi *Vibrio cholerae* pada enterosit. Dimulai dari ikatan antara cholerae toxin sub-unit B (CTB) dengan ganglioside respoter GM1 yang selanjutnya mengaktifkan cholerae toxin subunit A (A1) dan memicu katalisis ADP-ribosylation dari Gs (protein regulator G *stimulatory*) yang selanjutnya mengaktifasi adenilat siklase (AC) sehingga menyebabkan akumulasi cAMP. Akumulasi cAMP menyebabkan keluarnya air dan elektrolit (Ryan *et al.*, 2004).

Tidak seperti patogen yang menginvasi jaringan mukosa usus, *Vibrio cholerae* tidak menyebabkan inflamasi yang dominan, namun menimbulkan respon imun innate seperti laktoferin, *defensin*, dan oksidase (Bourque *et al.*, 2018). *Vibrio cholerae* menginduksi kekebalan jangka panjang pada sebagian besar orang yang sembuh dari infeksi (Harris, 2018).

2.2.4. Tanda dan Gejala Kolera

Vibrio cholerae membentuk kolonisasi pada usus halus dan menyebabkan diare profus akut yang berair (*watery diarrhea*) atau diare “air cucian beras” (*water-rice-stool*) (Nguyen *et al.*, 2017). Diare yang disebabkan kolera dapat disertai dengan dehidrasi berat yang dapat mengakibatkan kematian (Zuckerman, Rombo dan Fisch, 2007). Gejala yang dialami orang terinfeksi oleh *Vibrio cholerae* dapat bervariasi mulai dari asimtomatik, diare berair dalam jumlah banyak, hingga kematian dalam beberapa jam sejak onset terjadinya diare berair dalam jumlah besar. Kematian yang terjadi merupakan akibat dari adanya syok hipovolemik karena menurunnya volume cairan tubuh (Nguyen *et al.*, 2017). Adapun pasien dengan diare yang diinduksi enterotoksin umumnya memiliki beberapa tanda atau gejala sistemik seperti kram perut, mual, muntah, dan biasanya tidak demam (Navaneethan & Giannella, 2014).

2.2.5. Diagnosis Kolera

Untuk mendiagnosis penyakit kolera, dibutuhkan pengetahuan yang memadai mengenai tanda dan gejala kolera serta pemeriksaan fisik yang benar untuk menyingkirkan *differential diagnosis*. Kultur feses merupakan *gold standard* dalam mendiagnosis kolera (CDC, 2019).

Dalam mendiagnosis kolera dengan kultur sebagai *gold standard*, spesimen berupa feses diambil saat tahap awal terjadinya kolera dan harus diinokulasikan 2-4 jam pasca pengambilan spesimen ke agar yang tepat. Apabila dalam memproses spesimen tidak bisa sesegera mungkin, spesimen harus dicampur dengan medium transpor Cary Blair. Selain itu, *Vibrio cholerae* juga dapat langsung diamati (dari spesimen atau dari *enrichment broth*) dengan

menggunakan *dark field* mikroskop. Pada *Vibrio cholerae* O1 akan didapatkan gambaran *shooting star* setelah diberikan antiserum O1. Apabila tidak terdapat motilitas setelah pemberian antiserum O1, maka merupakan *Vibrio cholerae* selain O1 (Riedel *et al.*, 2019).

Lalu seperti yang sudah dijelaskan sebelumnya, *Vibrio cholerae* dapat ditumbuhkan pada media MacConkey, agar darah, TCBS, dan *alkaline peptone broth*. Namun beberapa *strain Vibrio cholerae* juga dapat terinhibisi di media MacConkey. Pertumbuhan akan cepat pada agar TCBS atau pada *alkaline peptone broth* atau di air, yang mengandung 1% NaCl dengan pH 8,5 (Riedel *et al.*, 2019).

Adapun deteksi cepat pada *Vibrio cholerae* dapat dilakukan dengan *immunofluorescence*, *latex agglutination*, dan analisis koagulasi. *Vibrio cholerae* lalu diidentifikasi dengan menggunakan *slide agglutination test* menggunakan antisera *anti-O* grup 1 atau *anti-O* grup 139 dan menggunakan pola reaksi biokimia. Terdapat juga *rapid immunochromatographic dipstick test* yang sensitif dan spesifik namun penggunaannya dilaporkan masih kurang akurat (Riedel *et al.*, 2019; CDC, 2019).

2.2.6. Tatalaksana Kolera

Penanganan pada penyakit kolera adalah dengan mengganti cairan yang keluar dan mengoreksi ketidakseimbangan elektrolit dengan cairan yang mengandung air, garam, gula yang diberikan per oral atau cairan infus isotonis yang diberikan secara intravena untuk mencegah atau mengatasi syok hipovolemik (Sack *et al.*, 2004). Antibiotik penting diberikan pada diare berat untuk mengurangi masa rawat inap rumah sakit dan mengatasi patogen (Leung

et al., 2012). Pemilihan antibiotik harus didasarkan pada profil resistensi antimikroba fasilitas kesehatan setempat. Terapi yang disarankan adalah Doksisisiklin 300 mg dosis tunggal (Guerrant et al., 2001). Tetrasiklin 4x500 mg telah terbukti sebagai obat yang sangat efektif untuk kolera (Guerrant et al., 2001), dan umumnya memiliki kemanjuran yang lebih baik dibandingkan dengan klorampenikol. Eritromisin atau azitromisin adalah pilihan terapi antibiotik yang tepat untuk digunakan pada anak-anak dan wanita hamil. Adapun agen antimikroba lain yang juga efektif adalah trimetoprim-sulfametoksazol 2x960mg (Guerrant et al., 2001), fluorokuinolon, dan doksisisiklin (Riedel et al., 2019). Peningkatan resistensi antimikroba pada *Vibrio cholerae* telah dilaporkan secara global secara khusus, di daerah-daerah di mana kolera endemik atau epidemi terjadi. Resistensi terhadap tetrasiklin telah dilaporkan meningkat. Gen resistansi terhadap tetrasiklin tersebut dibawa oleh plasmid yang dapat diturunkan (Riedel et al., 2019).

2.2.7 Perkembangan Vaksin Kolera

Vaksin kolera pertama dibuat oleh Robert Koch. Robert Koch melaporkan penemuan dan isolasi kolera basil pada tahun 1884. Dalam satu tahun vaksin kolera pertama, yaitu injeksi *Vibrio cholerae* yang telah dikultur namun tidak dilemahkan (*cultured unattenuated*), diuji selama wabah di Valencia, Spanyol. Vaksin ini memiliki efek perlindungan 80% (Bornsides, 1981). Selanjutnya beberapa vaksin sel utuh yang tidak aktif (*whole cell inactivated*) dikembangkan, yang menghasilkan perlindungan jangka pendek serta reaksi lokal yang signifikan di tempat injeksi. Vaksin ini juga menyebabkan tingginya tingkat demam dan malaise pada orang yang melakukan vaksinasi (Ryan & Calderwood, 2000).

Pada tahun 1985 digelar uji coba lapangan besar di Bangladesh mengenai efek vaksinasi *whole cell-cholerae toxin B* (WC-CTB) dimana subunit B diproduksi oleh ekstraksi kimia, bukan dari teknologi rekombinan. Studi ini terdiri dari 89.596 subjek usia 2-15 tahun dan wanita berusia >15 tahun. Subjek secara acak menerima tiga dosis, dengan interval 6 minggu. Kelompok dari studi ini adalah : *whole cell-cholerae toxin B* (WC-CTB), *whole cell* (WC) saja dengan konstituen seluler yang sama dengan WC-CTB tetapi tanpa CTB, dan plasebo *E. coli* yang dimatikan. Dalam uji coba ini, perlindungan keseluruhan oleh WC-CTB adalah 85% selama 4-6 bulan pertama, 62% selama tahun pertama, dan 57% selama tahun kedua. Vaksinasi melindungi orang dewasa dan anak-anak usia >5 tahun selama 3 tahun dan anak-anak <5 tahun selama kurang lebih 6 bulan. Efektivitas untuk dosis ganda serupa dengan rejimen tiga dosis. Perlindungan silang terhadap diare yang disebabkan oleh LT-ETEC (*heat-labile toxin* (LT)-*enterotoxigenic Escherichia coli*) terjadi pada subjek yang diberikan vaksin WC-CTB (Clemens *et al.*, 2018).

Tabel. 2.4. Tabel efek vaksinasi *whole cell-cholerae toxin B* (WC-CTB) dan *whole cell* (WC). Penelitian dilakukan pada semua umur selama 3 tahun *follow up*. Tabel menunjukkan semakin bertambahnya umur, efek perlindungan semakin kecil (Clemens *et al.*, 2018).

Follow-up Period	Protective Efficacy by Age Group					
	WC-CTB			WC		
	All Ages	2-5 Years	>5 Years	All Ages	2-5 Years	>5 Years
4 to 6 months	85% (62%) ^c	100%	76%	58% (14%)	35%	71%
First year	62% (50%)	31%	78%	53% (38%)	31%	67%
Second year	57% (42%)	24%	61%	57% (42%)	24%	73%
Third year	17% (-15%)	2%	40%	43% (19%)	2%	62%

Vaksin kolera yang saat ini tersedia termasuk vaksin kolera oral yang berasal dari sel utuh *Vibrio cholera* yang dimatikan (*whole cell killed*). Namun, vaksin oral kolera ini cenderung kurang efektif dalam memberi kekebalan protektif pada anak-anak (<5 tahun), yang mana merupakan usia paling rentan terhadap diare yang disebabkan kolera (Sit *et al.*, 2019; Qadri *et al.*, 2018). Vaksin kolera oral memberikan perlindungan sebesar 66% pada studi *follow up* selama 3 tahun di Kolkata dan India dengan perlindungan bagi anak usia <5 tahun sebesar 43% (Sur *et al.*, 2011). Dua vaksin oral kolera yang berlisensi diantaranya adalah Dukoral (Crucell, Swedia) dan Sanchol (Shantha Biotechnics, India).

Dukoral mengandung *whole cell killed Vibrio cholerae* dari biotipe *El tor* dan klasik dari *strain* O1 dengan adjuvan berupa 1 mg CTB rekombinan (WC-rBS). Dukoral telah digunakan sebagai vaksinasi yang memberikan perlindungan sebesar 85% selama 6 bulan pertama setelah vaksinasi. Tetapi perlindungan ini menurun hingga 50% pada 3 tahun *follow up* dalam uji coba lapangan besar di Bangladesh (Aker *et al.*, 2019). Pada anak-anak berusia 2-5 tahun, Dukoral diberikan dalam tiga dosis secara oral dalam rentang antar pemberian vaksinasi minimal 1 minggu sekali. Dukoral tidak diperuntukkan bagi anak berusia di bawah 2 tahun dikarenakan efektivitasnya yang rendah (Ryan & Calderwood, 2000; Harris, 2018).

Sanchol adalah vaksin bivalen *whole cell killed* yang mengandung kedua biotipe klasik dan *El Tor Vibrio cholerae* O1 serta O139, tanpa adanya CTB (WC *bivalent*). Sanchol telah menunjukkan hasil yang baik dalam mencegah penyakit di daerah endemis dan sebagai agen reaktif untuk membatasi kolera selama epidemi (Sit *et al.*, 2019). Selain itu, Sanchol juga memiliki harga yang lebih

terjangkau. Namun berdasarkan penelitian terbaru penggunaan dosis ganda Sanchol menunjukkan rendahnya efek *boosting* pada dosis kedua (Akter *et al.*, 2019). Dalam penelitian lain, telah ditunjukkan bahwa dosis tunggal Shanchol di Bangladesh memberikan perlindungan sebesar 59% pada anak usia > 15 tahun dan orang dewasa (setidaknya selama 2 tahun) yang dianggap telah memiliki kekebalan alami (*natural immunity*) yang sebelumnya telah ada untuk kolera ketika divaksinasi (Capeding *et al.*, 2017; Kanungo *et al.*, 2009). Tetapi tidak ada bukti ilmiah bahwa vaksinasi dosis tunggal baik untuk perlindungan jangka panjang dan juga pada anak di bawah 5 tahun.

Terdapat juga vaksin CVD 103 HgR yang merupakan vaksin yang dibentuk dari *Vibrio cholerae* strain O1 Inaba dengan penghapusan gen *cholerae toxin sub-unit A* sebanyak 94% tetapi CTB tetap utuh, dan dengan kaset tahan merkuri (*mer*) dimasukkan ke dalam gen untuk hemolysin (Levine *et al.*, 1988). Pada penelitian diketahui bahwa respons antibodi serum vibriocidal pada sukarelawan Amerika yang diimunisasi dengan CVD 103-HgR sekitar dua pertiga dari sukarelawan yang tidak divaksinasi namun diinfeksi dengan *Vibrio cholerae*, yang menunjukkan bahwa respons vaksin tidak sekuat yang dipicu oleh infeksi alami (Levine *et al.*, 1988). Penerapan dari vaksin ini di Jakarta (Indonesia) hasilnya masih kurang memuaskan (Simanjuntak *et al.*, 1993).

Selain vaksinasi usaha berupa pemberian CTB saja, yang imunogenik, dilakukan dalam eradikasi diare. CTB merupakan protein yang non-toksik yang berfungsi untuk mengikat *ganglioside* GM1 pada sel mamalia dengan afinitas yang tinggi. Penggunaan CTB telah terbukti secara kuat menginduksi respon imun diberikan melalui rute intranasal tetapi kurang kuat ketika diberikan secara oral. Namun pemberian CTB melalui intranasal berpotensi menimbulkan Bell's

palsy. Lalu ditemukan bahwa dengan menggabungkan antigen ke CTB dan diberikan via oral, respons imun yang terjadi jauh lebih kuat (Guo et al., 2012).

Adapun penggunaan CTB yang telah ada saat ini adalah sebagai adjuvan pada vaksin Dukoral dimana CTB yang digunakan adalah CTB yang diproduksi secara rekombinan (Akter et al., 2019).

2.3. Shigellosis

2.3.1. Definisi dan Epidemiologi Shigellosis

Shigellosis adalah penyakit yang ditandai dengan diare berlendir dan berdarah yang disebabkan oleh *Shigella* sp. Shigellosis adalah penyakit endemik yang terjadi terutama di negara-negara berkembang. Penyakit ini menyebabkan 120 juta kasus disentri berat setiap tahun dan diperkirakan menyebabkan 700.000 kematian. Sekitar 60% kematian diderita oleh anak-anak di bawah lima tahun (Ying et al., 2005). *Shigella* adalah salah satu patogen enterik terbanyak dan secara global terkait dengan 164.300 kematian akibat diare pada semua kelompok umur termasuk 54.900 kematian akibat diare pada anak di bawah 5 tahun (Lozano et al., 2012; Liu et al., 2016; Hosangadi et al., 2018). *Shigella flexneri* adalah spesies yang paling sering diisolasi di seluruh dunia, dikarenakan untuk sebagian besar kasus di negara-negara yang kurang berkembang, sedangkan *Shigella sonnei* lebih umum di negara-negara berpenghasilan rendah dan menengah (negara maju) (Mani et al., 2016). Adapun negara yang merupakan endemis *Shigella* adalah Bangladesh, Pakistan, dan Afrika (Herwana et al., 2010). *Shigella flexneri* 2a, 3a, 6, dan *Shigella sonnei* bersama-sama mencakup sekitar 80% dari strain yang menyebabkan shigellosis (Mani et al., 2016).

Diare yang disebabkan *Shigella flexneri* menyumbang sekitar 600.000 kematian per tahunnya di seluruh dunia (CDC, 2019). Antibiotik dapat secara efektif mengobati shigellosis tetapi kemunculan resistensi antibiotik menjadikan pengembangan vaksin *Shigella* sebagai prioritas kesehatan masyarakat. Oleh karena itu, WHO telah menjadikan pengembangan vaksin *Shigella* yang efektif merupakan prioritas utama (Von Seidlein et al., 2006; Ouyang-Latimer et al., 2011; Tribble, 2017)

Ketika menilai kematian terkait *Shigella*, meskipun ada perbedaan dalam metodologi dalam penelitian (tinjauan literatur sistematis versus ulasan vital 187 negara), dua penelitian terbaru menghasilkan perkiraan kematian global akibat shigellosis yang sama untuk anak-anak berusia kurang dari lima tahun, yaitu 28.000 kematian pada 2011 oleh *Child Health Epidemiology Reference Group* dan 34.400 kematian pada 2013 oleh *Institute for Health Metrics and Evaluation* (IHME) (Vos et al., 2015; Lanata et al., 2013). Mendukung temuan ini, IHME juga memperkirakan 40.500 kematian pada tahun 2013 dari infeksi *Shigella* pada dewasa berusia lebih dari lima tahun (Naghavi et al., 2015).

Di negara endemik berpenghasilan rendah dan menengah dengan akses yang tidak memadai ke sanitasi yang layak, air bersih, dan pilihan pengobatan untuk diare berat yang mungkin telah resisten terhadap antibiotik umum, vaksin *Shigella* akan menjadi pilihan ideal dalam manajemen penyakit diare. Lalu, dikarenakan patogen enterik lain juga dapat menyerang anak-anak di awal kehidupan, tujuan penting lain untuk vaksin *Shigella* adalah kompatibilitas untuk kombinasi dengan vaksin enterik lain yang diberikan dengan rute yang sama.

2.3.2. Etiologi Shigellosis

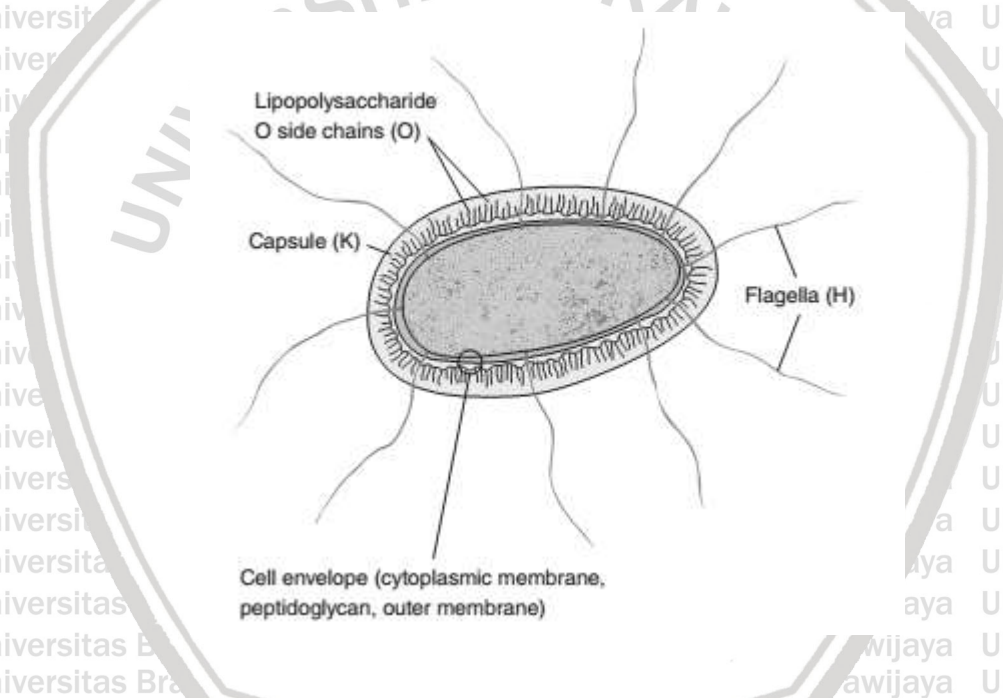
Shigella sp. merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang yang tidak membentuk spora, fakultatif anaerob (namun tumbuh paling baik secara aerob), non-motil yang merupakan penyebab penyakit disentri atau shigellosis (Ryan et al., 2004). Ada empat spesies, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*, dan lebih dari 50 serotipe *Shigella*. *Shigella flexneri* terdiri dari 16 serotipe, *Shigella sonnei* terdiri dari 1 serotipe, *Shigella boydii* terdiri dari 19 serotipe, dan *Shigella dysenteriae* terdiri dari 15 serotipe (Barry et al., 2013).

Habitat alami *Shigellae* terbatas pada saluran usus manusia dan saluran usus primata lain, di mana *Shigella* menghasilkan disentri basiler (Riedel et al., 2019).

Spesies patogen *Shigella* sp. terdiri dari *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* dan *Shigella boydii*. (Drancourt, 2017). *Shigella* terkait erat dengan *E. coli* dan banyak berbagi antigen umum satu sama lain dan dengan bakteri enterik lainnya (Riedel et al., 2019).

Shigelle spp. berasal dari kingdom *Bacteria*, filum *Proteobacteria*, kelas *Gammaproteobacteria*, ordo *Enterobacterales*, famili *Enterobacteriaceae*. *Enterobacteriaceae* adalah bakteri terbesar, yang memiliki ukuran 2 - 4 mikrometer dan lebar 0,4 - 0,6 mikrometer, dengan sisi paralel dan ujung membulat. Dinding sel, membran sel, dan struktur internal untuk semua *Enterobacteriaceae* secara morfologis mirip. Komponen dinding dan permukaan sel, yang bersifat antigenik, telah dipelajari secara luas dalam beberapa genera dan membentuk dasar sistem yang membagi spesies menjadi serotipe. Membran luar lipopolisakarida (LPS) disebut antigen O. Spesifisitas antigeniknya ditentukan oleh komposisi gula yang membentuk rantai samping polisakarida yang terkait dengan polisakarida inti dan lipid A. Polisakarida permukaan sel

dapat membentuk kapsul yang disebut antigen K. Dan struktur terluar pada permukaan bakteri disebut pili, yang merupakan protein antigenik (Ryan & Ray, 2003; Ryan *et al.*, 2004). Pada *Shigella spp.*, pola antigenik sangat kompleks. Secara serologis, setiap spesies saling tumpang tindih dan bahkan berbagi antigen O dengan bakteri basil enterik lainnya. Antigen O somatik dari *Shigella* adalah lipopolisakarida. Spesifisitas serologis tergantung pada polisakarida, yang mana memiliki lebih dari 40 serotipe. Klasifikasi *Shigella* bergantung pada karakteristik biokimia dan karakteristik antigenik (Riedel *et al.*, 2019).



Gambar 2.7. Struktur antigenik *Enterobacteriaceae* secara umum. Struktur antigenik terdiri dari antigen O (Lipopolisakarida O), antigen K (kapsul), antigen H (flagella), dan envelope cell (Riedel *et al.*, 2019).

Shigella sp. memiliki kemampuan untuk menginvasi dan melakukan replikasi pada sel epitel dan enterosit (Ryan *et al.*, 2004). Semua jenis *Shigella* memfermentasikan laktosa, kecuali *Shigella sonnei*. Ketidakmampuan fermentasi laktosa membedakan *Shigella* dengan anggota *Enterobacteriaceae* yang lain, yang mana memfermentasi laktosa (misalnya, *E. coli*). *Shigella* membentuk asam

dari karbohidrat tetapi tidak menghasilkan gas. *Shigella* dapat dibagi menjadi organisme yang dapat memfermentasi manitol dan organisme yang tidak memfermentasi manitol sesuai dengan tabel 2.3

Tabel 2.5. Tabel Perbedaan keempat tipe *Shigella sp.* dalam sifat memfermentasi manitol dan ornithine decarboxylase. *Shigella dysenteriae* tidak memfermentasi manitol maupun ornithine decarboxylase, *Shigella flexneri* dan *Shigella boydii* hanya memfermentasi manitol, *Shigella sonnei* memfermentasi manitol dan ornithine decarboxylase (Riedel et al., 2019).

Present Designation	Group and Type	Mannitol	Ornithine Decarboxylase
<i>Shigella dysenteriae</i>	A	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	B	+	-
<i>Shigella boydii</i>	C	+	-
<i>Shigella sonnei</i>	D	+	+

2.3.3. Patogenesis Shigellosis

Shigella sp. adalah patogen yang dengan cepat menular dikarenakan transmisinya yang fekal-oral pada daerah dengan higienitas rendah. Transmisi *Shigella sp.* dikenal dengan 4F, yaitu food (makanan yang terkontaminasi), finger (kontak langsung dengan bakteri), feces (feses yang mengkontaminasi air), flies (lalat yang terkontaminasi). Infeksi shigella juga terjadi pada LSL (laki-laki yang berhubungan seksual dengan laki-laki) (Riedel et al., 2019).

Shigella sp. adalah merupakan patogen yang terbatas pada saluran gastrointestinal dan jarang menyebabkan bakteremia. *Shigella sp.* merupakan patogen yang sangat infeksius yang memiliki dosis infeksi yang rendah, karena hanya dengan 10 - 100 bakteri saja sudah cukup untuk menyebabkan infeksi (Sansone, 2001; Riedel et al., 2019). *Shigella sp.* masuk ke saluran pencernaan melalui makanan atau air yang terkontaminasi. Proses awal

terjadinya infeksi dimulai dengan tahap *attachment*, yaitu perlekatan antara molekul adhesi berupa pili *Shigella sp.* yang diperkuat dengan *outer membrane protein* (OMP) terhadap reseptor pada enterosit (Fitrianingsih *et al.*, 2017).

Selanjutnya, *Shigella sp.* akan melakukan proses invasi. Proses invasi ke sel epitel mukosa (misalnya sel M) merupakan proses patologis esensial pada *Shigella sp.* yang prosesnya diawali oleh fagositosis. Setelah ditangkap pada fagositosis, *Shigella sp.* akan mencoba membebaskan diri dari vakuola fagositik, lalu melakukan proses multiplikasi dan menyebar dalam sitoplasma sel epitel, serta menyebar ke sel-sel yang berdekatan (Riedel *et al.*, 2019). Adapun bagian dari saluran cerna yang diinvasi oleh *Shigella sp.* adalah enterosit kolon dan rektum. Invasi *Shigella sp.* ke dalam enterosit memicu terjadinya inflamasi. Inflamasi menyebabkan terbentuknya mikroabses pada kolon dan rektum yang menyebabkan terjadinya nekrosis dari membran mukosa, ulserasi pada permukaan mukosa, perdarahan, dan pembentukan dari *pseudomembran* para daerah yang mengalami ulserasi (Riedel *et al.*, 2019). Proses ini menyebabkan berkurangnya kemampuan reabsorpsi usus (Perez-Lopez *et al.*, 2016). *Pseudomembran* ini mengandung fibrin, leukosit debris sel, membran mukosa yang nekrosis, dan bakteri. Setelah proses mereda, jaringan granulasi akan muncul mengisi ulkus dan membentuk jaringan scar (Riedel *et al.*, 2019). Oleh sebab itu diare yang disebabkan oleh *Shigella sp.* akan mengandung darah, lendir, dan nanah yang mengindikasikan adanya inflamasi dan ulserasi pada kolon dan rektum (Herwana *et al.*, 2010).

Shigella sp. memiliki toksin yang dirilis setelah *Shigella sp.* mengalami autolisis yang dinamakan endotoksin. Endotoksin mengandung lipopolisakarida yang toksik. Endotoksin berperan dalam mengiritasi mukosa dinding usus. Pada

Shigella dysenteriae tipe 1 juga terdapat eksotoksin yang bersifat labil terhadap suhu panas. Eksotoksin ini dapat menyerang saluran cerna dan sistem syaraf manusia. Eksotoksin merupakan protein antigenik dan bersifat lethal pada hewan eksperimental. Apabila toksin berperan sebagai enterotoksin (menyerang saluran cerna), maka akan terjadi diare, seperti efek yang disebabkan oleh *Shiga-like toxin* pada *E. coli*. Pada manusia, eksotoksin juga menghambat penyerapan gula dan asam amino di usus halus. Apabila toksin berperan sebagai neurotoksin (menyerang sistem syaraf), maka akan terjadi koma dan meningismus (Riedel et al., 2019; Ryan et al., 2004).

2.3.4. Tanda dan Gejala Shigellosis

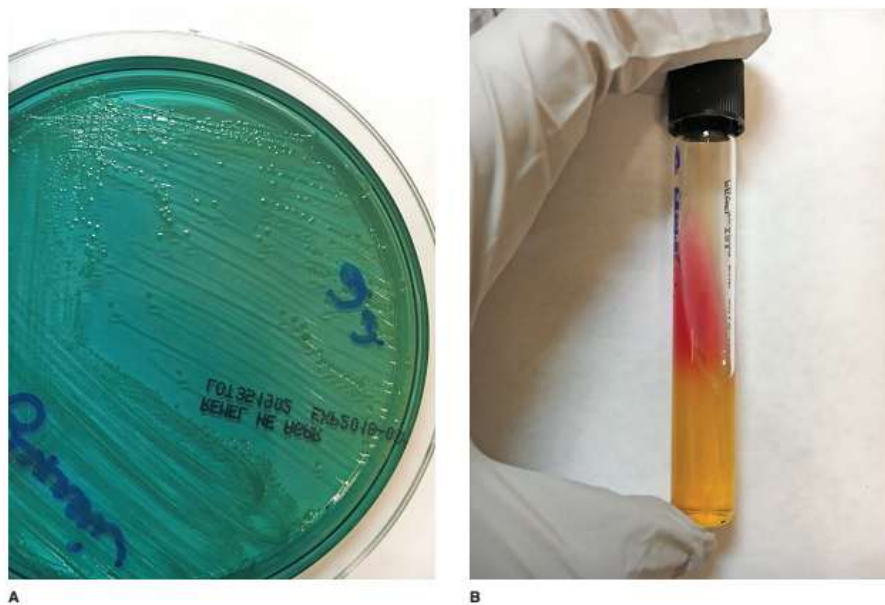
Adapun diare yang disebabkan oleh *Shigella* ditandai dengan adanya lendir dan darah disertai dengan nyeri perut terutama sebelah kiri. Diare dapat disertai mual muntah dan sakit kepala. Diare apabila disebabkan oleh *Shigella dysenteriae* akan timbul dengan mendadak dan berar, dan dapat meninggal bila tidak segera dilakukan tatalaksana. Pada pemeriksaan fisik akan dijumpai febris, nyeri perut pada penekanan di sebelah kiri bawah, terdapat tanda-tanda dehidrasi, serta tenesmus.

2.3.5. Diagnosis Shigellosis

Dalam mendiagnosis shigellosis dengan menggunakan kultur, diperlukan spesimen berupa feses yang diperoleh selama tahap awal shigellosis. Spesimen lalu dikultur pada *differential media*, seperti agar *MacConkey* atau *eosin methylene blue (EMB)*, atau dikultur pada *selective media*, *Hektoen Enteric (HE)* agar atau *xylose-lysine-deoxycholate agar* yang mensupresi pertumbuhan dari *Enterobacteriaceae* lainnya dan bakteri gram positif. Selanjutnya koloni yang

tidak berwarna (laktosa negatif) diinokulasi ke agar miring *triple sugar iron* (TSI).

Organisme nonmotil yang gagal menghasilkan H_2S , yang menghasilkan asam tetapi bukan gas dalam bagian paling bawah (bottom) dilanjutkan analisa aglutinasi oleh antisera *Shigella* spesifik (Riedel et al., 2019).



Gambar 2.8. Spesies *Shigellae* pada media kultur. (A). Spesies *Shigella* pada *Hektoen Enteric* (HE) agar. *Shigella* sp. tidak memfermentasi laktosa, salicin, atau sukrosa sehingga terlihat transparan/translusen (colorless) pada *Hektoen Enteric* (HE) agar. (B). Spesies *Shigella* pada *triple sugar iron* (TSI) agar. *Shigella* sp. memfermentasi glukosa, namun tidak memfermentasi laktosa dan sukrosa yang terlihat pada agar TSI. Sehingga *Shigella* memproduksi reaksi *alkaline over acid* (K/A) dan tidak memproduksi H_2S atau gas (Riedel et al., 2019).

2.3.6. Tatalaksana Shigellosis

Secara umum, shigellosis adalah penyakit yang *self-limiting* dan banyak pasien sembuh tanpa pengobatan dalam 5-7 hari. Kematian umumnya rendah pada usia, namun tinggi pada anak-anak yang kurang gizi, pada bayi, dan pada pasien usia lanjut. Dehidrasi berat, kejang demam, septicemia, dan pneumonia adalah potensi komplikasi dari shigellosis berat. Secara umum, penggantian

cairan secara oral (*oral fluid replacement*) dianggap cukup untuk mengobati shigellosis tanpa komplikasi, tetapi pada populasi pasien berisiko tinggi penggantian cairan secara intravena (*IV fluid replacement*) mungkin diperlukan (Riedel *et al.*, 2019).

Pemberian anti-diare seperti loperamide harus dihindari terutama pada pengobatan shigellosis yang disebabkan oleh *Shigella dysenteriae* karena akan dapat memperburuk gejala-gejala shigellosis. Pengobatan menggunakan antibiotik direkomendasikan untuk infeksi berat dan untuk mencegah penyebaran sekunder pada orang-orang yang tinggal dalam satu lingkungan (misalnya, anggota keluarga) atau selama terjadinya kejadian luar biasa atau wabah. Di Amerika, penggunaan trimethoprim – sulfamethoxazole dan ampicillin sudah tidak direkomendasikan sebagai terapi *first line* shigellosis dikarenakan adanya resistensi yang luas (Riedel *et al.*, 2019). Namun penggunaannya di negara yang belum resisten disarankan dengan dosis 960 mg dengan dosis pada anak-anak 30mg/kgBB dua kali sehari selama 3-5 hari (Guerrant *et al.*, 2001). Ciprofloxacin 2x500mg dan ceftriaxone adalah antibiotik pilihan yang efektif (Guerrant *et al.*, 2001). Namun, dalam beberapa tahun terakhir, *Centers of Disease Control and Prevention* (CDC) telah mengidentifikasi jenis yang muncul dari spesies *Shigella* yang berpotensi mengurangi sensitivitas terhadap ciprofloxacin. Ceftriaxone umumnya digunakan untuk terapi shigellosis pada anak. Terakhir, azitromisin telah terbukti sebagai antibiotik yang masih sensitif dan digunakan untuk pengobatan infeksi *Shigella* yang resisten terhadap antibiotik pada orang dewasa dan anak-anak (Riedel *et al.*, 2019).

2.3.7 Perkembangan Vaksin Shigella

Infeksi oleh *Shigella* akan menginduksi respons imun berupa antibodi spesifik. Injeksi dari *shigella* yang dimatikan dapat merangsang produksi antibodi dalam serum. Namun antibodi ini masih gagal dalam memproteksi terhadap infeksi. *Secretory IgA* (s-IgA) pada mukosa usus kemungkinan memiliki peran penting dalam menginhibisi berulangnya infeksi. s-IgA ini dapat distimulasi oleh strain hidup yang dilemahkan yang diberikan secara oral sebagai vaksin (dalam eksperimental) (Riedel *et al.*, 2019)

Meskipun ada upaya penelitian intensif selama lebih dari 60 tahun, dengan menggunakan beragam strategi vaksin, namun vaksin yang aman dan efektif terhadap shigellosis belum tersedia (Ashkenazi & Cohen, 2013). Saat ini, *Shigella sonnei* terdiri dari sekitar 80% isolat *Shigella* di negara maju, dengan prevalensi relatif yang meningkat dalam beberapa dekade terakhir. Sebaliknya, di negara-negara berkembang, *Shigella flexneri* adalah penyebab paling umum disentri basiler (CDC, 2013; Von Seidlein *et al.*, 2006; Mani *et al.*, 2016).

Dalam perkembangannya beberapa hambatan menghambat laju pengembangan vaksin *Shigella*. Beberapa diantaranya adalah adanya kurangnya pengetahuan mengenai imunologi, terbatasnya model hewan yang baik dalam merepresetasikan penyakit yang dapat digunakan untuk menguji kandidat vaksin, persepsi bahwa intervensi lain (termasuk air dan sanitasi) lebih tepat, dan dana yang tidak mencukupi untuk mempercepat pengembangan klinis.

Terlepas dari kendala ini, ada kemajuan besar untuk dilaporkan dari kemajuan pengembangan vaksin *Shigella* selama 5 tahun terakhir, namun demikian vaksin berlisensi belum ditemukan sejauh ini (Barry *et al.*, 2013; Pore & Chakrabarti, 2016; Mani *et al.*, 2016).

Ada dua pendekatan dasar untuk mencapai jangkauan yang luas dalam perlindungan terhadap shigellosis: baik dengan menggabungkan vaksin bertarget serotipe yang poten dalam vaksin multivalen atau dengan menggunakan antigen yang dapat bereaksi silang yang akan memberikan perlindungan terhadap berbagai strain *Shigella* (Ashkenazi & Cohen, 2013). Diharapkan bahwa vaksin yang ada dapat mencakup *Shigella dysenteriae* tipe 1, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* 2a, *Shigella flexneri* 3, dan *Shigella flexneri* 6. Maka vaksin tersebut akan mencakup lebih dari 75% diare yang disebabkan oleh *Shigella* dalam skala global (Levine *et al.*, 2007). Hal ini didasarkan pada asumsi (dari analisis antigen *Shigella*O dan studi perlindungan oleh reaksi silang) bahwa dimasukkannya *Shigella flexneri* 2a, 3a, dan 6 dalam vaksin akan memberikan perlindungan silang terhadap 11 serotipe *Shigella flexneri* yang lainnya karena memiliki sekelompok antigen yang sama (Levine *et al.*, 2007).

Shigella flexneri 2a strain CVD 1208S, salah satu komponen vaksin, telah maju ke studi klinis manusia dan berfungsi sebagai referensi kandidat vaksin untuk percobaan saat ini (Kotloff *et al.*, 2007). CVD 1208S terbukti aman, dapat ditoleransi dengan baik dan sangat imunogenik pada sukarelawan dalam penelitian Fase I (Kotloff *et al.*, 2007). Penelitian terbaru didapatkan bahwa suatu vaksin terdiri dari kombinasi serotipe *S. flexneri* 2a, 3a dan 6 dapat memberikan cakupan langsung terhadap 41% strain *Shigella* dan proteksi silang dapat memperluas cakupan ini menjadi 66% cakupan keseluruhan (Livio *et al.*, 2014).

Beberapa penelitian dari Pore *et al.* juga menyatakan bahwa protein membran luar bakteri A (OmpA) dari *S. flexneri* 2a adalah kandidat vaksin subunit pelindung yang imunogenik dan manjur terhadap shigellosis (Pore *et al.*, 2009, 2010, 2011, 2012; Pore & Chakrabarti, 2013; Bhowmick *et al.*, 2014).

Pada awal 1960-an, di Yugoslavia, David Mel melakukan studi yaitu meletakkan serotipe *Shigella* yang berbeda pada media yang mengandung streptomisin hingga *Shigella* menjadi resisten streptomisin dan ketergantungan streptomisin (SMD), serta kehilangan kemampuan invasif mukosa (Sereny, 1955; Ashkenazi & Cohen, 2013). Perlindungan dari vaksin ini bertahan selama satu tahun setelah imunisasi primer pada anak-anak dan pemberian booster (dengan dosis tunggal) menambah perlindungan untuk satu tahun (Mel *et al.*, 1974, 1971).

Lipopolisakarida (LPS) adalah antigen permukaan utama pada bakteri gram negatif yang telah menjadi target pengembangan vaksin *Shigella* (Morona *et al.*, 2003; Camacho *et al.*, 2013). LPS terdiri dari tiga domain: lipid A, *hydrophobic anchor* (terdiri dari inti oligosakarida, domain oligosakarida yang tidak berulang, dan rantai O-antigen [Oag]), dan domain berulang oligosakarida (Jann *et al.*, 1982). Keragaman struktural dari rantai Oag di antara berbagai serotipe membuat para peneliti sulit untuk memanfaatkan LPS spesifik serotipe sebagai agen pelindung silang dalam vaksin shigellosis (Kim *et al.*, 2018).

2.4. Molekul Adhesi

2.4.1. Definisi Molekul Adhesi

Molekul adhesi adalah molekul yang berperan penting dalam tahap awal patogenesis bakteri (pada tahap perlekatan *attachment*) yaitu berperan dalam mengikat reseptor pada enterosit sehingga bakteri dapat menginvasi atau mengeluarkan toksin pada enterosit. Dalam sistem kekebalan tubuh, adhesi sel memainkan peran penting dalam memulai dan mempertahankan respon imun yang efektif terhadap patogen asing (Preedy, 2016). Ada empat famili molekul adhesi: molekul adhesi imunoglobulin-like, integrin, cadherin, dan selektin

(Preedy, 2016). Sebagian besar molekul adhesin adalah protein transmembran khas yang memiliki domain sitoplasma, transmembran, dan ekstraseluler (Ren et al., 2011). intervensi pada tahap *attachmnt* dapat menghambat terjadinya infeksi.

Pada tahun 2003, Sumarno melakukan penelitian mengenai karakterisasi molekuler dari protein adhesi *Vibrio cholerae* O1 M094V dan protein reseptornya (molekul reseptor) pada usus halus. Pada penelitian tersebut didapatkan bahwa molekul adhesi *Vibrio cholerae* terdapat pada pili dan *outer membrane protein* (OMP) (Sumarno, 2003). Pada penelitian tersebut berhasil diidentifikasi bahwa molekul adhesi pada *Vibrio cholerae* adalah pili dengan berat molekul 50,3 kDa, 37,8 kDa, 35,6 kDa, dan 21,3 kDa sedangkan pada OMP memiliki berat molekul 37,8 kDa (Sumarno, 2003). Selain itu, molekul reseptor *Vibrio cholerae* pada membran epitel usus memiliki berat molekul 62 kDa, 12,7 kDa dan 10 kDa (Sumarno, 2003).

Penelitian mengenai pili *Shigella dysenteriae* membuktikan bahwa pili *Shigella dysenteriae* dengan berat molekul 49,8 kDa merupakan molekul adhesi yang memiliki sifat hemagglutinin. Molekul adhesi pili *Shigella dysenteriae* dengan berat molekul 49,8 kDa tersebut dapat menghambat proses *attachment Shigella dysenteriae* pada enterosit mencit (Agustina et al., 2012). Molekul adhesi *Shigella dysenteriae* juga dilaporkan memiliki efek protektivitas usus dengan menghambat sekresi cairan pada usus serta menghambat kolonisasi bakteri *Shigella dysenteriae* (Setyorini et al., 2013).

2.4.2. Peran Molekul Adhesi dalam Menginduksi Respon Imun

Penelitian dari Sumarno et. al. menyatakan bahwa molekul adhesi pada pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang dikombinasikan dengan CTB telah berhasil menginduksi respon imun *innate* berupa s-IgA dan

menghambat sekresi cairan usus (Sumarno *et al.*, 2011). Berdasarkan penelitian tersebut diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efek vaksinasi terhadap komponen imunitas lainnya.

Penelitian lain menyatakan bahwa molekul adhesi subunit pili *Shigella flexneri* dengan berat molekul 18 kDa dapat meningkatkan ekspresi protein antimikroba β -defensin pada mencit (Fitrianingsih *et al.*, 2018).

2.4.3 Reaksi Silang antar Molekul Adhesi

Beberapa penelitian mengenai reaksi silang telah dilakukan. Penelitian dari Rabbi *et. al.* (2008) menyatakan bahwa terdapat reaksi silang antigenik antara komponen permukaan *Vibrio cholera* O1, *Shigella flexnerii* 2a dan *Haemophillus influenzae* b (Rabbi *et al.*, 2008). Berdasarkan hal tersebut, diduga molekul adhesi *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa dapat dijadikan sebagai kandidat vaksin homolog untuk *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri*.

Terjadi juga reaksi silang antara protein pili hemagglutinin dengan berat molekul 49,8 kDa dan 7,9 kDa pada *Shigella sp.* (Khoirul *et al.*, 2016). Pada penelitian tersebut, dinyatakan bahwa terdapat reaksi imunologis antara antibodi poliklonal terhadap pili *Shigella dysenteriae* dengan berat molekul 49,8 kDa dengan pili *Shigella boydii* dengan berat molekul 49,8 kDa, serta pili *Shigella dysenteriae* dengan berat molekul 7,9 kDa dengan pili *Shigella boydii* dengan berat molekul 7,9 kDa yang telah terbukti dengan menggunakan uji dot blotting dan western blotting. Namun pada penelitian tersebut tidak ditemukan reaksi imunologis yang identik antara molekul 49,8 kDa dan 7,9 kDa milik *S. flexneri* dan *S. sonnei* (Khoirul *et al.*, 2016).

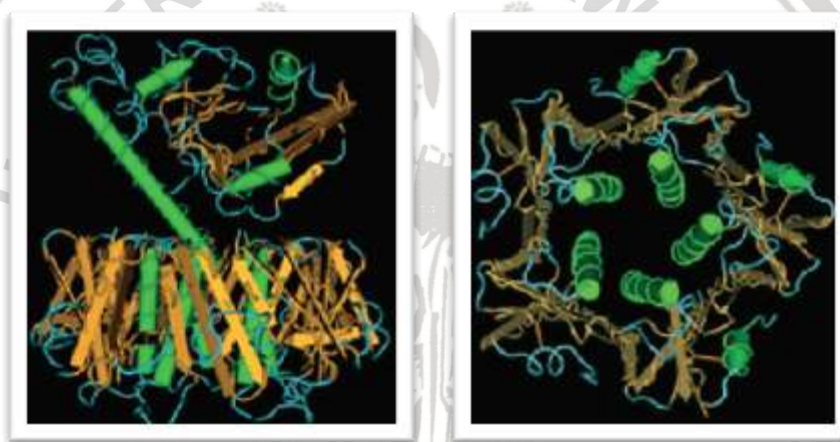
Penelitian dari Milliana *et al.* (2017) menyatakan bahwa terjadi reaksi silang antara molekul adhesi pada *outer membrane protein* (OMP) *Shigella*

flexneri dan OMP dari spesies *Shigella* lainnya. Pada penelitian ini Protein dengan berat molekul 28 kDa *Shigella flexneri* pada OMP diidentifikasi sebagai protein hemagglutinin yang berfungsi sebagai protein adhesi. Antibodi terhadap protein ini bereaksi silang dengan OMP dari spesies *Shigella* lainnya. Namun penelitian mengenai efek reaksi silang dalam menghambat sekresi cairan pada mukosa usus belum diteliti lebih lanjut (Milliana *et al.*, 2017). Reaksi silang juga terjadi antara molekul adhesi pada pili *Shigella flexneri* dan OMP *Shigella flexneri* yang keduanya bersifat hemagglutinin (Fitrianingsih *et al.*, 2017). Pada penelitian tersebut dinyatakan bahwa terdapat reaksi silang yang terjadi antara pili *Shigella flexneri* dengan berat molekul 18 kDa dengan pili *Shigella flexneri* dengan berat molekul 23 kDa, 34 kDa, dan 53 kDa serta OMP *Shigella flexneri* dengan berat molekul 23 kDa dan 27 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa protein adhesin pada pili dan OMP *S. flexneri* terdiri dari beberapa epitop yang identik yang ditunjukkan oleh terjadinya reaksi silang dari antibodi (Fitrianingsih *et al.*, 2017). Selanjutnya, Miliana *et al* menemukan bahwa antibodi terhadap OMP *Shigella flexneri* dengan berat molekul 28 kDa mampu bereaksi dengan OMP spesies *Shigella* lainnya yaitu *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, dan *Shigella boydii* yang dibuktikan dengan menggunakan western blotting. Pada penelitian tersebut juga dilakukan uji adhesi dimana sel enterosit mencit yang sudah diberikan vaksinasi berupa OMP *Shigella flexneri* dengan berat molekul 28 kDa selanjutnya dipaparkan dengan bakteri *Shigella flexneri* dan didapatkan bahwa semakin tinggi dosis OMP yang diberikan maka semakin rendah jumlah bakteri *Shigella flexneri* yang melekat pada enterosit (Miliana, 2017).

2.5. *Cholerae Toxin Sub-unit B (CTB)*

2.5.1. Definisi CTB

Faktor virulensi utama dari *Vibrio cholerae* adalah *cholera toxin* (CT), yang terdiri dari dua subunit: subunit A (CTA) dan subunit B (CTB). Keberadaan CT pertama kali dihipotesiskan oleh Robert Koch pada tahun 1886, yang menyatakan bahwa gejala yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae* dapat disebabkan oleh racun yang dihasilkan oleh organisme tersebut. Hipotesis ini lalu dibuktikan oleh Calcutta pada tahun 1959 (De, 1959).



Gambar. 2.9. Struktur *crystalography* dari *cholera toxin* (CT). Sebelah kiri adalah *cholerae toxin* secara umum yang terdiri dari subunit A (CTA) dan *cholerae toxin subunit B* (CTB). Sebelah kanan adalah struktur dari CTB saja.

CTB adalah homopentamerik berukuran 11,6 kDa. CTB merupakan protein yang non-toksik yang berfungsi untuk mengikat *ganglioside* GM1 pada sel mamalia dengan afinitas yang tinggi. Saat ini CTB telah diproduksi secara rekombinan dan digunakan sebagai komponen dari vaksin kolera oral berlisensi internasional karena CTB dapat menginduksi kekebalan humoral yang kuat yang dapat menetralkan toksin kolera di dalam usus. Selain itu, penelitian terbaru telah mengungkapkan bahwa pemberian CTB mengarah pada induksi mekanisme

antiinflamasi secara *in vivo*. CTB dapat berperan sebagai agen imunomodulator dan agen anti-inflamasi (Baldauf *et al.*, 2015).

2.5.2. Peran CTB dalam Menginduksi Respon Imun

Subunit CTB sebelumnya ditunjukkan telah menginduksi respons imun (Holmgren *et al.*, 1994). CTB telah terbukti secara kuat menginduksi respons imun ketika diberikan melalui rute intranasal tetapi kurang kuat ketika diberikan secara oral (Sánchez & Holmgren, 2008; Kubota *et al.*, 2005; Blanchard *et al.*, 1998). Namun, rute pemberian hidung tidak disukai karena potensi risiko untuk mengembangkan Bell's palsy (Rath *et al.*, 2007; Mutsch *et al.*, 2004; Couch, 2004). Untung saja ditemukan bahwa dengan menggabungkan antigen ke CTB dan diberikan via oral, respons imun yang terjadi jauh lebih kuat (Guo *et al.*, 2012).

2.5.3. Peran CTB sebagai Adjuvan

Potensi adjuvan dari CTB juga telah ditunjukkan dalam model hewan (Baptista *et al.*, 2014; De Geus *et al.*, 2011; Boustanshenas *et al.*, 2013).

Pengembangan vaksin terhadap beberapa patogen bakteri telah dicoba baru-baru ini dengan mengkonjugasikan antigen ke CTB untuk menginduksi respons imun terhadap bakteri (Baldauf *et al.*, 2015). CTB yang diproduksi secara rekombinan adalah komponen penting dari vaksin kolera oral untuk penggunaan manusia. CTB rekombinan ini tidak diberikan sendirian namun dikonjugasikan dengan *whole cell Vibrio cholera* yang dikenal dengan Dukoral dan diaplikasikan di lebih dari 50 negara di seluruh dunia (Sanchez & Holmgren, 1989; Sánchez & Holmgren, 2008). Ketika diberikan secara oral dalam dua atau tiga dosis, vaksin telah ditemukan menginduksi anti-toksin IgA usus dan antibodi anti-bakteri (terutama anti-*lipopolysaccharide*). Pada anak-anak di bawah usia 5 tahun,

perlindungan jangka pendek, yang secara signifikan dimediasi oleh antibodi anti-toksik IgA adalah 100% untuk 6 bulan pertama tetapi berkurang dengan cepat, dibandingkan anak usia >5 tahun dan dewasa, menjadi hanya 30% di tahun kedua *follow up* (Sánchez & Holmgren, 2008).

Selain aktivitas adjuvan pada vaksin untuk mukosa, penelitian terbaru telah mengungkapkan bahwa CTB juga dapat menginduksi respon anti-inflamasi dan sel Treg sehingga dapat mensupresi imunopatologi pada alergi dan autoimun (Sun *et al.*, 2009).

2.6. Defensin

2.6.1. Definisi Defensin

Defensin adalah peptida bersifat antimikroba yang disekresikan oleh enterosit sebagai komponen respon imun *innate humoral* (Doss *et al.*, 2010). Permukaan usus melindungi diri dari mikroorganisme dengan respon imun bawaan (*innate*). Imunitas bawaan (*innate*) merupakan mekanisme perlindungan yang membentuk garis pertahanan pertama dan mampu merespon dengan cepat untuk menangkal potensi infeksi oleh patogen (Cobo & Chadee, 2013). Respon imun ini tidak berdasarkan pada pengenalan antigen spesifik, oleh karena itu kurang spesifik apabila dibandingkan dengan sistem imun adaptif. Namun, kekebalan bawaan memberikan perlindungan terhadap berbagai mikroba dalam cakupan yang luas, bahkan yang belum pernah dikenali sebelumnya oleh sistem imun (Grishin & Sokolov, 2014).

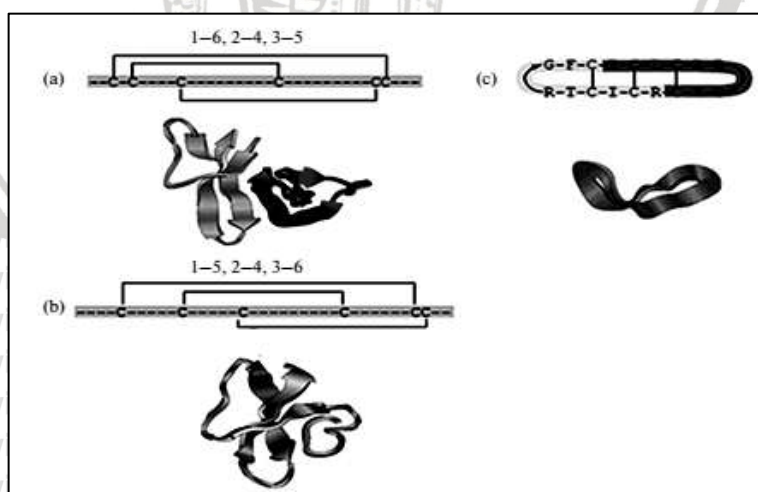
Sel-sel epitel usus membentuk lapisan fisik yang bertindak sebagai penghalang antara lingkungan luar dan dalam dari host. Selain itu, sel-sel ini mengeluarkan beberapa molekul defensif ke dalam cairan mukus, seperti musin,

peptida antimikroba, dan imunoglobulin (Doss et al., 2010; Pazgier et al., 2006; Sperandio et al., 2015).

Peptida antimikroba berpartisipasi dalam sistem kekebalan bawaan dan digunakan oleh semua organisme eukariotik. Peptida antimikroba terdiri dari *defensin*, laktoferin, *cathelicidin*, dan histatin (Grishin & Sokolov, 2014; Wehkamp et al., 2007).

2.6.2. Struktur Defensin

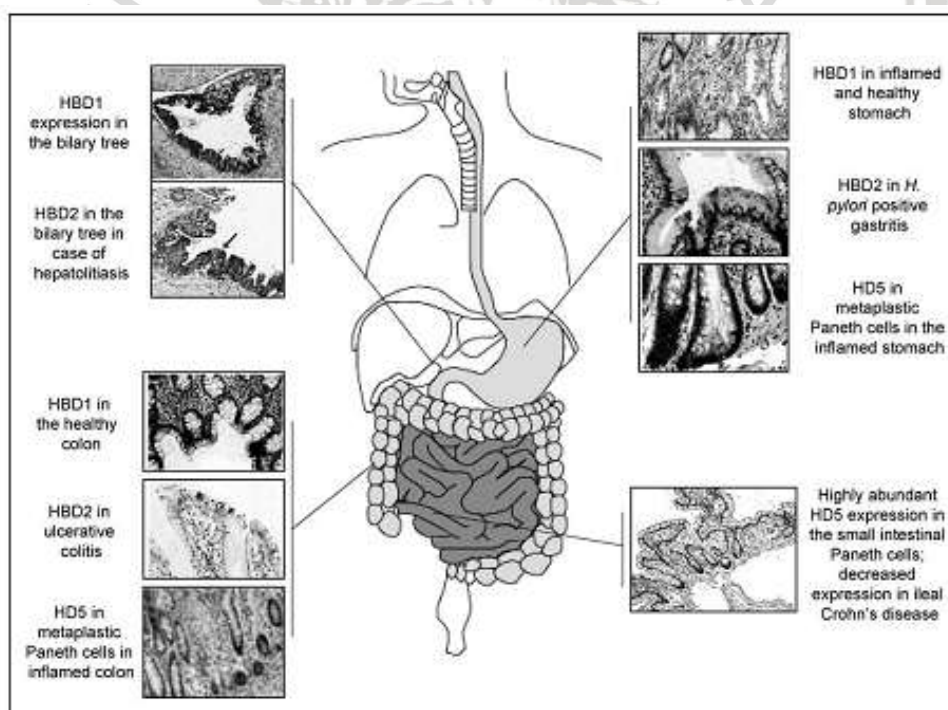
Secara struktural, *defensin* adalah peptida pendek yang terdiri dari 30 - 45 asam amino yang kaya akan asam amino kationik, yang memberi molekul bermuatan positif dengan berat molekul yang kecil yaitu sekitar 2-6 kDa. Ciri khas *defensin* adalah susunan 3 ikatan disulfida yang secara fungsional menstabilkan peptida dari degradasi oleh protease (Underwood & Bevins, 2010; Grishin & Sokolov, 2014). Pada manusia, gen yang mengkode peptida dari *defensin* terutama terletak pada kromosom 8p22-23 (Grishin & Sokolov, 2014).



Gambar 2.10. Struktur dari *defensin*. α -*defensin* (a), β -*defensin* (b), dan θ -*defensin* (c) (Grishin & Sokolov, 2014).

Berdasarkan perbedaan struktur reptil, unggas, dan manusia, defensin terdiri dari α , β dan θ defensin secara khas memiliki sifat mikrobisida terhadap bakteri, fungi, virus, dan protozoa (Grishin & Sokolov, 2014; Lehrer *et al.*, 2009).

Pada manusia, defensin diekspresikan secara luas, diantaranya pada neutrofil, kulit, dan epitel mukosa. Sebagian besar defensin adalah antimikroba yang poten dan beberapa memiliki aktivitas kemotaktik serta penetral toksin (Underwood & Bevins, 2010). Sel epitel usus manusia menghasilkan *human α -defensin* (HD), yang terdiri dari HD-5 dan HD-6, *human β -defensin* (hBD), yang terdiri dari hBD-1, 2, 3, dan 4, dan cathelicidin (terdiri dari LL-37 / hCAP-18) (Doss *et al.*, 2010; Pazgier *et al.*, 2006).



Gambar 2.11. Ekspresi peptida antimikroba defensin pada tubuh. *Human beta defensin-1* (hBD-1) terdapat pada kantung empedu, lambung (baik saat kondisi normal maupun saat terjadi inflamasi, dan kolon (pada kondisi normal). *Human beta defensin-2* hBD-2 terdapat pada kantung empedu saat kondisi hepatolithiasis, di lambang saat gastritis, dan di kolon saat ulcerative colitis. *Human alfa defensin-5* (HD-5) ditemukan di *Paneth cell* saat kondisi inflamasi (Wehkamp *et al.*, 2007).

2.6.3. Tempat Diproduksinya Defensin

human α -defensin (HD-5 dan HD-6) diekspresikan oleh sel epitel spesial pada usus halus yang dinamakan sel *Paneth* (Mastroianni & Ouellette, 2009; Rubio & Befrits, 2009) serta diproduksi oleh granula dari neutrofil (Underwood & Bevins, 2010). Sedangkan *β -defensin* diproduksi oleh berbagai sel epitel, diantaranya adalah keratinosit, enterosit kolon, sel epididimal, kornea, konjungtiva, sinus, paru, sel epitel yang melapisi telinga tengah, genital, dan saluran kencing (Underwood & Bevins, 2010). *Human beta defensin* (hBD) diproduksi di beberapa bagian tertentu (dapat dilihat pada gambar 2.2). hBD-1 diekspresikan dalam epitel esofagus, lambung, usus halus, dan kolon. *Human beta defensin-2* hBD-2 diproduksi oleh kantung empedu saat kondisi hepatolithiasis, di lambung saat gastritis, dan di kolon saat *ulcerative colitis*. *Human alfa defensin-5* (HD-5) ditemukan di *Paneth cell* saat kondisi inflamasi (Wehkamp *et al.*, 2007) Penelitian mengenai tempat produksi hBD 3 dan 4 belum banyak penelitian sehingga produksi hBD3 dan hBD4 tidak diketahui.

2.6.4. Saat Diproduksinya Defensin

hBD-1 diekspresikan pada keadaan individu yang sehat dan normal. Sedangkan hBD-2, hBD-3, hBD-4, dan cathelicidin diekspresikan dalam kondisi adanya infeksi dan inflamasi atau setelah induksi bakteri secara *in vitro* (Fahlgren *et al.*, 2003; Ramasundara *et al.*, 2009; Wehkamp *et al.*, 2007; O'Neil *et al.*, 1999). Beberapa *β -defensin* juga memiliki aktivitas *in-vitro* melawan bakteri. Dibandingkan dengan *human β -defensin* lainnya, HBD1 menunjukkan aktivitas antibakteri *in vitro* yang lebih lemah (Valore *et al.*, 1998). Sebuah studi menyatakan bahwa ekspresi level mRNA hBD-2 seratus kali lebih tinggi pada

tahap akut diare berair (oleh karena *Vibrio cholerae* O1) dibandingkan dengan tahap pemulihan (coalescent) dan kontrol. Peningkatan ekspresi hBD-2 yang selanjutnya diikuti dengan produksi HD-5, HD-6, lisozim, hBD-1, dan LL-37 (Shirin et al., 2011).

2.6.5. Cara Kerja Defensin dalam Membunuh Bakteri

Secara umum defensin (bermuatan positif) membunuh mikroba target dengan cara berikatan dengan membran terluar sel mikroba yang mengandung lipid (bermuatan negatif) dan selanjutnya membuat pori sehingga mengganggu integritas membran mikroba lalu menyebabkan kematian dari mikroorganisme tersebut. Mekanisme ini dikenal sebagai 'Model Shai-Matsuzaki-Huang' (Dommett et al., 2005; Grishin & Sokolov, 2014).

α -defensin mampu menghambat toksin bakteri, termasuk yang diproduksi oleh *Bacillus anthracis*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan cytolytins (eksotoksin yang diproduksi oleh bakteri Gram positif yang melisis sel darah merah) (Lehrer et al., 2009; Kim et al., 2005, 2006; Giesemann et al., 2008). hBD2 bersifat mikrobisida terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* dan *Candida albicans*, tetapi juga bersifat bakterostatik terhadap *S. aureus* (Harder et al., 1997, 2000). hBD-2 dapat juga diinduksi oleh beberapa bakteri lainnya, yaitu *Campylobacter jejuni* dan *H. pylori* (Wada et al., 1999; Zilbauer et al., 2005). HBD4 bersifat bakterisida terhadap *Staphylococcus*, *P. aeruginosa*, dan yeast (García et al., 2001).

Defensin dan agen antimikroba usus lainnya sangat penting dalam perlindungan lini pertama terhadap banyak patogen diare. Glikoprotein musin dan peptida antimikroba adalah komponen utama dari sawar mukosa, dan

terbukti membentuk perlindungan yang efektif terhadap sebagian besar mikroba (Sperandio *et al.*, 2015). Kebanyakan *defensin* manusia memiliki aktivitas bakterisidal spektrum luas dan membunuh pada konsentrasi mikromolar (Underwood & Bevins, 2010). Aktivitas antimikroba *defensin* diperkirakan memiliki 2 fungsi utama, yaitu melindungi host dari mikroba patogen dan mengatur komposisi mikrobiota komensal yang berkolonisasi di permukaan sel host sehingga membantu memproteksi permukaan mukosa dari kemungkinan terjadinya kolonisasi bakteri patogen (Salzman *et al.*, 2007, 2010).

Defensin juga dapat menjembatani imunitas bawaan (innate) dan adaptif. Beberapa *defensin* memiliki aktivitas proinflamasi karena mereka merangsang ekspresi sitokin (misalnya, interleukin 6 [IL-6]) dan kemokin. Namun, terdapat juga *defensin* lain yang bertindak sebagai kemoatraktan untuk sel dendritik, neutrofil, sel T memori, dan sel mast (Yang *et al.*, 2007). Sebagai bentuk dari respon imun innate beta defensin dihasilkan oleh sel epitel enterosit yang diproduksi dalam bentuk cairan mukosa usus berisi peptida antimikroba lainnya seperti laktoferin dan cathelicidin. Sebagai respon imun adaptive, beta defensin diinduksi oleh IL-17 (Salzman *et al.*, 2010).

Terlepas dari berbagai karakteristik positif, salah satu kelemahan utama dari banyak *defensin* terdiri dari penargetan yang rendah sehingga mencegah pelekatan bebas peptida ke permukaan yang kaya lipid dari dinding sel bakteri dan karena itu mengurangi efek antimikroba (Selsted, 2004; Grishin & Sokolov, 2014).

2.7. *Ligated Ileal Loop*

2.7.1. Definisi *Ligated Ileal Loop*

Metode *Ligated Ileal Loop* adalah metode yang digunakan untuk mempelajari patofisiologi diare dan untuk mengevaluasi terapi antidiare. Metode dilakukan dengan cara mengambil segmen usus dari hewan coba lalu diligasi untuk selanjutnya diinokulasikan supernatan bakteri pada segmen usus tersebut.

Metode ini awalnya ditemukan oleh Hauschild (Hauschild et al., 1967). Pada penelitian Hauschild ditemukan bahwa segmen usus domba yang telah diligasi lalu diinjeksikan dengan suspensi *Clostridium perfringens* dengan air akan terjadi akumulasi cairan pada usus tersebut yang serupa dengan produksi diare oleh kelompok domba hidup yang diinfeksi dengan *Clostridium perfringens* secara oral dan intraduodenal (Hauschild et al., 1968).

2.7.2. Metode *Ligated Ileal Loop* dengan *Vibrio cholerae*

Selanjutnya setelah ditemukan metode *ligated ileal loop* pada domba tersebut, studi dikembangkan oleh peneliti lain yaitu dengan menggunakan metode ini pada usus kelinci yang diligasi lalu diinjeksikan *Clostridium perfringens* (Duncan et al., 1968). Pada tahun 1969, studi mengenai *ligated ileal loop* dilakukan untuk mengetahui reaksi akumulasi cairan oleh beberapa hewan coba terhadap inokulasi *Vibrio cholerae* dan toksin *Vibrio cholerae* (Basu & Pickett, 1969). Dari semua hewan coba yang ada, dilakan inokulasi *Vibrio cholerae* 569B pada segmen usus sepanjang 10 cm. Hasil dari percobaan tersebut ditemukan bahwa semua hewan coba menimbulkan akumulasi cairan bila diinfeksi dengan *Vibrio cholerae* utuh seperti terlihat pada tabel...

Tabel 2.6. Reaksi *Ileal Loop* Hewan Coba terhadap *Vibrio cholerae* 569B (Basu & Pickett, 1969).

Animal	Dose	Fluid (ml/cm) ^a		Vibrios per ml
		Experimental	Control	
Gerbil	1×10^6	0.25 ^b	<0.05	6×10^6
Rat	1×10^6	0.30	<0.05	6×10^6
Hamster	1×10^6	0.40	<0.05	8×10^6
Guinea pig	1×10^6	0.50	<0.05	8×10^6
Chinchilla	1×10^6	0.70	<0.05	8×10^6
Cat	1×10^7	1.30	0.05	7×10^6
Mouse	5×10^7	0.10	<0.05	6×10^6

Selain itu, Basu dan Pickett juga melakukan percobaan pemberian *crude toxin* *Vibrio cholerae* pada beberapa hewan seperti *gerbil*, kelinci, hamster, marmut, *chinchilla*, kucing, dan mencit. Dari pemberian *crude toxin* *Vibrio cholerae* didapatkan akumulasi cairan seperti pada tabel 2.7.

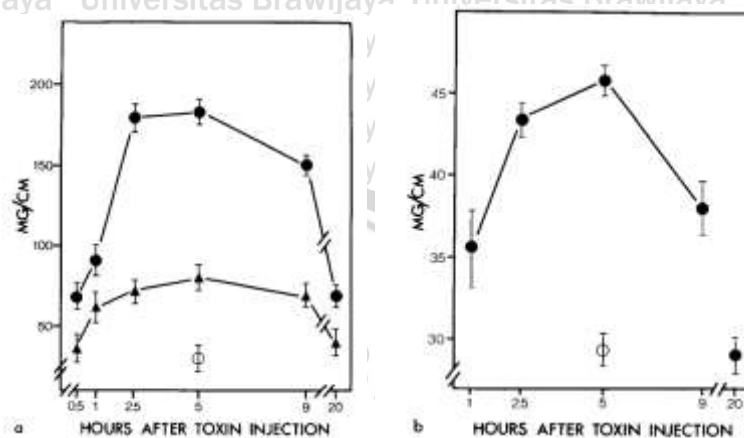
Tabel 2.7. Reaksi *Ileal Loop* Hewan Coba terhadap *crude toxin* *Vibrio cholerae* (Basu & Pickett, 1969).

Animal	Dose (loop units)	Fluid (ml/cm)	
		Experimental	Control
Gerbil	0.25	0.20	<0.05
Rat	0.50	0.30	<0.05
Hamster	0.50	0.30	<0.05
Guinea pig	0.50	0.45	<0.05
Chinchilla	0.50	0.80	<0.05
Cat	5	1.50	0.05
Mouse	5	0.10	<0.05

Model mencit dewasa telah dikembangkan dalam melakukan penelitian eksperimental kolera baik pada segmen loop usus yang diligasi maupun usus utuh tanpa diligasi. Mencit dari turunan strain yang berbeda memiliki variasi kerentanan usus terhadap toksin yang berbeda juga. Tikus C57B adalah strain yang paling sensitif ketika diuji dengan toksin kolera (Lange & Holmgren, 1978).

Pada usus mencit C57B yang diligasi lalu diberikan toksin dari *Vibrio cholerae*, terjadi akumulasi cairan dimulai dalam 1 jam setelah inokulasi toksin dan

peningkatan maksimal terjadi pada jam ke-5. Selanjutnya, terjadi pemulihan usus secara bertahap (Lange & Holmgren, 1978).



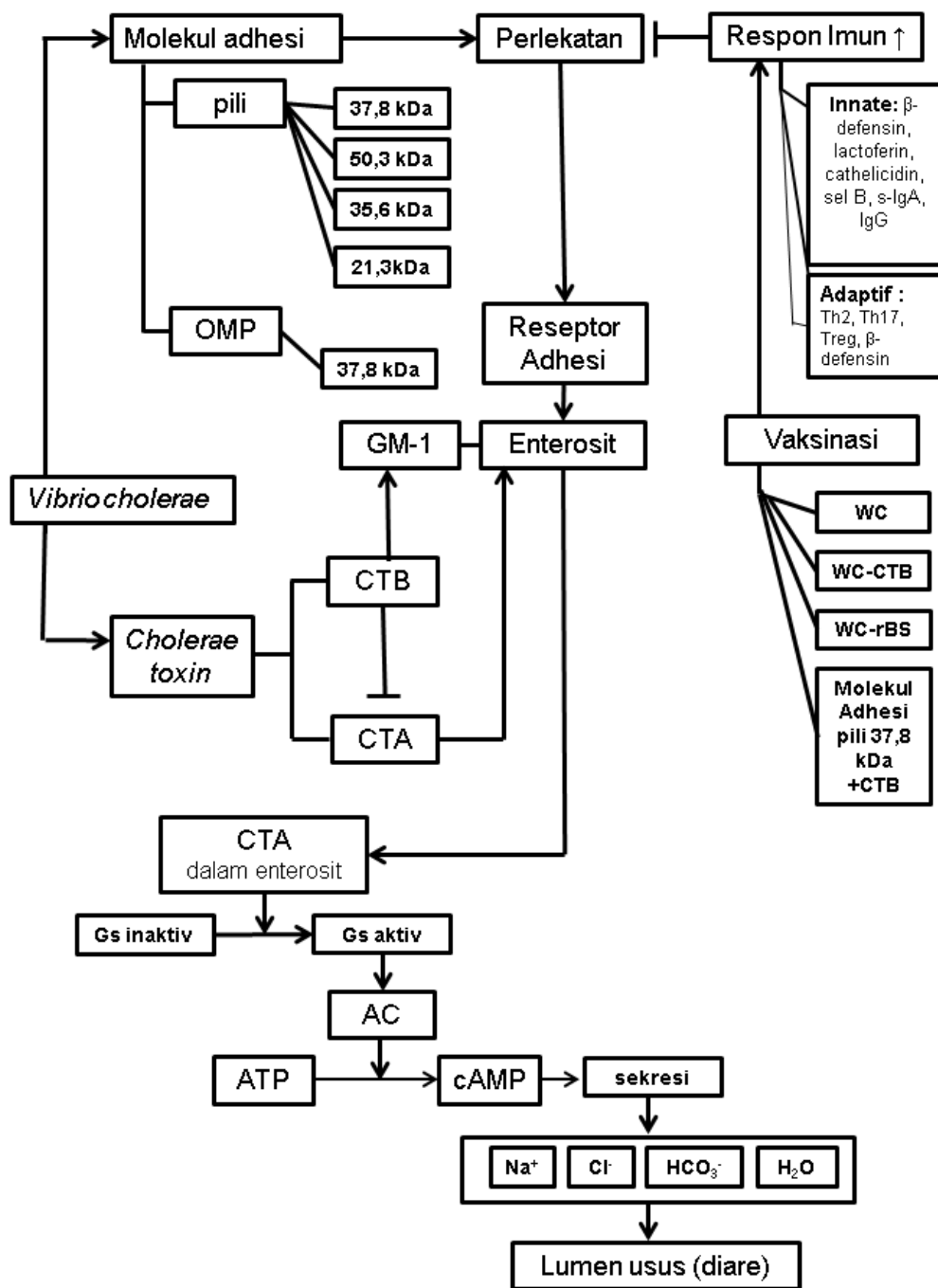
Gambar 2.12. Peningkatan massa usus yang dilakukan induksi toksin *Vibrio cholerae* dengan metode MLIL (Lange & Holmgren, 1978). **a.** Peningkatan massa usus yang ditimbulkan oleh *crude toxin* sebanyak 25 mg (●) dan 3 mg (▲). **b.** Peningkatan massa usus yang ditimbulkan oleh *crude toxin* sebanyak 100 mg.

2.7.3. Mice Ligated Ileal Loop MLIL oleh Sumarno *et. al.*

Pada penelitian-penelitian mengenai *ligated ileal loop* yang telah ada, segmen usus yang telah diligasi lalu diinfeksi dengan toksin atau bakteri dimasukkan kembali ke dalam usus mencit, lalu mencit dibiarkan hidup hingga menimbulkan manifestasi diare. Hal tersebut tentunya akan menyiksa mencit dan kurang etis terhadap mencit. Pada tahun 2011, Sumarno *et. al.* menciptakan metode *mice ligated ileal loop* (MLIL) yang berbeda. Pada metode MLIL tersebut mencit dikorbankan (dimatikan) untuk dibedah dan diambil segmen ususnya. Selanjutnya mencit diinokulasikan dengan bakteri yang akan diuji cobakan. Selanjutnya segmen usus yang ada dimasukkan ke media RPMI yang fisiologis dengan keadaan dalam usus mencit ketika masih hidup dan dinilai efek dari bakteri dalam menaikkan massa usus mencit (Sumarno *et al.*, 2011).

2.8. Kerangka Teori dan Deskripsi Kerangka Teori

2.8.1 Kerangka Teori



Gambar 2.13. Bagan Kerangka Teori

2.8.2. Deskripsi Kerangka Teori

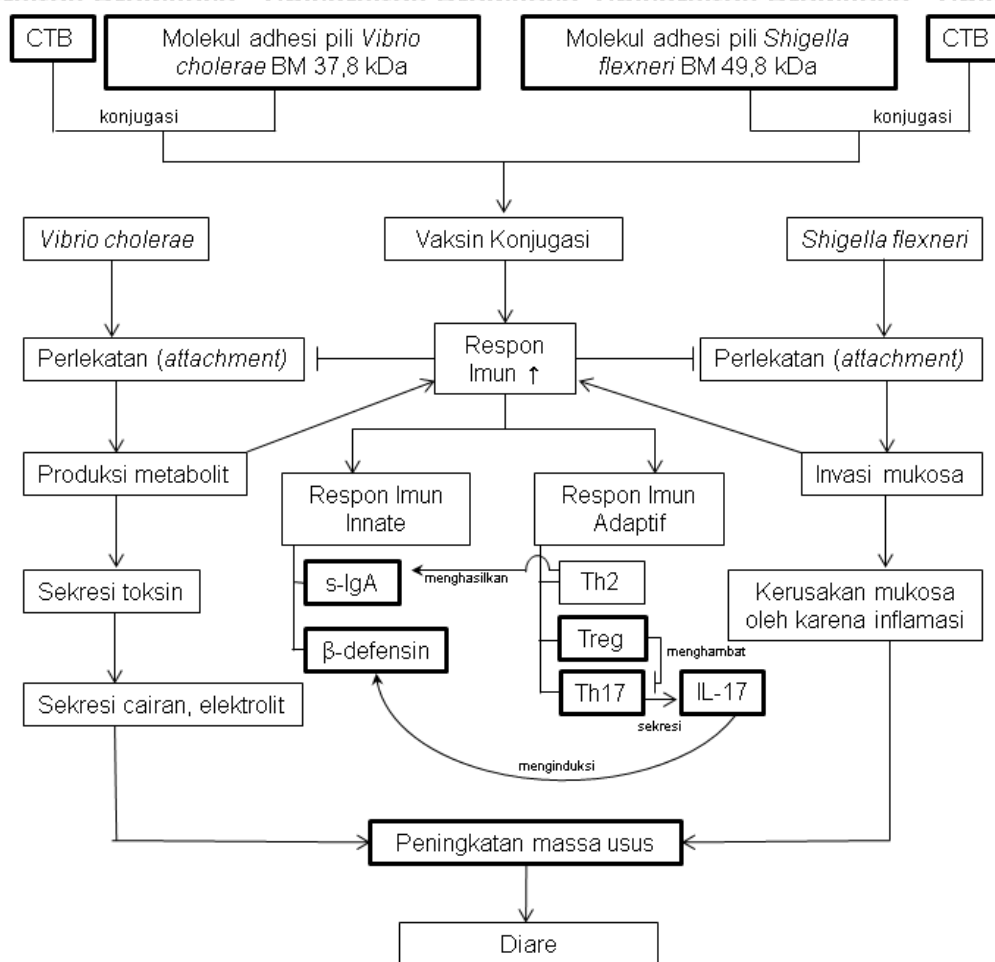
Vibrio cholerae memiliki komponen permukaan, yaitu pili dan OMP yang berperan dalam proses *attachment* pada patogenesis *Vibrio cholerae*. Protein yang berperan tersebut dinamakan molekul adhesi, yang bertugas untuk mengikat molekul reseptor. Adapun molekul adhesi yang telah ditemukan adalah OMP BM 37,8 kDa; pili BM 50,3 kDa; pili BM 37,8 kDa; pili BM 35,6 kDa; dan pili BM 21,3 kDa. *Vibrio cholerae* memproduksi *cholerae toxin* (CT) yang terdiri dari *cholerae toxin A* (CTA) dan *cholerae toxin B* (CTB). CTA merupakan toxin *toxigenic*, sedangkan CTB memiliki peran untuk mengikat *galnglioside* GM1 pada entrosit yang memfasilitasi masuknya CTA. CTA selanjutnya mengubah protein regulasi Gs inaktiv menjadi aktif. Aktivasi ini mengaktifkan enzim *adenylat cyclase* (AC). AC mengubah *adenosine triphosphat* (ATP) menjadi *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP). Akumulasi cAMP menyebabkan sekresi dari Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , dan air (H_2O) ke lumen usus sehingga terjadi diare berair (*waterry diarrhea*).

Adanya vaksinasi menginduksi respon imun innate berupa β -defensin, laktoferin, *cathelicidin*, dll serta respon imun adaptif berupa sel B, plasma, s-IgA dan IgG meningkat. Respon imun yang meningkat menghambat terjadinya patogenesis diare yang diakibatkan oleh *Vibrio cholerae*. Adapun vaksinasi yang pernah diteliti dan terbukti meningkatkan respon imun yaitu Sanchol (WC), Dukoral (WC-rBS), whole cell dengan CTB yang bukan hasil rekombinasi (WC-CTB), dan vaksinasi dari Sumarno *et. al.* (2011) konjugasi antara molekul adhesi pili *Vibrio cholerae* BM 37,8 kDa dengan CTB.

BAB III

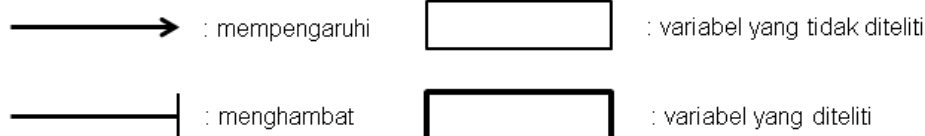
KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka *Grand Desain* Penelitian

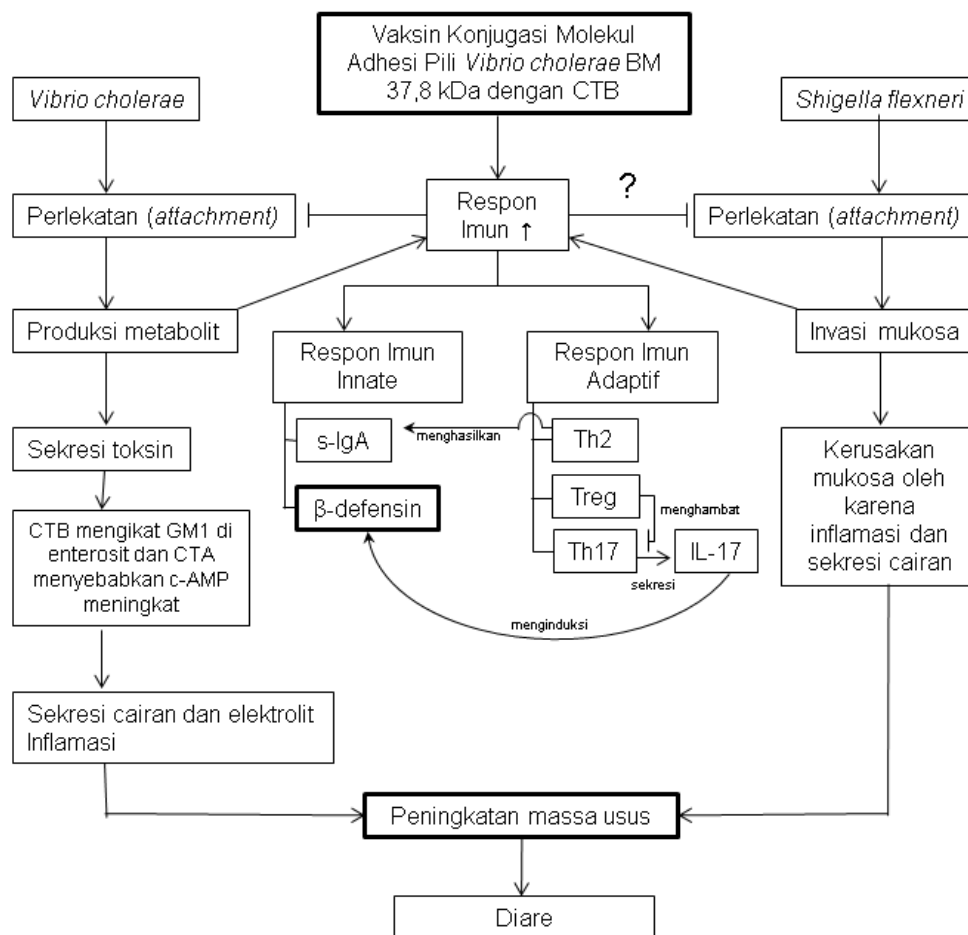


Gambar 3. 1. Bagan Kerangka Konsep *Grand Design* Penelitian

Keterangan Gambar :

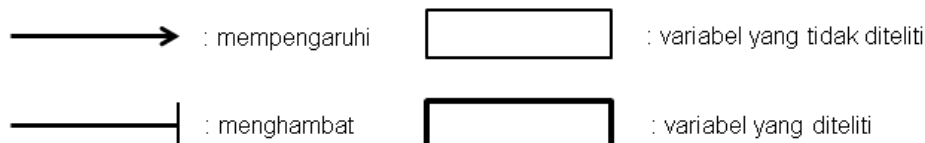


3.2. Kerangka Konsep Desain Penelitian secara Khusus



Gambar 3. 2. Bagan Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan Gambar :



3.3. Deskripsi Kerangka Konsep

Vibrio cholerae dan *Shigella flexneri* memiliki molekul adhesi yang berfungsi dalam tahap awal pada proses *attachment* (perlekatan bakteri pada enterosit usus halus pada *Vibrio cholerae* dan kolon pada *Shigella flexneri*). Molekul adhesi *Vibrio cholerae* adalah subunit pili dengan berat molekul (BM) 37,8 kDa (Sumarno *et al.*, 2011) dan molekul adhesi *Shigella flexneri* adalah subunit pili dengan berat molekul (BM) 49,8 kDa (Khoirul *et al.*, 2016). Molekul adhesi merupakan molekul yang berperan pada tahap awal patogenesis yang berperan dalam proses perlekatan kepada reseptor di enterosit. Diketahui molekul adhesi pili *Vibrio cholerae* BM 37,8 kDa dan molekul adhesi pili *Shigella flexneri* adalah BM 49,8 kDa sama sama merupakan molekul adhesi yang berperan dalam proses perlekatan (Sumarno *et al.*, 2011; Khoirul *et al.*, 2016) dan diketahui bahwa terdapat reaksi silang antigenik antara komponen permukaan *Vibrio cholera* O1, *Shigella flexnerii* 2a dan *Haemophilus influenzae* b (Rabbi *et al.*, 2008). Molekul adhesi pili *Vibrio cholerae* BM 37,8 kDa bila dikonjugasikan dengan CTB maka dapat menginduksi respon imun berupa s-IgA dan menghambat sekresi cairan (ditandai dengan turunnya massa usus) pada usus menciit yang diinfeksi *Vibrio cholerae* dengan metode MLIL (Sumarno *et al.*, 2011). Sehingga peneliti menduga dengan adanya vaksinasi pili *Vibrio cholerae* BM 37,8 kDa yang dikonjugasikan dengan CTB maka kemungkinan selain dapat menurunkan massa usus menciit yang diinfeksi *Vibrio cholerae* juga dapat menurunkan massa usus yang diinfeksi *Shigella flexneri*.

Setelah proses perlekatan oleh molekul adhesi patogenesis dilanjutkan.

Pada *Shigella flexneri* patogenesis dilanjutkan dengan invasi mukosa usus, lalu

Shigella flexneri akan membentuk kolonisasi sehingga terjadilah inflamasi yang

menyebabkan kerusakan jaringan dan terjadilah *bloody diarrhea*. Sedangkan pada *Vibrio cholerae*, patogenesis dilanjutkan dengan sekresi toksin. Toksin akan menyebabkan peningkatan c-AMP (*cyclic adenosine monophosphate*) sehingga menghasilkan sekresi dari cairan dan elektrolit ke lumen usus menyebabkan terjadinya *watery diarrhea* (patogenesis lengkap terdapat pada gambar 2.9. Kerangka Teori). Toksin yang dihasilkan oleh *Vibrio cholerae* adalah *cholerae toxin* yang terdiri dari sub-unit A (CTA) dan sub-unit B (CTB). CTA merupakan bentuk aktif dari subunit yang memiliki peran dalam patogenesis terjadinya penyakit kolera. CTB merupakan subunit yang berperan untuk mengikat enterosit (dijelaskan lebih lanjut pada Gambar 2.9 Kerangka Teori). CTB juga dapat berperan sebagai adjuvan bagi molekul adhesi. Molekul adhesi dan CTB dikonjugasikan untuk dijadikan vaksin. Vaksin akan meningkatkan respon imun inang yang dapat menghambat progresifitas diare yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri* dengan cara menghambat proses perlekatan kedua bakteri tersebut pada enterosit. Respon imun yang diinduksi yaitu efektor respon imun berupa Th2, Th17, dan Treg. Th2 memiliki peran untuk menghasilkan s-IgA yang fungsinya untuk mengikat patogen sehingga tidak dapat berikatan dengan enterosit. Th17 memiliki peran dalam melawan patogen pada mukosa usus dengan induksi inflamasi. Th17 menghasilkan sitokin IL-17 dan menginduksi produksi β -defensin oleh enterosit. β -defensin merupakan respon imun innate non-spesifik yang berperan dalam mengeradikasi patogen apapun yang masuk ke enterosit. Selain itu, tubuh juga memiliki mekanisme regulator yang mencegah aktivitas berlebihan dari Th17 sehingga tidak muncul respon imun berlebihan yang dapat merusak jaringan inang. Semua respon imun ini berperan dalam menghambat proses perlekatan dari bakteri *Shigella flexneri*

maupun *Vibrio cholerae* sehingga kedua bakteri tersebut tidak dapat menginfeksi enterosit

Harapannya dengan adanya pemberian vaksinasi berupa molekul adhesi pili *Vibrio cholerae* BM 37,8 kDa yang dikonjugasikan dengan CTB, akan dapat meningkatkan produksi respon imun innate yang dapat mengeradikasi berbagai patogen yang masuk ke enterosit sehingga tidak hanya mengeradikasi bakteri *Vibrio cholerae* namun juga mengeradikasi *Shigella flexneri* sehingga diare tidak terjadi. Parameter yang akan diukur untuk mengetahui efek vaksinasi ini dalam menghambat diare adalah massa usus dan parameter yang akan diukur untuk mengetahui respon imun innate adalah β -defensin. Dengan adanya vaksinasi, maka diharapkan adanya peningkatan respon imun innate (β -defensin) dan berkurangnya diare yang ditandai dengan adanya reduksi cairan sehingga berat usus menurun.

3.4. Hipotesis

3.4.1. Vaksinasi oleh molekul adhesi pada pili *Vibrio cholera* dengan berat molekul 37,8 kDa yang dikonjugasikan dengan CTB dapat meningkatkan kadar β -defensin pada mencit

3.4.2. Vaksinasi oleh molekul adhesi pada pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang dikonjugasikan dengan CTB dapat menurunkan massa usus (menghambat progresifitas keluarnya cairan) pada mencit yang diinfeksi *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*). Penelitian menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Control*

Group Design. Penelitian menggunakan mencit balb/c. Dipilihnya mencit balb/c sebagai hewan coba adalah karena mudah untuk dikembangbiakkan dan merupakan mencit yang baik untuk produksi antibodi monoklonal (Nguyen *et al.*, 2015; Sawasvirojwong *et al.*, 2013). Selain itu hewan coba mencit juga relatif lebih murah dibandingkan dengan hewan coba lainnya. Mencit yang digunakan pada setiap kelompok dipilih dengan cara randomisasi sederhana.

Penelitian dilakukan secara *in vivo* untuk parameter β -defensin. Untuk parameter β -defensin mencit balb/c dikelompokkan ke dalam 2 kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok vaksinasi (tabel 4.1). Kelompok kontrol terdiri dari 15 subjek dan kelompok vaksinasi terdiri dari 10 subjek. Setelah tikus dibedah, dilakukan *scrapping* mukosa usus untuk pengukuran kadar β -defensin.

Selanjutnya, penelitian dilakukan secara *ex vivo* untuk parameter massa usus yang mana usus mencit balb/c dikelompokkan ke dalam 5 kelompok. 5 kelompok tersebut berasal dari kelompok kontrol dan kelompok vaksinasi yang digunakan pada parameter β -defensin. Kelompok kontrol dibagi menjadi 3 yang terdiri dari kelompok kontrol negatif (KN), kelompok kontrol positif shigella (KPS), dan kelompok kontrol positif vibrio (KPV). Kelompok vaksinasi dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok vaksinasi vibrio infeksi shigella (VVS) dan kelompok vaksinasi vibrio infeksi vibrio (VVV) (tabel 4.1). Masing-masing kelompok

berjumlah 5 subjek. Setelah dilakukan MLIL, peningkatan atau penurunan massa usus ditimbang.

4.2. Populasi dan Jumlah Subjek

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit balb/c dengan usia kurang lebih 6-8 minggu dengan berat 20-30 gram. Mencit yang dimasukkan dalam penelitian adalah mencit jantan yang sehat, bergerak aktif, mau makan dengan baik, dan tidak terdapat kelainan anatomis.

Perhitungan pengulangan sampel menggunakan rumus Federer (1963) dalam (Wahyuni, 2008) adalah sebagai berikut :

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

p : jumlah perlakuan, n : jumlah pengulangan

Adapun rumus perhitungan sampel pada penelitian ini dihitung adalah sebagai berikut:

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

$$4 n - 4 \geq 15$$

$$4 n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Untuk setiap perlakuan dilakukan 5 kali pengulangan sehingga total sampel yang dibutuhkan adalah 25 ekor mencit. Penelitian ini telah mendapat keterangan kelaikan etik dari Komisi Etik Universitas Brawijaya oleh proposal yang berjudul "Reaksi Silang Respons Imun antara Molekul adhesin *Shigella* dan *Vibrio cholerae*" No. 44/EC/KEPK-S2/03/2018 tanggal 16 Maret 2018 (Lampiran 1).

Tabel 4.1. Jumlah sampel di tiap perlakuan.

Kelompok Pre-Infeksi	Kelompok Post Infeksi	n	Induksi dan Perlakuan
Kelompok Kontrol (n=15)	Kontrol Negatif (KN)	5	Tidak diberi vaksin molekul adhesin dan tidak diinfeksi <i>Vibrio cholerae</i> maupun <i>Shigella flexneri</i>
	Kontrol Positif Infeksi <i>Shigella flexneri</i> (KPS)	5	Tidak diberi vaksin molekul adhesin dan diinfeksi dengan 10^6 CFU/mL <i>Shigella flexneri</i>
	Kontrol Positif Infeksi <i>Vibrio cholera</i> (KPV)	5	Tidak diberi vaksin molekul adhesin dan diinfeksi dengan 10^6 CFU/mL <i>Vibrio cholerae</i>
Kelompok Vaksinasi (n=10)	Vaksinasi <i>Vibrio Shigella flexneri</i> (VVS)	5	Diberikan vaksin molekul adhesin <i>Vibrio cholerae</i> dan diinfeksi 10^6 CFU/mL <i>Vibrio cholerae</i>
	Vaksinasi <i>Vibrio cholerae</i> (VVV)	5	Diberikan vaksin molekul adhesin <i>Vibrio cholerae</i> dan diinfeksi 10^6 CFU/mL <i>Shigella flexneri</i>

4.3. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Laboratorium Mikrobiologi FKUB, Laboratorium Biomedik FKUB, dan Laboratorium Parasit FKUB. Perawatan tikus selama penelitian dilakukan di Laboratorium Parasit FKUB. Pembedahan tikus dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Pengukuran β -defensin dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUB. Pengukuran massa usus dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Waktu penelitian dilaksanakan mulai sekitar bulan November sampai dengan Oktober 2018. Kemudian dilakukan analisis data sesuai dengan parameter yang ditentukan.

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah molekul adhesi *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang dikonjugasi dengan CTB.

4.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar protein β -defensin mukosa usus dan massa usus mencit.

4.5. Definisi Operasional

4.5.1. Mencit Balb/c: Mencit jantan spesies *mus musculus* galur B albino clone

(Balb/c) jantan berumur kurang lebih 6-8 minggu dengan berat badan kurang lebih 20-30 gram. Mencit balb/c dirawat pada kandang berukuran 40x30x20 cm dilengkapi dengan alat minum mencit. Setiap harinya mencit diberi pakan standar untuk mencit. Mencit dirawat di Laboratorium Parasitologi FKUB. Penelitian ini telah mendapat keterangan kelaikan etik dari Komisi Etik Universitas Brawijaya.

4.5.2. Bakteri *Vibrio cholerae* 01 : diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, kemudian dikultur pada media TCBS. Bakteri lalu dipanen untuk kemudian diinjeksikan pada metode MLIL pada kelompok KPV dan VVV. Selain itu, pili bakteri dipotong lalu pili ditanam pada media TCG untuk memperkaya pili. Pili yang selanjutnya diambil adalah protein adhesi dengan berat molekul 37,8 kDa.

4.5.3. Bakteri *Shigella flexneri*: diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, kemudian dikultur pada media SSA. Bakteri lalu dipanen untuk kemudian diinjeksikan pada metode MLIL pada kelompok KPS dan VVS.

4.5.4. Vaksin konjugasi : adalah vaksin yang mengandung gabungan antigen

lemah dengan antigen kuat. Antigen lemah berasal dari polisakarida

bakteri. Antigen kuat adalah protein yang berfungsi sebagai carrier yang dapat meningkatkan respon imun yang kuat dari host. Dengan adanya penggabungan antigen lemah dan antigen kuat, maka respon imun yang muncul terhadap antigen lemah jauh lebih kuat. Antigen lemah pada penelitian ini adalah molekul adhesi pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa. Antigen kuat pada penelitian ini adalah *cholerae toxin subunit B* (CTB). Proses penggabungan kedua protein ini menganut pada penelitian oleh Sumarno *et. al.* (2011).

4.5.5. Protein adhesi pili 37,8 kDa: Protein yang diisolasi dari subunit pili *V.cholerae* O1. *V.cholerae* O1 dilakukan pemotongan pili dengan menggunakan *pili cutter* di laboratorium Biomedik FKUB. Berat molekul protein adhesi dideteksi melalui SDS-PAGE, lalu dilakukan proses elektroelusi dan dialisis setelah untuk mendapatkan pili yang siap dikonjugasikan dengan CTB.

4.5.6. CTB : adalah *cholerae toxin subunit B*. CTB berperan dalam mengikat ganglioside GM1 pada enterosit sehingga memfasilitasi molekul adhesi agar berikatan kuat dengan enterosit. CTB diperoleh dari *Elabscience*. CTB pada penelitian ini digunakan untuk dikonjugasikan dengan molekul adhesi.

4.5.7. Vaksinasi konjugasi protein adhesi dengan CTB: Vaksin berasal dari hasil isolasi protein pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang ditambahkan dengan adjuvan berupa CTB. Proses konjugasinya membutuhkan 8 mg protein dalam 1,5 ml PBS dan CTB 0,230 mg dalam 1,5 ml PBS. Adapun dosis yang diberikan untuk vaksinasi adalah 250 µg

sesuai dengan penelitian Sumarno *et. al.* (2011). Vaksinasi diberikan secara peroral pada mencit pada hari ke 7, 14, 21, dan 28.

4.5.8. β -defensin: merupakan peptida antimikroba bersifat bakterisidal dan kemoatraktan yang dihasilkan oleh sel epitel enterosit akibat rekognisi terhadap molekul patogen. Pengukuran kadar β -defensin dilakukan dengan metode *sandwich* ELISA di Laboratorium Biomedik. KIT ELISA yang digunakan saat penelitian berasal dari MyBioSource. Sampel berasal dari sampel sekret usus mencit yang diambil pasca pembedahan pada hari ke-35 penelitian. Hasil dari pengukuran kadar β -defensin dicatat dengan satuan ng/mL.

4.5.9. Massa Usus : Massa usus adalah massa dari usus mencit balb/c yang diukur pasca pembedahan di Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Usus diperoleh setelah dilakukan pembedahan mencit pada hari ke-35 penelitian. Setelah pembedahan, usus mencit dipotong 4 cm distal dan 4cm proksimal untuk kemudian diligasi di kedua ujungnya. Masing-masing kelompok dilakukan injeksi bakteri sesuai dengan metode MLIL oleh Sumarno *et. al.* (2011) pada usus sepanjang 4cm. Usus kemudian ditimbang secara serial dengan menggunakan timbangan digital dan hasil dicatat dalam satuan gram.

4.5.10. Metode MLIL: Merupakan metode *mice ligated ileal loop* dari Sumarno *et. al.* (2011). Usus mencit yang telah diligasi diinokulasikan dengan bakteri *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri* sebanyak 10^6 paska pembedahan sehingga tidak menyiksa mencit. Selanjutnya usus diletakkan dalam media RPMI untuk diinkubasi selama 1 jam. Sembari diinkubasi, massa usus mencit dilakukan penimbangan serial.

Meningkatnya massa usus menandakan terjadinya akunulasi cairan pada lumen usus atau inflamasi pada sel enterosit usus. Menurunnya massa usus menandakan berkurangnya akumulasi cairan pada lumen usus atau meredanya inflamasi pada enterosit usus

4.6. Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1. Perawatan Hewan Coba

Alat yang diperlukan untuk merawat hewan coba adalah kandang berukuran 40x30x20 cm, tutup kandang, dan botol minum mencit. Bahan yang diperlukan adalah pakan standar mencit, air, dan sekam.

4.6.2. Kultur Bakteri *Shigella flexneri*

Alat yang digunakan adalah *plate agar*, *scraper*, botol, *handscoen*, *water bath*, dan *inkubator*. Bahan yang digunakan adalah agar Mac-Conkey agar, *Salmonella-shigella* agar, phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4), dan medium *Salmonella-shigella* agar (SSA).

Bakteri yang dikultur berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.6.3. Kultur Bakteri *Vibrio Cholerae*

Alat yang digunakan adalah *plate agar*, *scraper*, botol, *water bath*, *hanscoen*, dan *inkubator*. Bahan yang digunakan adalah Medium *Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose* (TCBS) agar, PBS, *brain heart infusion broth* (BHI), medium TCG yang terdiri atas 0,02% thioproline, 0,3% NaHCO₃, 0,1% monosodium l-glutamat, 1% bacto trptone, 0,2% yeast extract, 0,5% NaCl, 2% bacto agar dan 1mM β -amino ethyl ether – N,N,N,"n"-tetra acetic acid (EGTA). Bakteri yang dikultur berasal dari

Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
Malang.

4.6.4. Isolasi Protein Pili *Vibrio cholerae*

Alat yang dibutuhkan untuk isolasi protein pili botol roux, pili cutter, sentrifugator, tabung wadah pili, vortex, dan refrigerator 4°C. Bahan yang dibutuhkan untuk isolasi protein pili adalah hasil kultur bakteri *Vibrio cholerae* O1, tri chlor acetic acid (TCA), PBS pH 7,4.

4.6.5. SDS PAGE

Alat yang diperlukan adalah *electrophoresis chamber and gel casting kit* dan alat untuk scanning berupa *Doc EZ Imager*. Bahan sampel yang digunakan supernatant pili bakteri *V. Cholerae* yang dicampur dengan *Reducing Sample Buffer* (RSB). Bahan yang digunakan untuk membuat *separating* gel adalah 2,5 ml 1,5 M Tris HCl pH 8,8; 3,4 ml DD H₂O; 4,0 ml acrylamide 30%; 0,1 ml 100% w/v SDS; 50 µl amonium persulfate (APS) 10%; dan 5 µl TEMED. Bahan yang digunakan untuk membuat *stacking* gel adalah 1,25 ml 1,5 M Tris HCl pH 8,8; 3,1 ml DD H₂O; 0,65 ml acrylamide 30%; 0,05 ml 100% w/v SDS; 25µl amonium persulfate (APS) 10%; dan 2,5 µl TEMED. Bahan yang digunakan untuk *running* gel adalah 10 µl protein marker/well. Bahan yang digunakan untuk pewarnaan adalah *staining buffer* (comassie blue) dan *de-staining buffer*.

4.6.6. Elektroelusi dan Dialisis

Alat yang digunakan adalah cawan petri, *chamber elektroelusi*, kantong selofan, *stirrer*, *centrifugator*, gelas beker, tabung *eppendorf*,

nanodrop, jepit, *handscoon*, dan pendingin. Bahan yang digunakan adalah ddH₂O, EDTA, 5% Na₂CO₃, Akuades steril, PBS steril, ethanol absolut, *comassie blue*, *destaining*, *Tris-Cl*, dan gel yang sudah dipotong tepat pada berat molekul 37,8 kDa

4.6.7. Konjugasi Vaksin dan Pemberian Vaksinasi

Alat yang diperlukan adalah mikropipet, lemari asam, lemari es, tabung *eppendorf*, *stirrer*, *inkubator*. Bahan yang diperlukan adalah protein adhesi dengan berat molekul 37,8 kDa, *cholerae toxin B* (CTB), PBS, glutaraldehyd 2%, glycine pH 7,2.

4.6.8. Pembedahan Mencit dan MLIL

Alat dan bahan yang diperlukan adalah gunting bedah, pinset, jarum pentul, steroform, penggaris, kertas label, termos es, kapas, wadah plastik + tutup. Bahan yang diperlukan adalah mencit balb/c, PBS, kloroform 20 ml, formalin 10% 200 ml, alcohol, shaker, RPMI, bakteri *Vibrio cholerae* O1, bakteri *Shigella flexneri* sebanyak 10⁶ CFU per mL.

4.6.9. Pengukuran β -defensin dengan Metode ELISA

Alat yang digunakan adalah micropipete *single channel* dan *multichannel*, *handscoon*, *vortex mixer*, aluminium foil, *pre-coated ELISA plate* (96-well), *plate sealer*, tabung *eppendorf*, rak tabung *eppendorf*, *microplate reader*, spatel, dan zipper bag. Bahan yang digunakan adalah sekret hasil *scrapping* dari usus mencit, *standard solution* (320ng/mL), *standard diluent*, streptavidin-HRP, *stop solution*, *substrate solution A*, *substrate solution B*, *wash buffer concentrate* (25x), *biotinylated mouse β -DF antibody*, mouse β -defensin ELISA KIT dari MyBioSource.

4.6.10. Pengukuran Massa Usus

Alat yang digunakan adalah gunting jaringan, pinset, benang, inkubator, spuit 3 cc, *shaker*, botol 250 mL, jam, alat untuk mencatat, dan timbangan digital. Bahan yang digunakan adalah usus mencit post pembedahan, *Vibrio cholerae* O1 sebanyak 10^6 CFU/mL, *Shigella flexneri* 10^6 CFU/mL, Roswell Park Medium Institute (RPMI), dan PBS.

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Perawatan Hewan Coba

Sebelumnya penelitian dilakukan dengan melakukan pengurusan etik (*ethical clearance*) yang diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Selanjutnya setelah mendapat surat kelayakan etik, penelitian dimulai dengan memesan mencit balb/c.

Setelah mencit balb/c datang, mencit lalu dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu di Laboratorium Parasit Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang agar mencit siap untuk memasuki proses penelitian. Setiap hari mencit diberikan pakan berupa pakan mencit standar yang diganti setiap harinya. Selain itu sekam pada tempat tinggal mencit diganti setiap tiga hari sekali. Setelah itu mencit dipilih secara randomisasi sederhana supaya semuanya memiliki kesempatan yang sama. Mencit dimasukkan ke dalam kelompok sesuai tabel 4.1. Setelah pemberian vaksinasi selama 28 hari dilakukan pembedahan dan usus

mencit diambil. Sebagian usus dilakukan *scrapping* pada mukosa usus

untuk selanjutnya dilakukan pengukuran kadar β -defensin pada 2

kelompok yaitu kelompok kontrol (n=15) dan kelompok vaksinasi (n=10).

Selanjutnya sebagian usus lainnya dilakukan metode MLIL yang mana

usus diinfeksi sesuai kelompok pada tabel 4.1. (keterangan lebih

lengkap terdapat pada definisi operasional).

4.7.2. Kultur *Shigella flexneri*

Shigella flexneri yang digunakan pada penelitian ini didapat dari

Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Malang. *Shigella flexneri* ditanam pada agar *Salmonella-shigella agar*

sebagai media selektif. Bakteri *Shigella flexneri* lalu dipanen dari

Salmonella Shigella agar.

4.7.3. Kultur *Vibrio Cholerae*

Vibrio cholerae yang digunakan pada penelitian ini adalah *vibrio*

cholerae O1 yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas

Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. *Medium Thiosulfate-citrate-bile*

salts-sucrose (TCBS) agar digunakan sebagai media selektif pada

pertumbuhan *Vibrio cholerae* O1. Bakteri *Vibrio cholerae* O1 lalu dipanen

dan dicampurkan dengan PBS steril dengan pH 7,4 sebanyak 10cc.

Suspensi yang terbentuk lalu dikerok dan dituangkan dalam botol yang

sudah terisi BHI lalu diletakkan dalam *waterbath* suhu 37°C, dikocok

selama 30 menit lalu dimasukkan dalam media TCG. Medium TCG

digunakan untuk meningkatkan produksi dari pili *Vibrio cholerae*. Medium

TCG terdiri dari 0,02% thioprolin, 0,3% NaHCO₃, 0,1% monosodium L-glutamat, 1% bacto triptone, 0,2% yeast extract, 0,5% NaCl, 2% bacto agar dan 1mM β -amino ethyl ether -N,N,N',n'-tetra acetic acid (EGTA). Lama inkubasi kultur dalam medium TCG adalah selama 2 x 24 jam dalam suhu 37°C.

4.7.4. Isolasi Pili *Vibrio cholerae*

- a. Kultur bakteri dikumpulkan dari medium TCG sebanyak 20 botol roux.
- b. Bakteri yang dikumpulkan dari 20 botol roux medium TCG diresuspensi dengan TCA hingga mencapai konsentrasi 3%.
- c. Suspensi dikocok menggunakan vortex selama 30 detik dan didiamkan dalam suhu ruang selama 1 jam.
- d. Pelet bakteri diambil dari hasil sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.
- e. Tiga gram dari pelet diresuspensi menggunakan 6 ml PBS pH 7,4 dan supernatant dibuang.
- f. Hasil resuspensi tersebut kemudian ditempatkan pada tabung hasil potongan pili.
- g. Setelah itu dilanjutkan series pemotongan kedua dengan *pili cutter* (Sumarno, 2000) pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit dalam suhu 4°C.
- h. Isolasi pili bakteri dilanjutkan dengan sentrifugasi suspensi hasil potongan pili pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit dalam

suhu 4°C. Supernatan yang kaya protein pili bakteri dipisahkan dari pelet dan disimpan pada suhu 4°C.

i. Pengumpulan supernatan hasil potongan kedua dan ketiga diisolasi dari pellet menggunakan prosedur yang sama dengan pemotongan pertama.

j. Pengumpulan pili dilanjutkan dari series pemotongan ke empat hingga supernatant bening dengan indikator perbandingan menggunakan larutan PBS.

k. Selanjutnya dilakukan uji nanodrop untuk mengetahui konsentrasi *crude pili* pada setiap mililiter.

4.7.5. SDS PAGE

- a. Membuat larutan separating dengan mencampurkan 3.4 ml DD H₂O, 4.0 ml Acrylamide/Bis, 2.5 ml gel buffer (1.5M Tris HCl pH 8.8) dan 0.1 ml 100% w/v SDS, kemudian ditambahkan 50 µl 10% APS dan 5 µl TEMED, divortex.
- b. Menangkan larutan separating ke dalam gel cassette lalu mendiamkan hingga mengeras.
- c. Membuat larutan stacking dengan mencampurkan 3.1 ml DD H₂O, 0.65 ml Acrylamide/Bis, 1.25 ml gel buffer (1.5M Tris HCl pH 6.8) dan 0.05 ml 100% w/v SDS, kemudian ditambahkan 25 µl 10% APS dan 2.5 µl TEMED, divortex.
- d. Menuangkan larutan stacking ke dalam gel cassette yang telah berisi larutan separating. Tambahkan DD H₂O untuk meng-adjust volume.

e. Memasang cetakan (comb) ke dalam gel cassette, tunggu hingga stacking gel mengeras.

f. Melepaskan gel cassette dari gel casting, dan masukkan ke dalam chamber.

g. Menuangkan running buffer hingga gel cassette terendam sempurna. Menambahkan running buffer hingga gel cassette terendam sempurna.

h. Menyiapkan sampel yang akan digunakan (pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa).

i. Menambahkan RSB (*Reducing Sample Buffer*) ke dalam sampel dengan perbandingan 1:1 dan memanaskan selama kurang lebih 5 menit untuk mendenaturasi protein.

j. Masukkan 10 μ l marker protein ke dalam well. Masukkan sampel ke dalam masing-masing well yang telah tercetak (± 15 -20 μ l/well).

k. Melakukan running gel selama 35 menit dengan tegangan 200v, constant voltage. Perhatikan pergerakan marker protein dan tracking dye (berwarna biru).

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

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

n. Menuangkan larutan staining buffer hingga gel terendam sempurna. Inkubasi selama ± 4 jam-overnight dalam shaker inkubator. Ganti larutan staining buffer dengan larutan de-staining

buffer. Inkubasi dalam shaker inkubator hingga pita-pita protein tampak jelas.

- o. Setelah berat molekul dari protein pili berhasil teridentifikasi menggunakan Doc EZ Imager, pili dengan berat molekul 37,8 kDa

Vibrio cholerae dipurifikasi menggunakan elektroelusi.

4.7.6. Elektroelusi dan Dialisis

4.7.6.1. Elektroelusi

- a. Memotong selofan sepanjang $\pm 6-8$ cm.
- b. Mendidihkan bertahap dalam : 5% Na_2CO_3 selama 15 menit ex. 5 gram dalam 100 mL H_2O lalu di-*washing* di akuades steril dingin; 50mM EDTA pH 8 selama 15 menit ex. 1,861 gram dalam 100 mL H_2O lalu di-*washing* dengan akuades steril dingin; akuades steril dingin yang mendidih selama 15 menit.
- c. Setelah proses selesai, selofan siap untuk dipakai.
- d. Menyediakan cawan petri sejumlah jenis pita yang dipotong yang sudah diisi *running buffer*.
- e. Memotong *band* yang diinginkan dari hasil *running* elektroforesis dan memasukkan hasil potongan yang dibagi tiga ke satu cawan petri dengan urutan 3-3-4 ke dalam satu cawan petri.
- f. Membilas selofan dengan *running buffer* sebelum diisi dengan potongan pita protein.
- g. Mengisi selofan yang sudah dijepit salah satu sisinya dengan *running buffer*.
- h. Mengisi dengan pita protein, lalu menjepit sisi lainnya dengan menjaga agar tidak ada gelembung.

i. Me-running dalam *chamber electrophoresis horizontal* 120V selama 60 menit.

j. Mengangkat untuk dilakukan proses dialisa

4.7.6.2. Dialisis

a. Sampel pita protein dalam selofan yang sudah dijepit kedua sisinya

dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang telah terisi PBS steril dingin.

b. Memasukkan dalam *stirer* selama 24 jam dalam suhu 4°C.

c. Setiap 8 jam mengganti dengan PBS baru yang dingin sebanyak 1L.

d. Mengangkat selofan dan mengoleksi supernatannya (cairan akan berubah menjadi biru).

e. Memasukkan supernatan ke dalam tabung *eppendorf*, masing-masing *eppendorf* diisi 500 μL ($\pm$ 2-3 *eppendorf*).

f. Melakukan presipitasi dengan menambahkan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 yaitu sebanyak 500 μL dan disimpan dalam 4°C *overnight*.

g. Melakukan sentrifugasi 12000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C.

h. Membuang supernatan di dekontasi dan mengeringkannya

i. Menimbang berat pelet dalam *buffer* Tris-Cl- 0,5m pH 8

j. Menyimpan pada suhu -40°C

4.7.7. Konjugasi Vaksin dan Pemberian Vaksinasi

a. Penggabungan Protein Adhesi Berat molekul 37,8 kDa dengan CTB dilakukan sesuai prosedur Santoso (2000). Protein 37,8 kDa diambil sebanyak 8 mg di dalam 1,5 ml PBS, selanjutnya CTB sebanyak 0,230 mg dalam 1,5 ml PBS

- b. Mengaduk protein 37,8 kDa dengan CTB dalam lemari asam dan ditambahkan 2% Glutaraldehyde 3 cc. Inkubasi suhu ruangan selama satu jam dengan diaduk perlahan. Ditambahkan Glicyne PH 7.2 sebanyak 2.24 ml (BM=75.07) diinkubasi di suhu ruangan selama satu jam diaduk perlahan, setelah itu didialisa dengan PBS semalam sebanyak 4 kali. Kemudian disimpan -20°C .

- c. Kemudian vaksin diberikan secara peroral pada mencit pada hari ke 7, 14, 21, dan 28, dimana proses konjugasinya membutuhkan 8 mg protein dalam 1,5 ml PBS dan CTB 0,230 mg dalam 1,5 ml PBS.

4.7.8. Pembedahan Mencit

- a. Semua mencit dibedah setelah seluruh dosis vaksinasi diberikan.
- b. Mencit dianestesi terlebih dahulu per inhalasi dengan kloroform diwadahi tertutup.
- c. Mencit dibaringkan pada permukaan meja yang keras yang dialasi dengan streofoam. Kaki dan tangan mencit difiksasi dengan jarum pentul pada atas streofoam.
- d. Toraks dan abdomen mencit dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median. Pembukaan abdomen diperluas ke arah lateral, sehingga organ organ dalam rongga abdomen terlihat.
- e. Dilakukan pengambilan organ usus, lalu Usus yang didapatkan lalu dipotong menjadi tiga bagian untuk dilakukan metode MLIL, pengukuran kadar β -defensin, dan pengukuran kadar s-IgA. Adapun pengukuran s-IgA dilakukan pada penelitian Indraswari (2019).

- f. Usus yang didapatkan lalu dilakukan *scrapping* dan ditampung dalam wadah untuk pengukuran kadar β -defensin dan usus yang lainnya akan dipapar dengan bakteri *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri* dalam metode MLIL.

4.7.9. Pengukuran Kadar β -defensin (ELISA)

Usus halus mencit dipotong longitudinal hingga lumen terbuka, kemudian permukaan usus tersebut *di-scrapping* dan dicuci dengan 2 ml PBS yang mengandung 1 mM PMSF. Kemudian, cairan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm dalam suhu 40°C untuk memisahkan debris. Supernatan diambil dan disimpan untuk diukur β -defensin dengan metode ELISA.

- a. Dilakukan pengenceran *standard solutions* : (Kit ini memiliki *standard original concentration* yang dapat diencerkan dalam wadah-wadah kecil secara bebas oleh pemakai dengan mengikuti instruksi).
- b. Jumlah *stripes* yang dibutuhkan tergantung pada sample yang akan diteliti dengan standar tersebut. Sangat disarankan bahwa tiap *standard solutions* dan tiap *blank well* harus tersusun dalam 3 atau lebih bila memungkinkan.
- c. Injeksi sample :

- *Blank well* : tidak dimasukkan sampel, antibodi anti β -defensin dilabel dengan biotin atau streptavidin HRP ditambahkan sebagai pembanding *blank well* kecuali chromogen A dan B dan Stop solution diberikan dalam step yang sama pada langkah selanjutnya.

- *Standard solution well* : dimasukkan 50 µl standard dan streptavidin HRP 50 µl (antibodi biotin bergabung dalam *standard advance*. Jadi tidak ada biotin antibodi yang ditambahkan).

- Sample well untuk dilakukan pemeriksaan : 40 µl sampel ditambahkan ke dalam well kemudian 10 µl sIgA antibodi, 50 µl streptavidin HRP. Kemudian tutup dengan seal plate membrane. Divortex untuk mencampurkan kemudian simpan pada 37° selama 60 menit.

d. Persiapan untuk *washing solution*: dilarutkan *washing concentration* (30x) dengan *distilled water* untuk digunakan nantinya.

e. Dilakukan washing : *seal plate membrane* dibuka secara hati-hati, ditiriskan dan kocok liquid yang tersisa. Isi tiap well dengan *washing solution*. Tiriskan liquid setelah 30 detik. Ulangi langkah ini 5x.

f. *Color development* : ditambahkan 50 µl chromogen solution A pada tiap well dan juga ditambahkan 50 µl chromogen solution B pada tiap well. Dikocok secara perlahan agar tercampur. Disimpan selama 10 menit pada suhu 37° dan dijauhkan dari cara untuk color development.

g. Stop: menambahkan 50 µl stop solution pada tiap well untuk menghentikan reaksi (warna biru akan berubah secara cepat menjadi kuning seketika itu juga).

h. Assay : diambil blank well sebagai zero, dilakukan pengukuran nilai absorbansi (OD) di tiap well satu persatu pada 450 nm wavelength, yang seharusnya dilakukan sekitar 10 menit setelah melakukan stop solution.

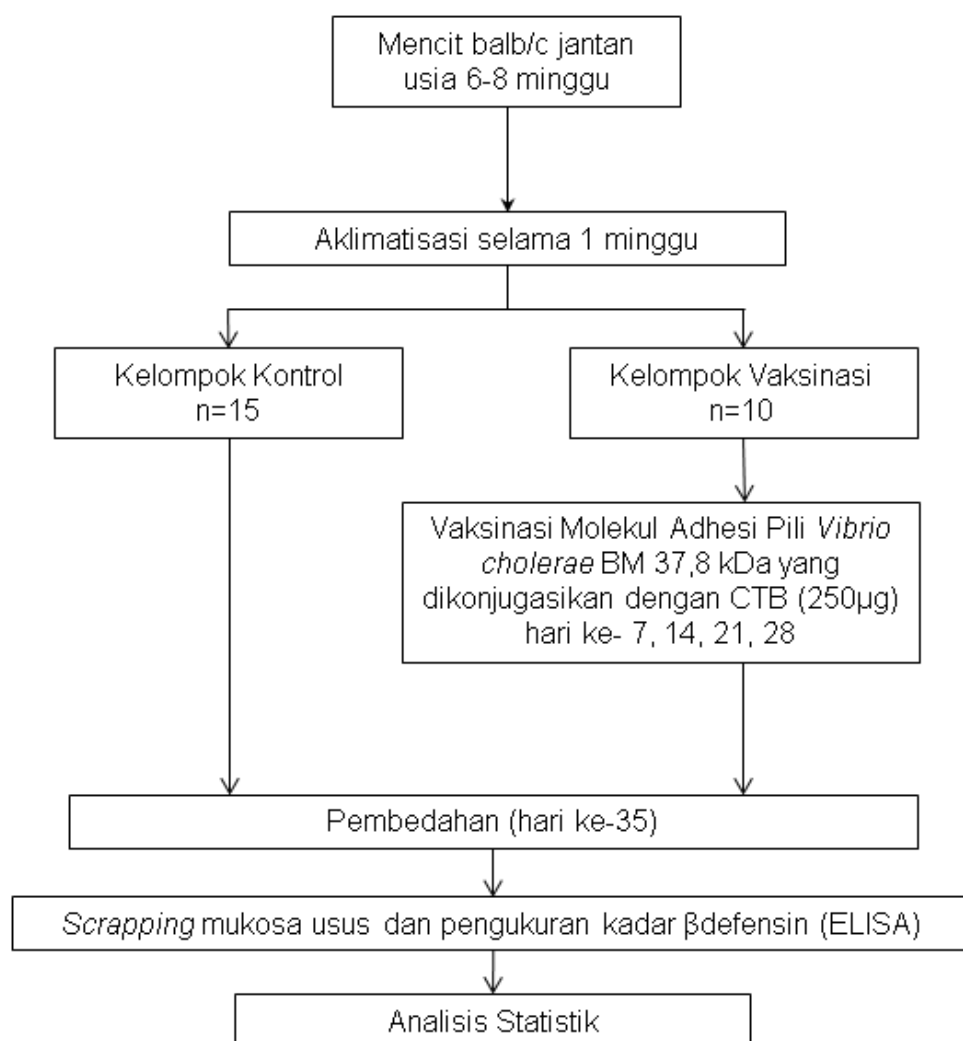
i. Berdasarkan *standard concentration* dan *corresponding* jumlah OD, dihitung *regresi linear equation* dari kurva standard. Kemudian berdasarkan nilai OD sampel, dihitung konsentrasi dan *corresponding* sampel. Software khusus dapat digunakan untuk menghitung ini secara tepat.

4.7.10. MLIL dan pengukuran Massa Usus

- a. Usus mencit diambil sepanjang usus halus hingga kolon dan dipotong 4 cm distal dan 4 cm proksimal lalu sebagian digunakan untuk metode MLIL. Usus yang digunakan untuk metode MLIL berbeda dengan usus yang digunakan untuk pengukuran kadar β -defensin.
- b. Usus yang telah dipotong kedua ujungnya diikat dengan benang
- c. Usus lalu diinjeksikan sesuai dengan kelompok pada tabel 4.1. dengan *Vibrio cholerae* O1 atau *Shigella flexneri* sebanyak 10^6 CFU/ ml.
- d. Usus diletakkan pada botol 250 mL yang berisi media RPMI, lalu diletakkan di atas *shaker* pada suhu 37°C
- e. Usus lalu ditimbang pada menit ke 0, ke-30, dan ke-60.
- f. Mencit dengan rasio berat/panjang minimal 0,1 g/cm maka dinyatakan positif mengalami diare.

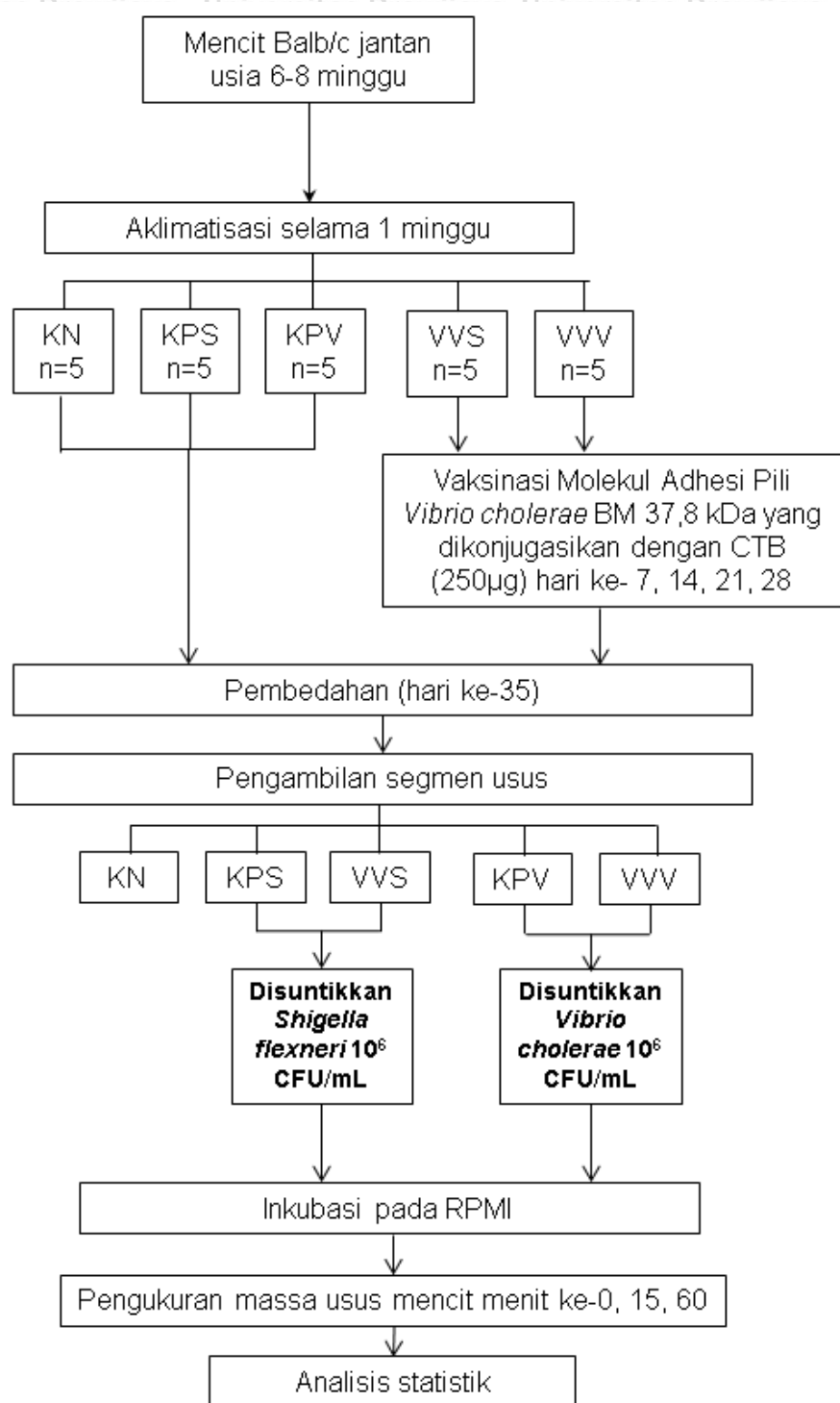
4.8. Alur Penelitian

4.8.1. Alur Penelitian Parameter β -defensin



Gambar 4.1. Bagan Alur Penelitian Parameter β -defensin

4.8.2. Alur Penelitian Parameter Massa Usus



Gambar 4.2. Bagan Alur Penelitian Paramater Massa Usus

4.8.3. Deskripsi Alur Penelitian

Pada penelitian ini digunakan mencit balb/c usia 6-8 minggu yang terbagi pada 5 kelompok. Semua tikus diberi pakan normal. Pada minggu pertama semua tikus dilakukan aklimatisasi. Kelompok vaksinasi (VVV dan VVS) lalu diberikan vaksinasi molekul adhesi pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang dikojugasikan dengan CTB (sesuai definisi operasional) pada hari ke 7, 14, 21, dan 28. Sedangkan kelompok kontrol (KN, KPV, KPS) tidak diberikan apapun selain pakan normal. Setelah hari ke-28, 1 minggu setelahnya, mencit dibedah lalu diinfeksi sesuai dengan kelompok. Pada pembedahan usus mencit diambil, lalu sebagian usus dikerok untuk dilakukan analisa ELISA untuk pengukuran β -defensin dan sebagian usus dilakukan pemaparan infeksi *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri* dengan metode MLIL. Selanjutnya usus dimasukkan ke dalam media RPMI dan dilakukan *shaker*, lalu massa usus diukur pada menit ke 0, 15, dan 60. Data hasil pengukuran dicatat lalu dianalisis menggunakan SPSS.

4.9. Analisis Data

Data kadar β -defensin tiap kelompok perlakuan dianalisis secara statistik dengan menggunakan software SPSS untuk uji normalitas, homogenitas, dan *independent T-test*. Uji normalitas menggunakan metode *Kolmogorov-Smirnov*, data dinyatakan terdistribusi normal apabila nilai signifikansi $>0,05$. Uji normalitas digunakan untuk menginterpretasikan suatu data apakah data memiliki persebaran data yang normal atau tidak karena uji hipotesis tergantung pada normal atau tidaknya distribusi data. Apabila didapatkan sebaran data normal maka dilanjutkan sebagai uji parametrik. Namun apabila sebaran data tidak normal digunakan uji non parametrik.

Uji homogenitas menggunakan metode *Levene*, data dinyatakan homogen apabila nilai signifikansi $>0,05$. Uji homogenitas digunakan untuk menentukan apakah distribusi beberapa set data memiliki varians yang homogen. Apabila didapatkan data memiliki varians homogen maka analisis data dilanjutkan dengan uji ANOVA untuk variabel massa usus dan uji *independent T-test* untuk variabel β -defensin.

Selanjutnya dilakukan uji *independent T-test* antara kelompok kontrol dengan kelompok vaksin *vibrio* untuk mengetahui pengaruh vaksin terhadap kadar β -defensin menggunakan *Confidence Interval* sebesar 95%. Data dinyatakan signifikansi apabila $p < 0,05$.

Data massa usus tiap waktu (menit ke-0, ke-5, ke-15, ke-30, ke-45, dan ke-60) dilakukan uji normalitas dan homogenitas berturut-turut menggunakan metode *Kolmogorov-Smirnov* dan *Levene*. Bila nilai signifikansi $>0,05$ data dinyatakan homogen dan terdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji ANOVA,

data dinyatakan signifikan bila $p < 0,05$. Setelah dilakukan uji ANOVA, dilakukan

Multiple Comparison antar kelompok, yang dinyatakan signifikan bila $p < 0,05$,

untuk mengetahui perlakuan mana yang paling berpengaruh.

H1: Vaksinasi dengan molekul adhesi pada pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang dikonjugasikan CTB dapat meningkatkan kadar β -defensin mencit dan menghambat progresifitas keluarnya cairan (yang ditandai dengan menurunnya massa usus).



BAB V

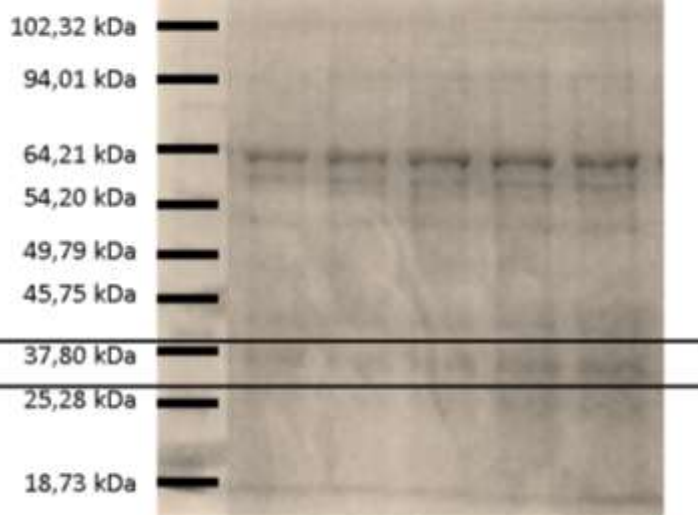
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1. Hasil penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek konjugasi molekul adhesi pili *Vibrio cholerae* BM 37,8 kDa yang dikonjugasikan dengan CTB terhadap peningkatan kadar β -defensin mukosa usus dan penurunan massa usus mencit balb/c yang diinfeksi oleh *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri*.

5.1.1. Hasil Identifikasi Pili *Vibrio cholerae* dengan Menggunakan SDS-

PAGE



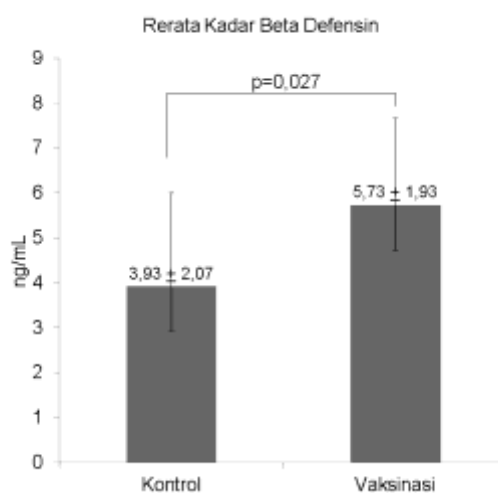
Gambar 5.1. Hasil SDS PAGE protein pili *Vibrio cholerae*. Terlihat pada gambar (kotak merah) protein pili dengan berat molekul 37,8 kDa (Dok. Pribadi)

Penelitian dimulai dengan mengkultur bakteri *Vibrio cholerae* pada medium TCBS. Selanjutnya bakteri dipanen dan pili dari bakteri diperoleh dengan menggunakan *pili cutter* lalu ditanam di media TCG untuk memperkaya

pili. Selanjutnya dilakukan identifikasi berat molekul protein dengan menggunakan SDS PAGE yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Dari hasil SDS PAGE didapatkan hasil sebagai berikut.

5.1.2. Hasil Pengukuran Kadar β -defensin pada Mukosa Usus Mencit

Setelah pemberian vaksinasi sebanyak empat kali, yaitu pada hari ke 7, 14, 21, dan 28 dilakukan pembedahan mencit untuk selanjutnya dilakukan pengukuran kadar β -defensin. Setelah dibedah, *scrapping* dari mukosa usus yang diperoleh dianalisa menggunakan ELISA di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Dari hasil pengukuran menggunakan ELISA diperoleh hasil sebagai berikut.



Gambar 5.2. Diagram kolom rerata kadar β -defensin pada kelompok kontrol dan kelompok yang divaksinasi. Analisis statistik menggunakan *independent T-test* didapatkan signifikansi $p < 0,05$.

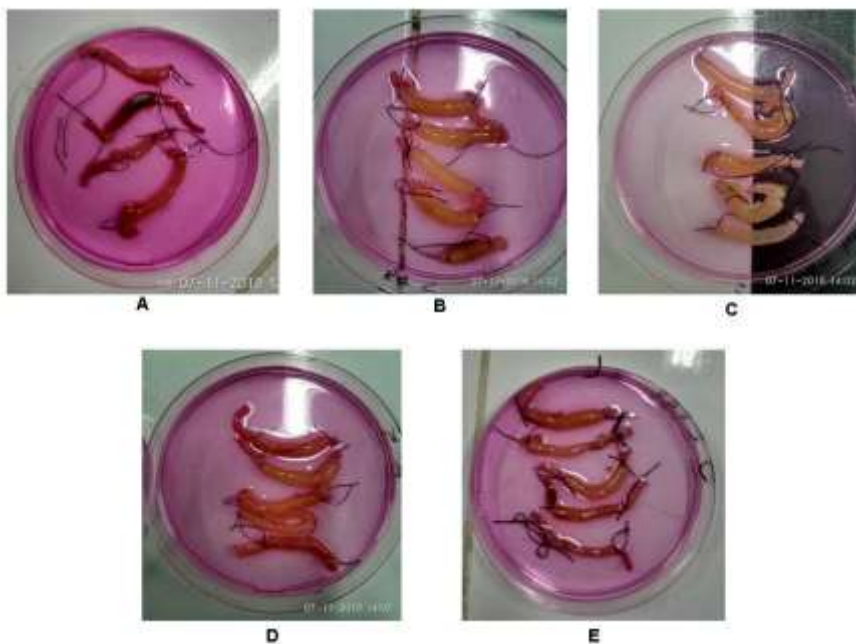
Hasil dari pengukuran kadar β -defensin didapatkan peningkatan pada kelompok yang divaksinasi oleh molekul adhesi pili BM 37,8kDa yang dikonjugasikan dengan CTB dibandingkan dengan kontrol. Dari hasil tersebut

rerata dari kadar β -defensin pada mencit kelompok kontrol adalah $3,92 \pm 2,07$ ng/mL dan kelompok vaksinasi pili 37,8 kDa yang dikonjugasi CTB memiliki rerata $5,73 \pm 1,92$ ng/mL. Dari hasil tersebut lalu dilakukan analisis statistik.

5.1.3. Hasil Pengukuran Berat Usus Mencit menggunakan Metode MLIL

Metode MLIL dilakukan sesuai penelitian dari Sumarno *et. al.* (2011).

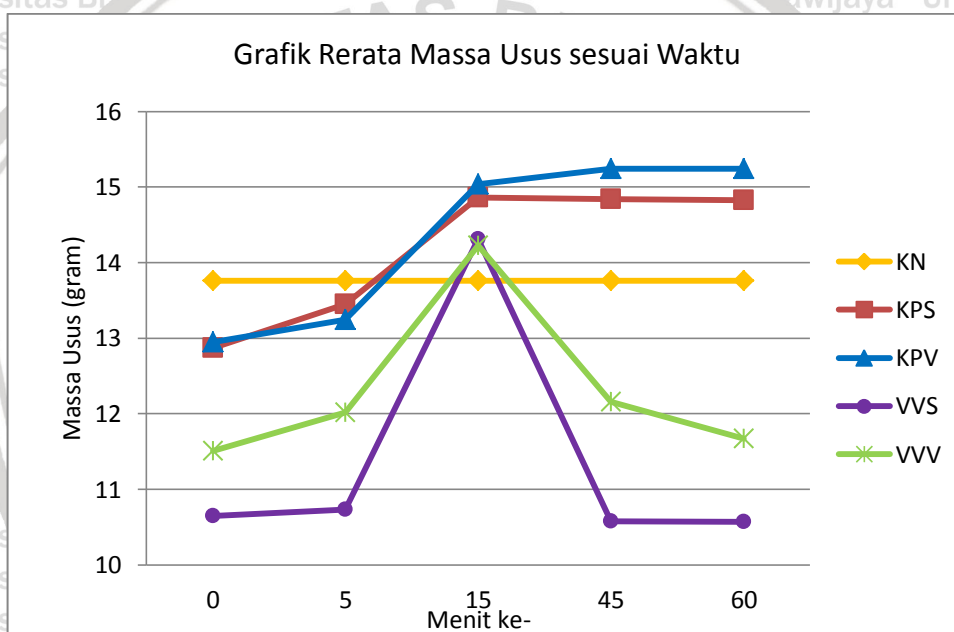
Usus yang telah diligasi lalu diinfeksi dengan *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri* dan selanjutnya diletakkan di media RPMI, di-shaker, lalu dilakukan pengukuran secara serial. Berikut ditampilkan hasil makroskopik dari metode MLIL, tabel rerata massa usus mencit, grafik rerata massa usus sesuai waktu, dan diagram kolom rerata massa usus beserta signifikansinya.



Gambar 5.3. Temuan makroskopik metode MLIL.A: Kontrol negatif (KN); B: Kontrol positif *Shigella flexneri* (KPS); C: Kontrol positif *Vibrio cholerae* (KPV); D: Vaksinasi *Vibrio cholerae* infeksi *Shigella flexneri* (VVS); E: Vaksinasi *Vibrio cholerae* infeksi *Vibrio cholerae* (VVV). Terlihat pada gambar bahwa usus kelompok kontrol positif (B dan C) lebih besar dibandingkan usus kelompok vaksinasi (D dan E).

Tabel 5.2. Tabel rerata massa usus mencit

Kelompok	Rata-rata Massa Usus (gram) Menit ke-		
	0	15	60
Kontrol Negatif (KN)	$13,76 \pm 1,27$	$13,76 \pm 1,27$	$13,76 \pm 1,27$
Kontrol Positif <i>Shigella</i> (KPS)	$12,87 \pm 0,37$	$14,86 \pm 0,91$	$14,83 \pm 0,92$
Kontrol Positif <i>Vibrio</i> (KPV)	$12,95 \pm 0,44$	$15,04 \pm 0,47$	$15,24 \pm 0,72$
Vaksinasi <i>Vibrio</i> Infeksi <i>Shigella</i> (VVS)	$10,65 \pm 0,55$	$14,31 \pm 0,76$	$10,57 \pm 0,53$
Vaksinasi <i>Vibrio</i> Infeksi <i>Vibrio</i> (VVV)	$11,51 \pm 0,58$	$14,23 \pm 0,50$	$11,67 \pm 1,10$

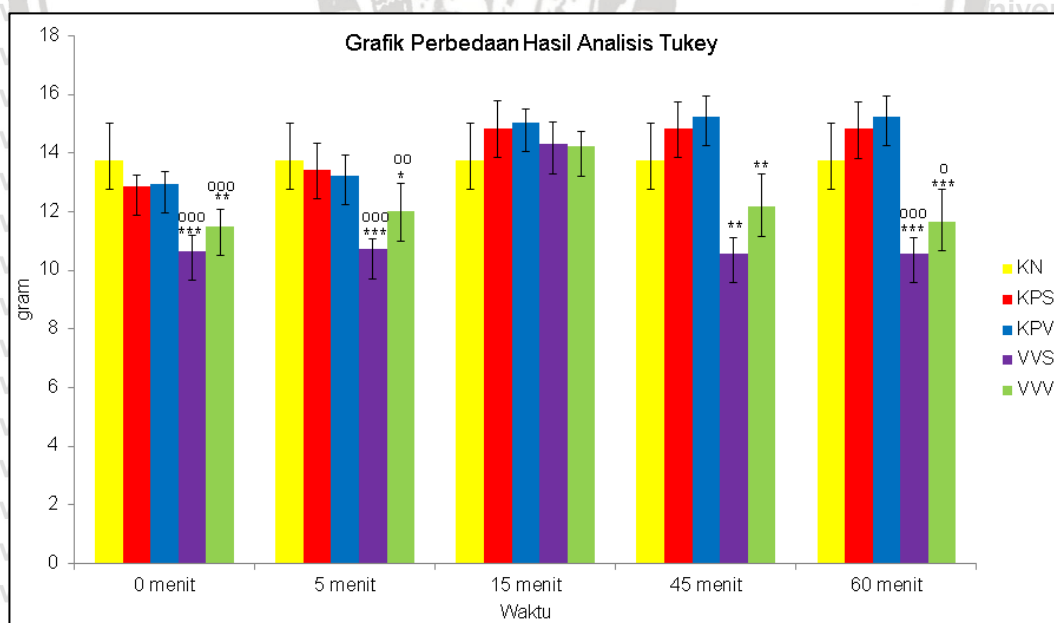


Gambar 5.4. Grafik rerata keseluruhan hasil penimbangan massa usus. Massa usus meningkat pada menit ke 15, lalu dari menit 15 turun hingga menit ke-60 pada kelompok yang divaksinasi.

Pada kelompok kontrol positif *shigella* (KPS) terdapat peningkatan massa usus di antara menit ke-0 hingga menit ke-15 yang memiliki rerata massa usus $12,87 \pm 0,37$ pada menit ke-0 menjadi $14,86 \pm 0,91$ pada menit ke-15. Pada kelompok kontrol positif *vibrio* (KPV) juga terdapat peningkatan massa usus di antara menit ke-0 hingga menit ke-15 yang memiliki rerata massa usus $12,95 \pm 0,44$ pada menit ke-0 menjadi $15,04 \pm 0,47$. Pada kelompok KPS dan KPV

massa usus dipertahankan hingga menit ke-60, yang memiliki rerata $14,83 \pm 0,92$ dan $15,24 \pm 0,72$ gram. Pada kelompok vaksinasi *vibrio* infeksi *shigella* (VVS), massa usus meningkat antara menit ke-0 hingga menit ke-15, yang memiliki rerata $10,65 \pm 0,55$ pada menit ke-0 menjadi $14,31 \pm 0,76$ gram pada menit ke-15 dan kemudian turun pada menit ke-60 dengan rerata $10,57 \pm 0,53$ gram. Hal yang sama juga terjadi pada kelompok vaksinasi *vibrio* infeksi *vibrio*, massa usus antara pada menit ke-0 (dengan massa usus $11,51 \pm 0,58$ gram) hingga menit ke-15 (dengan massa usus $14,23 \pm 0,50$ gram), kemudian turun pada menit ke-60 dengan rerata $11,67 \pm 1,10$ gram.

Di bawah ini ditampilkan grafik hasil analisis statistik *post hoc* Tukey rerata hasil pengukuran massa usus pada 5 kelompok lanjutan dari uji *one way* ANOVA. Deskripsi dari analisis statistik dijelaskan pada poin 5.2.



Gambar 5.5. Grafik perbedaan hasil analisis *Tukey*. Pada grafik terdapat 5 kelompok yaitu KN (kontrol negatif), KPS (kontrol positif *shigella*), KPV (kontrol positif *vibrio*), VVS (vaksinasi diinfeksi *shigella*), dan VVV (vaksinasi infeksi *vibrio*). Dinyatakan ⁰ bila $p < 0,05$; ⁰⁰ bila $p < 0,01$; ⁰⁰⁰ bila $p < 0,001$ vs. KN. Dinyatakan * bila $p < 0,05$; ** bila $p < 0,01$; *** bila $p < 0,001$ vs. kontrol positifnya.

5.2. Hasil Analisis Data

5.2.1. Hasil Analisis Data Kadar β -defensin

Untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal, dilakukan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Dari hasil uji tersebut didapatkan signifikansi (Sig.) $>0,05$

($p=0,184$) untuk semua kelompok yang berarti data terdistribusi normal.

Selanjutnya dilakukan uji homogenitas varians untuk mengetahui apakah data homogen. Dari uji tersebut diperoleh signifikansi (Sig.) $>0,05$ ($p=0,888$) pada

setiap kelompok yang berarti data homogen. Sehingga disimpulkan data terdistribusi normal dan homogen dan dapat dilakukan uji statistik selanjutnya,

yaitu *Independent T-test* karena terdiri dari dua kelompok. *Independent T-test*

dilakukan untuk mengetahui perbedaan kadar β -defensin pada kelompok kontrol

($n=15$) dan kelompok yang divaksiasi ($n=10$) molekul adhesi pili *Vibrio cholerae*

BM 37,8 kDa yang dikonjugasikan dengan CTB. Dari analisa statistik

Independent T-test diperoleh hasil signifikansi (Sig.) $<0,05$ ($p=0,03$) yang berarti

terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok yang

divaksinasi. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan vaksinasi berpengaruh

terhadap peningkatan kadar β -defensin.

5.2.2. Hasil Analisis Data Massa Usus

Data massa usus diperoleh dari 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol

negatif (KN), kelompok kontrol positif *Shigella* (KPS), kelompok kontrol positif

Vibrio (KPV), kelompok vaksinasi *Vibrio* yang diinfeksi *Shigella* (VVS), dan

kelompok vaksinasi *Vibrio* yang diinfeksi *Vibrio* (VVV). Dari data hasil penelitian,

peneliti melakukan analisis data pada menit ke-0, 15, dan 60 dengan

menggunakan uji statistik ANOVA. Syarat dilakukan uji statistik ANOVA adalah

data harus terdistribusi normal dan homogen. Untuk itu dilakukan uji Kolmogorov-Smirnov dan diperoleh hasil signifikansi (Sig.) $>0,05$ ($p=0,20$). Dari uji homogen varians diperoleh hasil signifikansi (Sig.) $>0,05$ ($p=0,240$ untuk menit ke-0, $p=0,406$ untuk menit ke-15, dan $p=0,803$ untuk menit ke-60) sehingga syarat terpenuhi. Dari hasil analisis menggunakan One-way ANOVA didapatkan signifikansi pada menit ke-0 adalah $p=0,000$, signifikansi pada menit ke-15 adalah $p=0,152$, dan pada menit ke-60 ($p=0,000$). Selanjutnya dilakukan uji post hoc Tukey HSD untuk mengetahui analisis tiap menit dan perbedaan antar kelompok perlakuan.

Dari hasil uji tersebut didapatkan hasil bahwa pada menit ke-0 terdapat massa usus kelompok vaksinasi yang diinfeksi *Shigella* (VVS) dan vaksinasi yang diinfeksi *Vibrio* (VVV) lebih rendah dibandingkan dengan kontrol negatif (KN) dengan nilai $p=0,000$ (untuk VVS) dan $p=0,000$ (untuk VVV). Massa usus pada VVS juga lebih rendah secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif *Shigella* (KPS) dengan nilai $p=0,000$. Selain itu, rendahnya massa usus pada VVV juga berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol positif *Vibrio* (KPV) dengan $p=0,005$.

Pada menit ke-5, massa usus pada kelompok VVS maupun VVV lebih rendah secara signifikan bila dibandingkan dengan KN dengan $p=0,000$ (untuk VVS) dan $p=0,006$ (untuk VVV). Massa usus yang lebih rendah pada kelompok VVS ini juga berbeda signifikan dengan KPS dengan $p=0,000$. Massa usus pada VVV juga lebih rendah secara signifikan dibandingkan kelompok KPV dengan $p=0,041$.

Pada menit ke-15 dari semua perlakuan yang dilakukan analisis statistik menggunakan Tukey tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna diantara semua kelompok dengan nilai $p > 0,05$.

Pada menit ke-45, massa usus kelompok VVS dan VVV lebih rendah dibandingkan KN namun tidak signifikan. Namun apabila VVS dibandingkan dengan kontrol positifnya, KPS, VVS lebih rendah signifikan dengan nilai $p = 0,001$. VVV apabila dibandingkan dengan KPV juga lebih rendah signifikan dengan $p = 0,003$.

Pada menit ke-60, massa usus pada kelompok VVS maupun VVV lebih rendah secara signifikan bila dibandingkan dengan KN dengan $p = 0,000$ (untuk VVS) dan $p = 0,016$ (untuk VVV). Rendahnya massa usus kelompok VVS ini juga berbeda secara signifikan dengan KPS dengan $p = 0,000$. Serupa dengan massa usus pada VVV yang juga lebih rendah secara signifikan dibandingkan kelompok KPV dengan $p = 0,000$.

Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan di setiap menit (menit ke-0, 5, 15, 45, dan 60) dilakukan uji *repeated* ANOVA. Uji *repeated* ANOVA dilakukan untuk melihat perbedaan antar kelompok pada data berpasangan yang berjumlah lebih dari dua dan memiliki distribusi data normal. Hasil perbandingan data rerata massa usus pada menit 0, 5, 15, 45, dan 60 menunjukkan nilai $p < 0,05$ dengan tingkat kepercayaan 95%. Dengan demikian, pemberian vaksinasi subunit pili 37,8 kDa *Vibrio cholerae* dapat menurunkan massa usus pada kelompok vaksinasi secara signifikan.

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1. Pemberian Vaksinasi Meningkatkan Kadar β -defensin

Pada penelitian ini, pemberian vaksinasi molekul adhesi pili *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang dikonjugasikan dengan CTB telah terbukti meningkatkan kadar β -defensin pada kelompok vaksinasi (dengan rerata 5,73ng/mL) terhadap dengan kontrol (dengan rerata 3,92ng/mL) secara signifikan ($p=0,03$).

Terdapat penelitian yang menyatakan bahwa *Vibrio* berhubungan dengan berbagai host yang menghasilkan peptida antimikroba/ *antimicrobial peptide* (AMP) oleh sel epitelnya sebagai *barrier* pelindung dari host tersebut dalam menghadapi infeksi mikroba (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2014). AMP adalah peptida kationik kecil dengan aktivitas antivirus, antibakteri, dan antijamur yang menunjukkan konformasi alfa heliks atau β -sheet (Kosikowska & Lesner, 2016). Molekul-molekul kecil ini memainkan peran penting dalam kerentanan terhadap beberapa penyakit menular salah satunya diare (Kosikowska & Lesner, 2016).

Salah satu dari AMP adalah defensin. Defensin merupakan molekul yang diproduksi selama infeksi natural akut dari *Vibrio cholerae* sebagai efektor respon imun *innate* (Borque *et al.*, 2018). Sesuai dengan penelitian ini, pemberian vaksinasi molekul adhesi *Vibrio cholerae* menghasilkan AMP secara dominan berupa β -defensin yang diproduksi selama infeksi tahap akut.

Peningkatan β -defensin yang disebabkan oleh molekul adhesi *Vibrio* pada penelitian ini serupa dengan penelitian oleh Fitriyaningsih *et al.* (2018).

Penelitian Fitrianingsih *et al.* (2018). menyatakan molekul adhesi *Shigella flexneri* dengan berat molekul 18 kDa yang mampu meningkatkan protein β -defensin mencit secara signifikan (Fitrianingsih *et al.*, 2018).

Bakteri yang dideteksi oleh sel tubuh akan memediasi pengikatan TLR dengan PAMP yang kemudian menginduksi produksi β -defensin. Produksi β -defensin selain diinduksi oleh produk metabolik bakteri yang salah satunya berupa peptidoglikan, juga dapat diinduksi oleh sitokin pro-inflamasi sebagai respon dari infeksi. Pada tempat terjadinya infeksi, bakteri dikenali oleh fagosit dan menginduksi sekresi mediator pro-inflamasi berupa IL-1 dan TNF-alfa. Selanjutnya β -defensin diproduksi oleh sel epitel untuk melakukan proses pembunuhan bakteri. β -defensin yang bermuatan positif berikatan dengan membran terluar sel mikroba yang mengandung peptidoglikan (lipid) bermuatan negatif, kemudian beta defensin akan membuat pori untuk merusak integritas membran mikroba sehingga membunuh mikroba tersebut (Cobo & Chadee, 2013). Peran β -defensin saat terjadi infeksi bakteri tidak hanya sebatas membunuh bakteri saja, namun juga sebagai imunomodulator. Telah dibuktikan bahwa peningkatan konsentrasi beta defensin dapat meningkatkan ekspresi sitokin pro-inflamasi dan kemokin dalam keadaan tidak infeksi atau tidak ada stimulasi oleh produk bakteri. Telah dibuktikan juga bahwa beta defensin adalah

komponen penting untuk memperluas respon sitokin awal dari inflamasi dan mempunyai peran dalam penyembuhan luka di tempat *injury* atau infeksi (Menendez & Brett Finlay, 2007). Dikarenakan respon imun berupa beta defensin tidak spesifik terhadap suatu antigen tertentu, maka beta defensin dapat mengatasi seluruh bakteri yang masuk ke enterosit. Salah satu parameter keberhasilan vaksinasi yakni mampu mencetuskan β -defensin sebagai respons

innate. Sehingga apabila didapatkan peningkatan kadar β -defensin maka vaksin yang diberikan dapat dikatakan memiliki immunogenisitas yang cukup baik..

Hal ini membuktikan bahwa vaksinasi oleh konjugasi antara molekul adhesi pili *Vibrio cholerae* BM 37,8 kDa dengan CTB meningkatkan respon imun mukosa berupa β -defensin sehingga nantinya apabila subjek terkena infeksi maka dengan cepat akan dieradikasi oleh β -defensin.

6.2. Pemberian Vaksinasi Menghambat Progresifitas Keluarnya Cairan ke Lumen Usus Mencit

Pada penelitian ini setelah dilakukan MLIL pada mencit, mencit dilakukan penimbangan massa usus pada serial waktu, yaitu menit ke-0, 15, dan 60 sembari diinkubasi pada media RPMI. Penimbangan secara serial pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya fluktuasi yang terjadi selama 60 menit masa inkubasi. Hasil pada penelitian ini, terlihat bahwa kelompok KPS dan KPV memiliki massa usus yang meningkat di antara menit ke-0 hingga menit ke-15. Setelah itu, di antara menit ke-15 hingga menit ke-60, massa usus pada kelompok KPS dan KPV tetap meningkat namun peningkatan terjadi secara lambat. Berbeda dengan kelompok yang diberikan vaksinasi, pada kelompok VVS dan VVV terdapat peningkatan massa usus yang dapat diamati di antara menit ke-0 hingga menit ke-15. Namun, di antara menit ke-15 hingga menit ke-60 massa usus menurun mendekati massa usus pada menit ke-0 secara signifikan dengan $p < 0,05$. Peningkatan massa usus pada menit ke-15 yang diikuti oleh penurunan massa usus hingga menit ke-60 pada kelompok vaksinasi (VVS dan VVV) kemungkinan bisa terjadi karena vaksinasi menghambat progresifitas keluarnya cairan pada kelompok vaksinasi yaitu VVS dan VVV dibandingkan

dengan kelompok kontrol positif yaitu KPS dan KPV. Apabila penelitian sebelumnya oleh Sumarno et. al. (2011) menunjukkan vaksinasi konjugasi molekul adhesi *Vibrio cholerae* dengan BM 37,8 kDa dengan CTB menghambat akumulasi cairan pada subjek yang diinfeksi dengan *Vibrio cholerae*, maka penelitian ini menunjukkan vaksin konjugasi tersebut menghambat progresifitas keluarnya cairan pada subjek yang diinfeksi oleh *Shigella flexneri*. Hal ini kemungkinan berhubungan dengan peningkatan protein β -defensin pada awal sebelum mencit diinfeksi. β -defensin yang meningkat akan dengan cepat mengatasi infeksi yang disebabkan oleh *Shigella flexneri* dengan merusak integritas membran dari *Shigella flexneri* (Grishin & Sokolov, 2014).

Pada penelitian ini, pemberian vaksinasi menunjukkan hasil rata-rata massa usus mencit yang divaksinasi (kelompok VVS dan VVV) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (KN) dan kontrol positif (KPS dan KPV) pada menit ke-0 yang signifikan secara statistik. Hal ini tidak diketahui mengapa pada mencit yang diberikan vaksinasi memiliki massa usus yang lebih rendah pada awal pengukuran massa usus mencit (menit ke-0). Hal tersebut merupakan keterbatasan dalam penelitian ini sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apa yang menyebabkan massa usus kelompok vaksinasi VVS dan VVV lebih rendah dibandingkan kelompok lainnya. Namun meskipun massa usus mencit kelompok VVS dan VVV lebih rendah dibandingkan dengan kelompok KN, KPS, dan KPV, tidak didapatkan kelainan atau penurunan berat badan serta tidak ada mencit yang mati pada kelompok VVS dan VVV.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Vaksin konjugasi molekul adhesi pili *Vibrio cholerae* berat molekul 37,8 kDa dengan CTB dapat meningkatkan respon imun mukosa *host* yang ditandai dengan meningkatnya β -defensin.
2. Vaksin konjugasi molekul adhesi pili *Vibrio cholerae* berat molekul 37,8 kDa dengan CTB dapat menghambat progresifitas keluarnya cairan ke lumen usus mencit yang diinfeksi *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri* yang ditandai dengan rendahnya massa usus.

Dari hasil tersebut terbukti bahwa konjugasi molekul adhesi pili *Vibrio cholerae* berat molekul 37,8 kDa dengan CTB dapat untuk dijadikan kandidat vaksin diare dengan menghambat progresifitas keluarnya cairan oleh karena infeksi *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri* dengan cara meningkatkan produksi β -defensin.

7.2. Saran

Saran pada penelitian ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menganalisa mengapa vaksinasi dapat menyebabkan massa usus lebih rendah pada kelompok vaksinasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, W., Fitri, L.E., Raras, T.Y.M., 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 Journal of Pharmacy (IOSRPHR)*, 2(5): 13–20.
- Akingbade, A. 2018. The Impact of Acidity on *Vibrio Cholerae* in Foodborne Environments. *Senior Projects Spring 2018*. Tersedia di https://digitalcommons.bard.edu/senproj_s2018/58 [Accessed 18 Desember 2019].
- Akter, A., Dash, P., Aktar, A., Jahan, S.R., Afrin, S., Basher, S.R., Hakim, A., Lisa, A.K., Chowdhury, F., Khan, A.I., Xu, P., Charles, R.C., Kelly, M., Kováč, P., Harris, J.B., Bhuiyan, T.R., Calderwood, S.B., Ryan, E.T. & Qadri, F. 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).
- Ashkenazi, S. & Cohen, D. 2013. An update on vaccines against *Shigella*. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 1(3): 113–123.
- Ashkenazi, S., Schwartz, E. & O’Ryan, M. 2016. Travelers’ Diarrhea in Children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 35(6): 698–700. Tersedia di <http://insights.ovid.com/crossref?an=00006454-201606000-00022> [Accessed 14 Januari 2020].
- Baldauf, K.J., Royal, J.M., Hamorsky, K.T. & Matoba, N. 2015. *Cholera toxin B: One subunit with many pharmaceutical applications*. *Toxins*, .
- Baptista, A.A.S., Donato, T.C., Garcia, K.C.O.D., Gonçalves, G.A.M., Coppola, M.P., Okamoto, A.S., Sequeira, J.L. & Andreatti Filho, R.L. 2014. Immune response of broiler chickens immunized orally with the recombinant proteins flagellin and the subunit B of cholera toxin associated with *Lactobacillus* spp. *Poultry Science*, 93(1): 39–45.
- Barry, E.M., Pasetti, M.F., Sztein, M.B., Fasano, A., Kotloff, K.L. & Levine, M.M. 2013. *Progress and pitfalls in Shigella vaccine research*. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, .
- Basu, S. & Pickett, M.J. 1969. Reaction of *Vibrio cholerae* and Choleraogenic Toxin in Ileal Loop of Laboratory Animals. *Journal of Bacteriology*, 100(2): 1142–1143.
- Bhowmick, R., Pore, D. & Chakrabarti, M.K. 2014. Outer membrane protein a (OmpA) of *shigella flexneri* 2a induces TLR2-mediated activation of b cells: Involvement of protein tyrosine kinase, ERK and nf-b. *PLoS ONE*, 9(10).
- Blanchard, T.G., Lycke, N., Czinn, S.J. & Nedrud, J.G. 1998. Recombinant cholera toxin B subunit is not an effective mucosal adjuvant for oral immunization of mice against *Helicobacter felis*. *Immunology*, 94(1): 22–27.

Bornside, G.H. 1981. Jaime Ferran and preventive inoculation against cholera. *Bulletin of the history of medicine*, 55(4): 516–32. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7039738> [Accessed 11 Desember 2019].

Bourque, D.L., Bhuiyan, R., Genereux, D.P., Rashu, R., Ellis, C.N., Chowdhury, F., Khan, A.I., Alam, H., Paul, A., Hossain, L. & Mayo-smith, L.M. 2018. Analysis of the Human Mucosal Response to Cholera Reveals Sustained Activation of Innate Immune Signaling Pathways. *American Society for Microbiology*, 86(2): 1–17.

Boustanshenas, M., Bakhshi, B. & Ghorbani, M. 2013. Investigation into immunological responses against a native recombinant CTB whole-cell *Vibrio cholerae* vaccine in a rabbit model. *Journal of Applied Microbiology*, 114(2): 509–515.

Camacho, A.I., Souza-Rebouças, J., Irache, J.M. & Gamazo, C. 2013. Towards a non-living vaccine against *Shigella flexneri*: From the inactivation procedure to protection studies. *Methods*, 60(3): 264–268.

Capeding, M.R.Z., Gonzales, M.L.A.M., Dhingra, M.S., D'Cor, N.A., Midde, V.J., Patnaik, B.N., Thollot, Y. & Desauziers, E. 2017. Safety and immunogenicity of the killed bivalent (O1 and O139) whole-cell cholera vaccine in the Philippines. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 13(10): 2232–2239.

CDC 2013. Notes from the field: Outbreak of infections caused by *Shigella sonnei* with decreased susceptibility to azithromycin--Los Angeles, California, 2012. *Morbidity and mortality weekly report*, 62(9): 171. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23466436> [Accessed 12 Desember 2019].

CDC 2019a. *Diagnosis and Detection Cholera*. Tersedia di <https://www.cdc.gov/cholera/diagnosis.html> [Accessed 10 Desember 2019].

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

Clemens, J.D., Desai, S.N., Qadri, F., Nair, G. & Holmgren, J. 2018. Cholera Vaccines. *Plotkin's Vaccines*. Elsevier, hal.185-197.e5. Tersedia di <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323357616000146> [Accessed 11 Desember 2019].

Cobo, E.R. & Chadee, K. 2013. Antimicrobial Human β -Defensins in the Colon and Their Role in Infectious and Non-Infectious Diseases. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 2(1): 177–92. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25436887> [Accessed 22 Oktober 2019].

Couch, R.B. 2004. *Nasal Vaccination, Escherichia coli Enterotoxin, and Bell's Palsy*. *New England Journal of Medicine*, .



De, S.N. 1959. Enterotoxicity of bacteria-free culture-filtrate of vibrio cholerae. *Nature*, 183(4674): 1533–1534.

Destoumieux-Garzón, D., Duperthuy, M., Vanhove, A.S., Schmitt, P. & Wai, S.N. 2014. *Resistance to antimicrobial peptides in vibrios*. *Antibiotics*, .

Dommett, R., Zilbauer, M., George, J.T. & Bajaj-Elliott, M. 2005. Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. *Molecular Immunology*, 42(8): 903–912.

Doss, M., White, M.R., Tecle, T. & Hartshorn, K.L. 2010. Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *Journal of leukocyte biology*, 87(1): 79–92. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19808939> [Accessed 7 November 2019].

Dowling, J.M. & Yap, C.-F. 2014. *Communicable Diseases in Developing Countries*. *Communicable Diseases in Developing Countries*. Palgrave Macmillan UK.

Drancourt, M. 2017. Acute Diarrhea. *Infectious Diseases*. Elsevier, hal.335–340.e2. Tersedia di <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702062858000381> [Accessed 22 Oktober 2019].

Duncan, C.L., Sugiyama, H. & H., S.D. 1968. Rabbit ileal loop response to strains of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol*, 95: 1560–1566.

Epstein, F.H., Field, M., Rao, M.C. & Chang, E.B. 1989. Intestinal Electrolyte Transport and Diarrheal Disease. *New England Journal of Medicine*, 321(12): 800–806. Tersedia di <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198909213211206> [Accessed 20 Oktober 2019].

Fahlgren, A., Hammarström, S., Danielsson, A. & Hammarström, M.-L. 2003. Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis. *Clinical and experimental immunology*, 131(1): 90–101. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12519391> [Accessed 7 November 2019].

Fitrianingsih, A.A., Rachma, L.N. & Milliana, A. 2018. *PROTEIN ADHESI SUB UNIT PILI Shigella flexneri 18 kDa MENINGKATKAN EKSPRESI PROTEIN ANTIMIKROBA BETA DEFENSIN PADA MENCIT (STRATEGI PENGEMBANGAN VAKSIN SHIGELLOSIS BERBASIS PROTEIN ADHESI)*. *Journal of Islamic Medicine*, .

Fitrianingsih, A.A., Rachma, L.N., Milliana, A., Hernowati, T.E., Santoso, S. & Prawiro, S.R. 2017. Cross Reaction among Antibody Pili subunit Hemagglutinin Proteins and Outer Membrane subunit Hemagglutinin Proteins of *Shigella flexneri*. *THE JOURNAL OF TROPICAL LIFE SCIENCE*, 7(1): 1–7.

García, J.R., Krause, A., Schulz, S., Rodríguez-Jiménez, F.J., Klüver, E.,

Adermann, K., Forssmann, U., Frimpong-Boateng, A., Bals, R. & Forssmann, W.G. 2001. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(10): 1819–21. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11481241> [Accessed 7 November 2019].

De Geus, E.D., Van Haarlem, D.A., Poetri, O.N., De Wit, J.J.S. & Vervelde, L. 2011. A lack of antibody formation against inactivated influenza virus after aerosol vaccination in presence or absence of adjuvantia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143(1–2): 143–147.

Giesemann, T., Guttenberg, G. & Aktories, K. 2008. Human α -Defensins Inhibit *Clostridium difficile* Toxin B. *Gastroenterology*, 134(7): 2049–2058.

Gill, D.M. 1976. The Arrangement of Subunits in Chlorea Toxin. *Biochemistry*, 15(6): 1242–1248.

Grishin, D. V. & Sokolov, N.N. 2014. Defensins are natural peptide antibiotics of higher eukaryotes. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 8(1): 11–18. Tersedia di <http://link.springer.com/10.1134/S1990750814010077> [Accessed 22 Oktober 2019].

Guerrant, R.L., Van Gilder, T., Steiner, T.S., Thielman, N.M., Slutsker, L., Tauxe, R. V., Hennessy, T., Griffin, P.M., DuPont, H., Bradley Sack, R., Tarr, P., Neill, M., Nachamkin, I., Reller, L.B., Osterholm, M.T., Bennish, M.L. & Pickering, L.K. 2001. Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*, 32(3): 331–351.

Guo, L., Liu, K., Xu, G., Li, X., Tu, J., Tang, F., Xing, Y. & Xi, T. 2012. Prophylactic and therapeutic efficacy of the epitope vaccine CTB-UA against *Helicobacter pylori* infection in a BALB/c mice model. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(6): 1437–1444.

Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schröder, J.M. 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387(6636): 861. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202117> [Accessed 7 November 2019].

Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L.M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S. & Schröder, J.M. 2000. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL-1 β , but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 22(6): 714–21. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837369> [Accessed 7 November 2019].

Harris, J.B. 2018. Cholera : Immunity and Prospects in Vaccine Development. *The Journal of Infectious Diseases*, 218(Suppl 3): 141–146.



Harris, J.B., LaRocque, R.C., Qadri, F., Ryan, E.T. & Calderwood, S.B. 2012. Cholera. *The Lancet*. Lancet Publishing Group, hal.2466–2476.

Hauschild, A.H.W., Nillo, L. & Dorward, W.J. 1967. Experimental enteritis with food poisoning and classical strains of *Clostridium perfringens* type A in lambs. *J. Infect. Dis.*, 117: 379–386.

Hauschild, A.H.W., Nillo, L. & Dorward, W.J. 1968. *Clostridium perfringens* type A infection of ligated intestinal loops in lambs. *Appl. Microbiol*, 16: 1235–1239.

Herwana, E., Surjawidjaja, J.E., Salim, O.C., Indriani, N., Bukitwetan, P. & Lesmana, M. 2010. Shigella-associated diarrhea in children in South Jakarta, Indonesia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 41(2): 418–425.

Holmgren, J., Czerkinsky, C., Lycke, N. & Svennerholm, A.M. 1994. Strategies for the induction of immune responses at mucosal surfaces making use of cholera toxin B subunit as immunogen, carrier, and adjuvant. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 50(5 Suppl): 42–54. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8203723> [Accessed 12 Desember 2019].

Hosangadi, D., Smith, P.G., Kaslow, D.C., Giersing, B.K. & WHO ETEC & Shigella Vaccine Consultation Expert Group 2018. WHO consultation on ETEC and Shigella burden of disease, Geneva, 6-7th April 2017: Meeting report. *Vaccine*. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29352598> [Accessed 22 Oktober 2019].

ICHRC 2016. Diare. *Hospital Care for Children*, (Anak dengan Diare).

Janicot, M., Fouque, F. & Desbuquois, B. 1991. Activation of rat liver adenylate cyclase by cholera toxin requires toxin internalization and processing in endosomes. *The Journal of biological chemistry*, 266(20): 12858–65. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2071575> [Accessed 20 Oktober 2019].

Jann, K., Goldemann, G., Weisgerber, C., Wolf-Ullisch, C. & Kanegasaki, S. 1982. Biosynthesis of the O9 Antigen of *Escherichia coli* Initial Reaction and Overall Mechanism. *European Journal of Biochemistry*, 127(1): 157–164.

Kanungo, S., Paisley, A., Lopez, A.L., Bhattacharya, M., Manna, B., Kim, D.R., Han, S.H., Attridge, S., Carbis, R., Rao, R., Holmgren, J., Clemens, J.D. & Sur, D. 2009. Immune responses following one and two doses of the reformulated, bivalent, killed, whole-cell, oral cholera vaccine among adults and children in Kolkata, India: A randomized, placebo-controlled trial. *Vaccine*, 27(49): 6887–6893.

Khoirul, A., Nurdiana, Tinny Endang, H., Suyuti, H. & Sumarno 2016. Cross Immunity among the 49 .8 KDa Pili Subunit Hemagglutinin Proteins and 7.9 KDa Pili Subunit Anti Hemagglutinin Proteins of *Shigella* spp. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research*, 7(2): 19–30.

Kim, C., Gajendran, N., Mittrücker, H.W., Weiwad, M., Song, Y.H., Hurwitz, R.,

- Wilmanns, M., Fischer, G. & Kaufmann, S.H.E. 2005. Human α -defensins neutralize anthrax lethal toxin and protect against its fatal consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(13): 4830–4835.
- Kim, C., Slavinskaya, Z., Merrill, A.R. & Kaufmann, S.H.E. 2006. Human α -defensins neutralize toxins of the mono-ADP- ribosyltransferase family. *Biochemical Journal*, 399(2): 225–229.
- Kim, M.J., Moon, Y., Kim, H., Rho, S., Shin, Y.K., Song, M., Walker, R., Czerkinsky, C., Kim, D.W. & Kim, J.-O. 2018. Cross-Protective Shigella Whole-Cell Vaccine With a Truncated O-Polysaccharide Chain. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Kosikowska, P. & Lesner, A. 2016. *Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015)*. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, .
- Kotloff, K.L., Simon, J.K., Pasetti, M.F., Sztein, M.B., Wooden, S.L., Livio, S., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Barry, E.M., Picking, W. & Levine, M.M. 2007. Safety and immunogenicity of CVD 1208S, a live, oral Δ guaBA Δ sen Δ set Shigella flexneri 2a vaccine grown on animal-free media. *Human Vaccines*, 3(6): 268–275.
- Kubota, E., Joh, T., Tanida, S., Sasaki, M., Kataoka, H., Watanabe, K., Itoh, K., Oshima, T., Ogasawara, N., Togawa, S., Wada, T., Yamada, T., Mori, Y., Fujita, F., Shimura, T., Ohara, H., Isaka, M., Yasudat, Y. & Itoh, M. 2005. Oral vaccination against Helicobacter pylori with recombinant cholera toxin B-subunit. *Helicobacter*, 10(4): 345–352.
- Lanata, C.F., Fischer-Walker, C.L., Olascoaga, A.C., Torres, C.X., Aryee, M.J. & Black, R.E. 2013. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review. *PLoS ONE*, 8(9).
- Lange, S. & Holmgren, J. 1978. Protective antitoxic cholera immunity in mice: Influence of route and number of immunizations and mode of action of protective antibodies. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica - Section C Immunology*, 86(4): 145–152.
- Lehrer, R.I., Jung, G., Ruchala, P., Wang, W., Micewicz, E.D., Waring, A.J., Gillespie, E.J., Bradley, K.A., Ratner, A.J., Rest, R.F. & Lu, W. 2009. Human α -defensins inhibit hemolysis mediated by cholesterol-dependent cytolysins. *Infection and Immunity*, 77(9): 4028–4040.
- Leung, D.T., Chowdhury, F., Calderwood, S.B., Qadri, F. & Ryan, E.T. 2012. *Immune responses to cholera in children*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, .
- Levine, M.M., Kaper, J.B., Black, R.E. & Clements, M.L. 1983. *New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development*. *Microbiological Reviews*, .
- Levine, M.M., Kaper, J.B., Herrington, D., Ketley, J., Losonsky, G., Tacket, C.O.,

Tall, B. & Cryz, S. 1988. Safety, immunogenicity, and efficacy of recombinant live oral cholera vaccines, CVD 103 and CVD 103-HgR. *Lancet* (London, England), 2(8609): 467–70. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2900401> [Accessed 12 Desember 2019].

Levine, M.M., Kotloff, K.L., Barry, E.M., Pasetti, M.F. & Sztein, M.B. 2007. *Clinical trials of Shigella vaccines: Two steps forward and one step back on a long, hard road*. *Nature Reviews Microbiology*.

Liu, J., Platts-Mills, J.A., Juma, J., Kabir, F., Nkeze, J., Okoi, C., Operario, D.J., Uddin, J., Ahmed, S., Alonso, P.L., Antonio, M., Becker, S.M., Blackwelder, W.C., Breiman, R.F., Faruque, A.S.G., Fields, B., Gratz, J., Haque, R., Hossain, A., Hossain, M.J., Jarju, S., Qamar, F., Iqbal, N.T., Kwambana, B., Mandomando, I., McMurry, T.L., Ochieng, C., Ochieng, J.B., Ochieng, M., Onyango, C., Panchalingam, S., Kalam, A., Aziz, F., Qureshi, S., Ramamurthy, T., Roberts, J.H., Saha, D., Sow, S.O., Stroup, S.E., Sur, D., Tamboura, B., Taniuchi, M., Tennant, S.M., Toema, D., Wu, Y., Zaidi, A., Nataro, J.P., Kotloff, K.L., Levine, M.M. & Houpt, E.R. 2016. Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study. *The Lancet*, 388(10051): 1291–1301.

Livio, S., Strockbine, N.A., Panchalingam, S., Tennant, S.M., Barry, E.M., Marohn, M.E., Antonio, M., Hossain, A., Mandomando, I., Ochieng, J.B., Oundo, J.O., Qureshi, S., Ramamurthy, T., Tamboura, B., Adegbola, R.A., Hossain, M.J., Saha, D., Sen, S., Faruque, A.S.G., Alonso, P.L., Breiman, R.F., Zaidi, A.K.M., Sur, D., Sow, S.O., Berkeley, L.Y., O'Reilly, C.E., Mintz, E.D., Biswas, K., Cohen, D., Farag, T.H., Nasrin, D., Wu, Y., Blackwelder, W.C., Kotloff, K.L., Nataro, J.P. & Levine, M.M. 2014. Shigella isolates from the global enteric multicenter study inform vaccine development. *Clinical Infectious Diseases*, 59(7): 933–941.

Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S. & Shibuya, K. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380(9859): 2095–2128.

Mani, S., Wierzbza, T. & Walker, R.I. 2016. Status of vaccine research and development for Shigella. *Vaccine*, 34(26): 2887–2894. Tersedia di <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X16002863> [Accessed 3 Mei 2017].

Marcdante, K.J., Kliegman, R.M., Jenson, H.B. & Behrman, R.E. 2014. *Ilmu Kesehatan Anak Esensial Edisi Keenam*. Jakarta: IDAI.

Mastroianni, J.R. & Ouellette, A.J. 2009. Alpha-defensins in enteric innate immunity: functional Paneth cell alpha-defensins in mouse colonic lumen. *The Journal of biological chemistry*, 284(41): 27848–56. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19687006> [Accessed 7 November 2019].



Mel, D., Gangarosa, E.J., Radovanovic, M.L., Arsic, B.L. & Litvinjenko, S. 1971. Studies on vaccination against bacillary dysentery. 6. Protection of children by oral immunization with streptomycin-dependent *Shigella* strains. *Bulletin of the World Health Organization*, 45(4): 457–464.

Mel, D.M., Arsic, B.L., Radovanovic, M.L. & Litvinjenko, S.A. 1974. Live oral *Shigella* vaccine: vaccination schedule and the effect of booster dose. *Acta microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 21(1–2): 109–14.

Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4613128> [Accessed 12 Desember 2019].

Menendez, A. & Brett Finlay, B. 2007. *Defensins in the immunology of bacterial infections*. *Current Opinion in Immunology*, .

Millet, Y.A., Alvarez, D., Ringgaard, S., von Andrian, U.H., Davis, B.M. & Waldor, M.K. 2014. Insights into *Vibrio cholerae* Intestinal Colonization from Monitoring Fluorescently Labeled Bacteria. *PLoS Pathogens*, 10(10).

Milliana, A., Noorhamdani, A.S., Poeranto, S., Handono, K., Ainur, A. & Rachma, L.N. 2017. Antibodies against *Shigella flexneri* adhesion molecule outer membrane protein (OMP) can cross-react with OMPs of some *Shigella* species. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(2): 255–261.

Moore, S., Thomson, N., Mutreja, A. & Piarroux, R. 2014. *Widespread epidemic cholera caused by a restricted subset of Vibrio cholerae clones*. *Clinical Microbiology and Infection*, .

Morona, R., Daniels, C. & Van Den Bosch, L. 2003. *Genetic modulation of Shigella flexneri 2a lipopolysaccharide O antigen modal chain length reveals that it has been optimized for virulence*. *Microbiology*, .

Mutsch, M., Zhou, W., Rhodes, P., Bopp, M., Chen, R.T., Linder, T., Spyr, C. & Steffen, R. 2004. Use of the Inactivated Intranasal Influenza Vaccine and the Risk of Bell's Palsy in Switzerland. *New England Journal of Medicine*, 350(9): 896–903.

Naghavi, M., Wang, H., Lozano, R., Davis, A., Liang, X., Zhou, M. & Vollset, S.E. 2015. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 385(9963): 117–171.

Navaneethan, U. & Giannella, R.A. 2010. Definition, Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Classification, and Differential Diagnosis of Diarrhea. *Diarrhea*. Humana Press, hal.1–31.

Navaneethan, U. & Giannella, R.A. 2014. *Diarrhea: Diagnostic and Therapeutic Advances*. Tersedia di <http://www.springer.com/series/7672> [Accessed 10 Desember 2019].

Nguyen, T.L.A., Vieira-Silva, S., Liston, A. & Raes, J. 2015. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *DMM Disease Models and Mechanisms*, 8(1): 1–16.

Nguyen, Y.N., Shull, L.M. & Camilli, A. 2017. *Identification and characterization of population heterogeneity of Vibrio cholerae in vivo*. *The FASEB Journal*, Federation of American Societies for Experimental Biology. Tersedia di http://www.fasebj.org/content/31/1_Supplement/lb201.short [Accessed 3 Mei 2017].

O'Neil, D.A., Porter, E.M., Elewaut, D., Anderson, G.M., Eckmann, L., Ganz, T. & Kagnoff, M.F. 1999. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(12): 6718–24. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10586069> [Accessed 7 November 2019].

Orata, F.D., Keim, P.S. & Boucher, Y. 2014. The 2010 Cholera Outbreak in Haiti: How Science Solved a Controversy. *PLoS Pathogens*, 10(4).

Ouyang-Latimer, J., Jafri, S., VanTassel, A., Jiang, Z.D., Gurleen, K., Rodriguez, S., Nandy, R.K., Ramamurthy, T., Chatterjee, S., McKenzie, R., Steffen, R. & DuPont, H.L. 2011. In vitro antimicrobial susceptibility of bacterial enteropathogens isolated from international travelers to Mexico, Guatemala, and India from 2006 to 2008. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(2): 874–878.

Oyofe, B.A., Lesmana, M., Subekti, D., Tjaniadi, P., Larasati, W., Putri, M., Simanjuntak, C.H., Punjabi, N.H., Santoso, W., Muzahar, Sukarma, Sriwati, Sarumpaet, S., Abdi, M., Tjindi, R., Ma'ani, H., Sumardiati, A., Handayani, H., Campbell, J.R., Alexander, W.K., Beecham, H.J. & Corwin, A.L. 2002. Surveillance of bacterial pathogens of diarrhea disease in Indonesia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 44(3): 227–234. Tersedia di <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889302004546> [Accessed 3 Mei 2017].

Pazgier, M., Hoover, D.M., Yang, D., Lu, W. & Lubkowski, J. 2006. Human beta-defensins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 63(11): 1294–313. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16710608> [Accessed 7 November 2019].

Penrose, K., De Castro, M.C., Werema, J. & Ryan, E.T. 2010. Informal urban settlements and cholera risk in Dar es Salaam, Tanzania. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(3).

Perez-Lopez, A., Behnsen, J., Nuccio, S.P. & Raffatellu, M. 2016. Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. *Nature Reviews Immunology*, 16(3): 135–148. Tersedia di <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2015.17>.

Piarroux, R. & Faucher, B. 2012. *Cholera epidemics in 2010: Respective roles of environment, strain changes, and human-driven dissemination*. *Clinical Microbiology and Infection*, .

Pore, D. & Chakrabarti, M.K. 2013. *Outer membrane protein A (OmpA) from Shigella flexneri 2a: A promising subunit vaccine candidate*. *Vaccine*, .

Pore, D. & Chakrabarti, M.K. 2016. An approach to identify and characterize a subunit candidate Shigella vaccine antigen. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., hal.433–444.

Pore, D., Chowdhury, P., Mahata, N., Pal, A., Yamasaki, S., Mahalanabis, D. & Chakrabarti, M.K. 2009. Purification and characterization of an immunogenic outer membrane protein of Shigella flexneri 2a. *Vaccine*, 27(42): 5855–5864.

Pore, D., Mahata, N. & Chakrabarti, M.K. 2012. Outer membrane protein A (OmpA) of Shigella flexneri 2a links innate and adaptive immunity in a TLR2-dependent manner and involvement of IL-12 and nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 287(15): 12589–12601.

Pore, D., Mahata, N., Pal, A. & Chakrabarti, M.K. 2010. 34kDa MOMP of Shigella flexneri promotes TLR2 mediated macrophage activation with the engagement of NF- κ B and p38 MAP kinase signaling. *Molecular Immunology*, 47(9): 1739–1746.

Pore, D., Mahata, N., Pal, A. & Chakrabarti, M.K. 2011. Outer Membrane Protein A (OmpA) of Shigella flexneri 2a, Induces Protective Immune Response in a Mouse Model. *PLoS ONE*, 6(7): e22663. Tersedia di <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0022663> [Accessed 7 November 2019].

Preedy, V.R. 2016. *Adhesion molecules*. Adhesion Molecules. CRC Press.

Puspandari, N., Puspandari, N., Sariadji, K. & Wati, M. 2010. IDENTIFIKASI PENYEBAB KEJADIAN LUAR BIASA KOLERA DI PAPUA TERKAIT KONTAK JENAZAH DAN SANITASI. *Widyariset*, 13(2): 69–74. Tersedia di <http://widyariset.pusbindiklat.lipi.go.id/index.php/widyariset/article/view/175> [Accessed 8 Desember 2019].

Qadri, F., Ali, M., Lynch, J., Chowdhury, F., Khan, A.I., Wierzbza, T.F., Excler, J.L., Saha, A., Islam, M.T., Begum, Y.A., Bhuiyan, T.R., Khanam, F., Chowdhury, M.I., Khan, I.A., Kabir, A., Riaz, B.K., Akter, A., Khan, A., Asaduzzaman, M., Kim, D.R., Siddik, A.U., Saha, N.C., Cravioto, A., Singh, A.P. & Clemens, J.D. 2018. Efficacy of a single-dose regimen of inactivated whole-cell oral cholera vaccine: results from 2 years of follow-up of a randomised trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(6): 666–674.

Rabbi, F., Sultana, N., Rahman, T., Al-Emran, H.M., Uddin, M.N., Hossain, M., Anwar, K.S., Yasmin, M., Nessa, J. & 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): 393–6. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18954564> [Accessed 22 Oktober 2019].

Ramasundara, M., Leach, S.T., Lemberg, D.A. & Day, A.S. 2009. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 24(2): 202–8. Tersedia di



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19215333> [Accessed 7 November 2019].

Rath, B., Linder, T., Cornblath, D., Hudson, M., Fernandopulle, R., Hartmann, K., Heininger, U., Izurieta, H., Killion, L., Kokotis, P., Oleske, J., Vajdy, M. & Wong, V. 2007. *"All that palsies is not Bell's [1]"-The need to define Bell's palsy as an adverse event following immunization.* Vaccine, .

Ren, G., Roberts, A.I. & Shi, Y. 2011. Adhesion molecules. *Cell Adhesion & Migration*, 5(1): 20–22. Tersedia di <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cam.5.1.13491> [Accessed 23 Desember 2019].

Riedel, S., Hobden, J.A., Miller, S., Morse, S.A., Mietzner, T., Detrick, B., Mitchell, T.G., Sakanari, J.A., Hotez, P. & Mejia, R. 2019. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. 28th editi ed. McGraw-Hill Education.

Rikesdas 2018. *HASIL UTAMA RISKESDAS 2018*.

Rubio, C.A. & Befrits, R. 2009. Increased lysozyme expression in gastric biopsies with intestinal metaplasia and pseudopyloric metaplasia. *International journal of clinical and experimental medicine*, 2(3): 248–53. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19918317> [Accessed 7 November 2019].

Ryan, E.T. & Calderwood, S.B. 2000. Cholera vaccines. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 31(2): 561–5. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10987721> [Accessed 20 Oktober 2019].

Ryan, K.J. (Kenneth J., Ray, C.G. & Sherris, J.C. 2004. *Sherris medical microbiology : an introduction to infectious diseases*. McGraw-Hill.

Ryan, K.J. & Ray, C.G. 2003. *Sherris Medical Microbiology*. McGraw Hill Professional. Tersedia di http://books.google.co.in/books/about/Sherris_Medical_Microbiology.html?id=mcjQ96KsQ_EC&pgis=1 [Accessed 9 Desember 2019].

Sack, D.A., Sack, R.B., Nair, G.B. & Siddique, A. 2004. Cholera (The Lancet). *The Lancet*, 363(9404): 223–233. Tersedia di <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673603153287> [Accessed 20 Oktober 2019].

Salzman, N.H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjöberg, J., Amir, E., Teggatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., Stoel, M., Zhou, Y., Sodergren, E., Weinstock, G.M., Bevins, C.L., Williams, C.B. & Bos, N.A. 2010. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nature Immunology*, 11(1): 76–83.

Salzman, N.H., Underwood, M.A. & Bevins, C.L. 2007. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Seminars in immunology*, 19(2): 70–83. Tersedia di

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17485224> [Accessed 7 November 2019].

Sanchez, J. & Holmgren, J. 1989. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(2): 481–485.

Sánchez, J. & Holmgren, J. 2008. *Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. Cellular and Molecular Life Sciences*, .

Sansonetti, P.J. 2001. *Shigellosis: From symptoms to molecular pathogenesis. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, .

Sawasvirojwong, S., Srimanote, P., Chatsudthipong, V. & Muanprasat, C. 2013. An Adult Mouse Model of *Vibrio cholerae*-induced Diarrhea for Studying Pathogenesis and Potential Therapy of Cholera. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(6).

Von Seidlein, L., Deok, R.K., Ali, M., Lee, H., Wang, X.Y., Vu, D.T., Do, G.C., Chaicumpa, W., Agtini, M.D., Hossain, A., Bhutta, Z.A., Mason, C., Sethabutr, O., Talukder, K., Nair, G.B., Deen, J.L., Kotloff, K. & Clemens, J. 2006. A multicentre study of *Shigella* diarrhoea in six Asian countries: Disease burden, clinical manifestations, and microbiology. *PLoS Medicine*, 3(9): 1556–1569.

Selsted, M.E. 2004. *θ-Defensins: Cyclic Antimicrobial Peptides Produced by Binary Ligation of Truncated α-Defensins. Current Protein and Peptide Science*, .

Sereny, B. 1955. Experimental shigella keratoconjunctivitis; a preliminary report. *Acta microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 2(3): 293–6.

Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14387586> [Accessed 12 Desember 2019].

Setyorini, D., Utami, Y.D., Widjayanto, E., Winarsih, S., Noorhamdani, A.S. & Reto Prawiro, S. 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(1): 19–26. Tersedia di <https://www.medwelljournals.com/abstract/?doi=ijtm.2013.19.26> [Accessed 3 Mei 2017].

Shirin, T., Rahman, A., Danielsson, Å., Uddin, T., Bhuyian, T.R., Sheikh, A., Qadri, S.S., Qadri, F. & Hammarström, M.L. 2011. Antimicrobial peptides in the duodenum at the acute and convalescent stages in patients with diarrhea due to *Vibrio cholerae* O1 or enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes and Infection*, 13(12–13): 1111–1120.

Simanjuntak, C.H., Levine, M.M., O'Hanley, P., Punjabi, N.H., Noriega, F., Pazzaglia, G., Dykstra, P., Kay, B., Suharyono, Budiarto, A., Rifai, A.R.,



Wasserman, S.S., Losonsky, G., Kaper, J. & Cryz, S. 1993. Safety, Immunogenicity, and Transmissibility of Single-Dose Live Oral Cholera Vaccine Strain CVD 103-HgR in 24- to 59-Month-Old Indonesian Children. *Journal of Infectious Diseases*, 168(5): 1169–1176.

Sit, B., Zhang, T., Fakoya, B., Akter, A., Biswas, R., Ryan, E.T. & Waldor, M.K. 2019. Oral immunization with a probiotic cholera vaccine induces broad protective immunity against vibrio cholerae colonization and disease in mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(5).

Soepardi, J. 2011. Buletin Diare (Situasi Diare di Indonesia). *Kementerian Kesehatan RI*.

Sperandio, B., Fischer, N. & Sansonetti, P.J. 2015. Mucosal physical and chemical innate barriers: Lessons from microbial evasion strategies. *Seminars in immunology*, 27(2): 111–8. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25936225> [Accessed 22 Oktober 2019].

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

Sumarno 2003. Bobot Molekuler Protein Reseptor Vibrio cholera O1 M094V pada Enterosit Tikus Putih. *Jurnal Kedokteran YARSI*, 11(S): 20–29.

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): 154–160.

Sun, J.B., Czerkinsky, C. & Holmgren, J. 2009. *Mucosally induced immunological tolerance, regulatory T cells and the adjuvant effect by cholera toxin B subunit*. *Scandinavian Journal of Immunology*, .

Sur, D., Kanungo, S., Sah, B., Manna, B., Ali, M., Paisley, A.M., Niyogi, S.K., Park, J.K., Sarkar, B., Puri, M.K., Kim, D.R., Deen, J.L., Holmgren, J., Carbis, R., Rao, R., Thu Van, N., Han, S.H., Attridge, S., Donner, A., Ganguly, N.K., Bhattacharya, S.K., Nair, G.B., Clemens, J.D. & Lopez, A.L. 2011. Efficacy of a Low-Cost, Inactivated Whole-Cell Oral Cholera Vaccine: Results from 3 Years of Follow-Up of a Randomized, Controlled Trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(10): e1289. Tersedia di <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001289> [Accessed 12 Desember 2019].

Tokuhara, D., Yuki, Y., Nochi, T., Kodama, T., Mejima, M. & Kurokawa, S. 2010. Secretory IgA-mediated protection against V. cholerae and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic Escherichia coli by rice-based vaccine. *PNAS*, 107(19): 8794–8799. Tersedia di <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421480>.

Tribble, D.R. 2017. *Resistant pathogens as causes of traveller's diarrhea globally*



and impact(s) on treatment failure and recommendations. *Journal of travel medicine*, .

Underwood, M.A. & Bevins, C.L. 2010. Defensin-barbed innate immunity: clinical associations in the pediatric population. *Pediatrics*, 125(6): 1237–47. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20478936> [Accessed 7 November 2019].

UNICEF, W. 2009. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done? WHO/ UNICEF Report: 1-16. *The Lancet*.

Valore, E. V, Park, C.H., Quayle, A.J., Wiles, K.R., McCray, P.B. & Ganz, T. 1998. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *The Journal of clinical investigation*, 101(8): 1633–42. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9541493> [Accessed 7 November 2019].

Vos, T., Salomon, J.A. & Murray, C.J.L. 2015. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 386(9995): 743–800.

Wada, A., Mori, N., Oishi, K., Hojo, H., Nakahara, Y., Hamanaka, Y., Nagashima, M., Sekine, I., Ogushi, K.I., Niidome, T., Nagatake, T., Moss, J. & Hirayama, T. 1999. Induction of human β -defensin-2 mRNA expression by *Helicobacter pylori* in human gastric cell line MKN45 cells on cag Pathogenicity Island. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 263(3): 770–774.

Walker, C.L.F., Rudan, I., Liu, L., Nair, H., Theodoratou, E., Bhutta, Z.A., O'Brien, K.L., Campbell, H. & Black, R.E. 2013. *Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea*. *The Lancet*, .

Wehkamp, J., Schaubert, J. & Stange, E.F. 2007. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Current opinion in gastroenterology*, 23(1): 32–8. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17133082> [Accessed 7 November 2019].

WHO 2017. *Diarrhoeal disease*. Tersedia di <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease> [Accessed 8 Oktober 2019].

WHO 2019. *Fact sheets| Cholera*. WHO. Tersedia di <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cholera> [Accessed 8 Oktober 2019].

WHO & UNICEF 2015. *Progress on Sanitation and Drinking Water: 2015 Update and MDG Assessment*. UNICEF Publication. Tersedia di https://www.unicef.org/publications/index_82419.html [Accessed 23 Desember 2019].

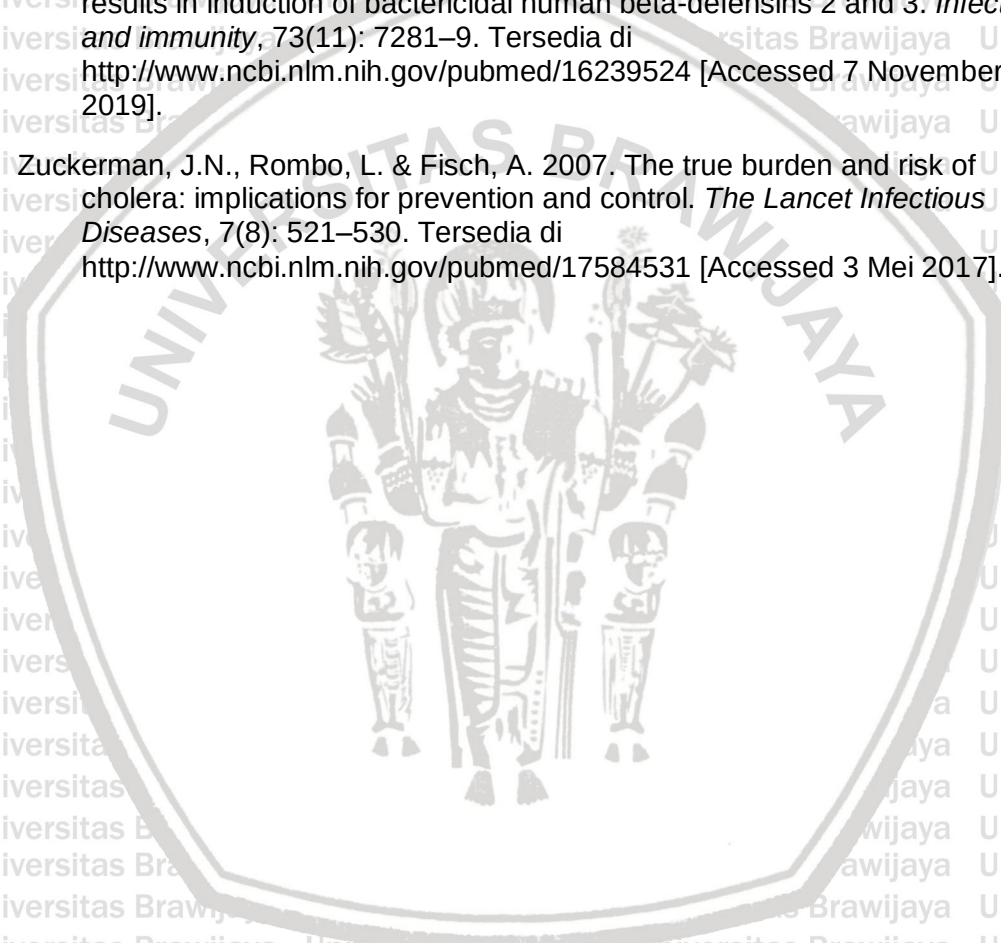
Yang, D., Liu, Z., Tewary, P., Chen, Q., de la Rosa, G. & Oppenheim, J. 2007. Defensin Participation in Innate and Adaptive Immunity. *Current Pharmaceutical Design*, 13(30): 3131–3139.

Ying, T.Y., Wang, J.J., Wang, H.L., Feng, E.L., Wei, K.H., Huang, L.Y., Huang, P.T. & Huang, C.F. 2005. Immunoproteomics of membrane proteins of *Shigella flexneri* 2a 2457T. *World Journal of Gastroenterology*, 11(43): 6880–6883.

Zeeshan Zafar, M. & Gulzar, H. 2016. A Case Study: Cholera. Tersedia di <https://www.researchgate.net/publication/310603313> [Accessed 18 Desember 2019].

Zilbauer, M., Dorrell, N., Boughan, P.K., Harris, A., Wren, B.W., Klein, N.J. & Bajaj-Elliott, M. 2005. Intestinal innate immunity to *Campylobacter jejuni* results in induction of bactericidal human beta-defensins 2 and 3. *Infection and immunity*, 73(11): 7281–9. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239524> [Accessed 7 November 2019].

Zuckerman, J.N., Rombo, L. & Fisch, A. 2007. The true burden and risk of cholera: implications for prevention and control. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(8): 521–530. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17584531> [Accessed 3 Mei 2017].



LAMPIRAN

Lampiran 1. Lembar 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. (021) (0341) 551611 Fax. 168; 569117; 567192 - Fax. (021) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kepk.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

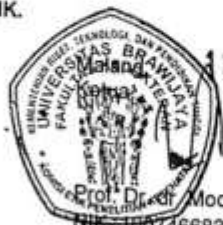
JUDUL : Reaksi Silang Respons Imun antara Molekul Adhesin *Shigella* dan *Vibrio Cholerae*.

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 Ulyia 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

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 (Amandemen Protokol).



Lampiran 2. Surat Keterangan Bebas Plagiasi



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
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 3 /UN10.F08.08/PP/2020

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 : Elsa Larissa Widyani
nim : 166070122011007
program studi : Magister Ilmu Biomedik
judul : Konjugasi Molekul Adhesi Pili Vibrio Cholerae BM 37,8 kDa Dengan Cholerae Toxin B (CTB) Berefek Protektif Terhadap Infeksi Shigella Flexneri
jenis artikel : Tesis
jumlah halaman : 145

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

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

06 JAN 2020



Ketua Badan Penerbitan Jurnal,
Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes
NIP-19751125 200501 2 001

Lampiran 3. Hasil Uji Statistik Parameter β -defensin

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
Hasil	,145	25	,184

a. Lilliefors Significance Correction

Group Statistics

	Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Hasil	Kontrol	15	3,92632385	2,072432110	,535099670
	Vaksinasi	10	5,73176992	1,926672320	,609267284

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Hasil uji Levene's Test for Equality of Variances	,020	,888	-2,193	23	,039	1,805446071	,823294214	3,508559911	,102332230
			-2,227	20,426	,037	1,805446071	,810887341	3,494666951	,116225190

Lampiran 4. Hasil Uji Statistik Parameter Massa Usus

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	Hasil_0 _menit	Hasil_5 _menit	Hasil_15 _Menit	Hasil_45 _Menit	Hasil_60 _Menit
N	25	25	25	25	25
Normal Parameters ^{a,b}	12,3488 1,31442	12,6384 1,40675	14,4388 ,89852	13,8524 1,45885	13,3192 1,97192
Most Extreme Differences	,125 ,125 -,125	,106 ,106 -,103	,087 ,059 -,087	,091 ,070 -,091	,111 ,111 -,088
Kolmogorov-Smirnov Z	,627	,528	,433	,454	,554
Asymp. Sig. (2-tailed)	,827	,943	,992	,986	,918

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil_0_menit	1,501	4	20	,240
Hasil_5_menit	1,034	4	20	,414
Hasil_15_Menit	1,051	4	20	,406
Hasil_45_Menit	,731	4	20	,581
Hasil_60_Menit	,410	4	20	,799

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hasil_0_menit	Between Groups	31,091	4	7,773	14,986	,000
	Within Groups	10,374	20	,519		
	Total	41,465	24			
Hasil_5_menit	Between Groups	31,608	4	7,902	9,948	,000
	Within Groups	15,886	20	,794		
	Total	47,495	24			
Hasil_15_Menit	Between Groups	5,316	4	1,329	1,890	,152
	Within Groups	14,060	20	,703		
	Total	19,376	24			
Hasil_45_Menit	Between Groups	28,948	4	7,237	6,541	,002
	Within Groups	22,130	20	1,106		
	Total	51,078	24			
Hasil_60_Menit	Between Groups	75,154	4	18,789	20,682	,000
	Within Groups	18,169	20	,908		
	Total	93,323	24			



Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Hasil_0_menit	KN	KPS	,89200	,45549	,064	-,0581	1,8421
		KPV	,81600	,45549	,088	-,1341	1,7661
		VVS	3,11000*	,45549	,000	2,1599	4,0601
		VVV	2,25800*	,45549	,000	1,3079	3,2081
	KPS	KN	-,89200	,45549	,064	-1,8421	,0581
		KPV	-,07600	,45549	,869	-1,0261	,8741
		VVS	2,21800*	,45549	,000	1,2679	3,1681
		VVV	1,36600*	,45549	,007	,4159	2,3161
	KPV	KN	-,81600	,45549	,088	-1,7661	,1341
		KPS	,07600	,45549	,869	-,8741	1,0261
		VVS	2,29400*	,45549	,000	1,3439	3,2441
		VVV	1,44200*	,45549	,005	,4919	2,3921
	VVS	KN	-3,11000*	,45549	,000	-4,0601	-2,1599
		KPS	-2,21800*	,45549	,000	-3,1681	-1,2679
		KPV	-2,29400*	,45549	,000	-3,2441	-1,3439
		VVV	-,85200	,45549	,076	-1,8021	,0981
	VVV	KN	-2,25800*	,45549	,000	-3,2081	-1,3079
		KPS	-1,36600*	,45549	,007	-2,3161	-,4159
		KPV	-1,44200*	,45549	,005	-2,3921	-,4919
		VVS	,85200	,45549	,076	-,0981	1,8021
Hasil_5_menit	KN	KPS	,31400	,56368	,584	-,8618	1,4898
		KPV	,51600	,56368	,371	-,6598	1,6918
		VVS	3,03400*	,56368	,000	1,8582	4,2098
		VVV	1,74400*	,56368	,006	,5682	2,9198
	KPS	KN	-,31400	,56368	,584	-1,4898	,8618
		KPV	,20200	,56368	,724	-,9738	1,3778
		VVS	2,72000*	,56368	,000	1,5442	3,8958
		VVV	1,43000*	,56368	,020	,2542	2,6058
	KPV	KN	-,51600	,56368	,371	-1,6918	,6598
		KPS	-,20200	,56368	,724	-1,3778	,9738
		VVS	2,51800*	,56368	,000	1,3422	3,6938



Hasil_15_Menit	VVS	VVV	1,22800*	,56368	,041	,0522	2,4038
		KN	-3,03400*	,56368	,000	-4,2098	-1,8582
		KPS	-2,72000*	,56368	,000	-3,8958	-1,5442
		KPV	-2,51800*	,56368	,000	-3,6938	-1,3422
		VVV	-1,29000*	,56368	,033	-2,4658	-,1142
		KN	-1,74400*	,56368	,006	-2,9198	-,5682
		KPS	-1,43000*	,56368	,020	-2,6058	-,2542
		KPV	-1,22800*	,56368	,041	-2,4038	-,0522
		VVS	1,29000*	,56368	,033	,1142	2,4658
		KPS	-1,09600	,53029	,052	-2,2022	,0102
		KPV	-1,28400*	,53029	,025	-2,3902	-,1778
		VVS	-,54600	,53029	,315	-1,6522	,5602
	KPS	VVV	-,46800	,53029	,388	-1,5742	,6382
		KN	1,09600	,53029	,052	-,0102	2,2022
		KPV	-,18800	,53029	,727	-1,2942	,9182
		VVS	,55000	,53029	,312	-,5562	1,6562
		VVV	,62800	,53029	,250	-,4782	1,7342
		KN	1,28400*	,53029	,025	,1778	2,3902
	KPV	KPS	,18800	,53029	,727	-,9182	1,2942
		VVS	,73800	,53029	,179	-,3682	1,8442
		VVV	,81600	,53029	,140	-,2902	1,9222
		KN	,54600	,53029	,315	-,5602	1,6522
		KPS	-,55000	,53029	,312	-1,6562	,5562
		KPV	-,73800	,53029	,179	-1,8442	,3682
Hasil_45_Menit	VVS	VVV	,07800	,53029	,885	-1,0282	1,1842
		KN	,46800	,53029	,388	-,6382	1,5742
		KPS	-,62800	,53029	,250	-1,7342	,4782
		KPV	-,81600	,53029	,140	-1,9222	,2902
		VVS	-,07800	,53029	,885	-1,1842	1,0282
		KN	-1,08800	,66528	,118	-2,4757	,2997
		KPV	-1,49000*	,66528	,037	-2,8777	-,1023
		VVS	1,36600	,66528	,053	-,0217	2,7537
		VVV	,75000	,66528	,273	-,6377	2,1377
		KPS	1,08800	,66528	,118	-,2997	2,4757
		KPV	-,40200	,66528	,552	-1,7897	,9857
		VVS	2,45400*	,66528	,001	1,0663	3,8417
	KPS	VVV	1,83800*	,66528	,012	,4503	3,2257
		KN	1,49000*	,66528	,037	,1023	2,8777
		KPS	,40200	,66528	,552	-,9857	1,7897
		VVS	2,85600*	,66528	,000	1,4683	4,2437

Hasil_60_Menit	VVS	VVV	2,24000*	,66528	,003	,8523	3,6277
		KN	-1,36600	,66528	,053	-2,7537	,0217
		KPS	-2,45400*	,66528	,001	-3,8417	-1,0663
		KPV	-2,85600*	,66528	,000	-4,2437	-1,4683
	VVV	VVV	-,61600	,66528	,366	-2,0037	,7717
		KN	-,75000	,66528	,273	-2,1377	,6377
		KPS	-1,83800*	,66528	,012	-3,2257	-,4503
		KPV	-2,24000*	,66528	,003	-3,6277	-,8523
	KN	VVS	,61600	,66528	,366	-,7717	2,0037
		KPS	-1,08000	,60281	,088	-2,3374	,1774
		KPV	-1,48600*	,60281	,023	-2,7434	-,2286
		VVS	3,17600*	,60281	,000	1,9186	4,4334
	KPS	VVV	1,59400*	,60281	,016	,3366	2,8514
		KN	1,08000	,60281	,088	-,1774	2,3374
		KPV	-,40600	,60281	,508	-1,6634	,8514
		VVS	4,25600*	,60281	,000	2,9986	5,5134
	KPV	VVV	2,67400*	,60281	,000	1,4166	3,9314
		KN	1,48600*	,60281	,023	,2286	2,7434
		KPS	,40600	,60281	,508	-,8514	1,6634
		VVS	4,66200*	,60281	,000	3,4046	5,9194
	VVV	VVV	3,08000*	,60281	,000	1,8226	4,3374
		KN	-3,17600*	,60281	,000	-4,4334	-1,9186
		KPS	-4,25600*	,60281	,000	-5,5134	-2,9986
		KPV	-4,66200*	,60281	,000	-5,9194	-3,4046
	VVV	VVV	-1,58200*	,60281	,016	-2,8394	-,3246
		KN	-1,59400*	,60281	,016	-2,8514	-,3366
		KPS	-2,67400*	,60281	,000	-3,9314	-1,4166
		KPV	-3,08000*	,60281	,000	-4,3374	-1,8226
		VVS	1,58200*	,60281	,016	,3246	2,8394

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



Hasil_0_menit

	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey B ^a	VVS	5	10,6540	
	VVV	5	11,5060	
	KPS	5		12,8720
	KPV	5		12,9480
	KN	5		13,7640

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Hasil_5_menit

	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Tukey B ^a	VVS	5	10,7260		
	VVV	5	12,0160	12,0160	
	KPV	5		13,2440	13,2440
	KPS	5		13,4460	13,4460
	KN	5			13,7600

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Hasil_15_Menit

	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05
			1
Tukey B ^a	KN	5	13,7600
	VVV	5	14,2280
	VVS	5	14,3060
	KPS	5	14,8560
	KPV	5	15,0440

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Hasil_45_Menit

	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey B ^a	VVS	5	12,3940	
	VVV	5	13,0100	
	KN	5	13,7600	13,7600
	KPS	5		14,8480
	KPV	5		15,2500

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Hasil_60_Menit

	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Tukey B ^a	VVS	5	10,5840		
	VVV	5		12,1660	
	KN	5			13,7600
	KPS	5			14,8400
	KPV	5			15,2460

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Hasil	Sphericity Assumed	73,574	4	18,394	25,550	,000	,516
	Greenhouse-Geisser	73,574	2,383	30,881	25,550	,000	,516
	Huynh-Feldt	73,574	2,663	27,630	25,550	,000	,516
	Lower-bound	73,574	1,000	73,574	25,550	,000	,516
Error(Ha sil)	Sphericity Assumed	69,111	96	,720			
	Greenhouse-Geisser	69,111	57,181	1,209			
	Huynh-Feldt	69,111	63,908	1,081			
	Lower-bound	69,111	24,000	2,880			

Estimates

Measure: MEASURE_1

Hasil	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	12,349	,263	11,806	12,891
2	12,638	,281	12,058	13,219
3	14,439	,180	14,068	14,810
4	13,852	,292	13,250	14,455
5	13,319	,394	12,505	14,133

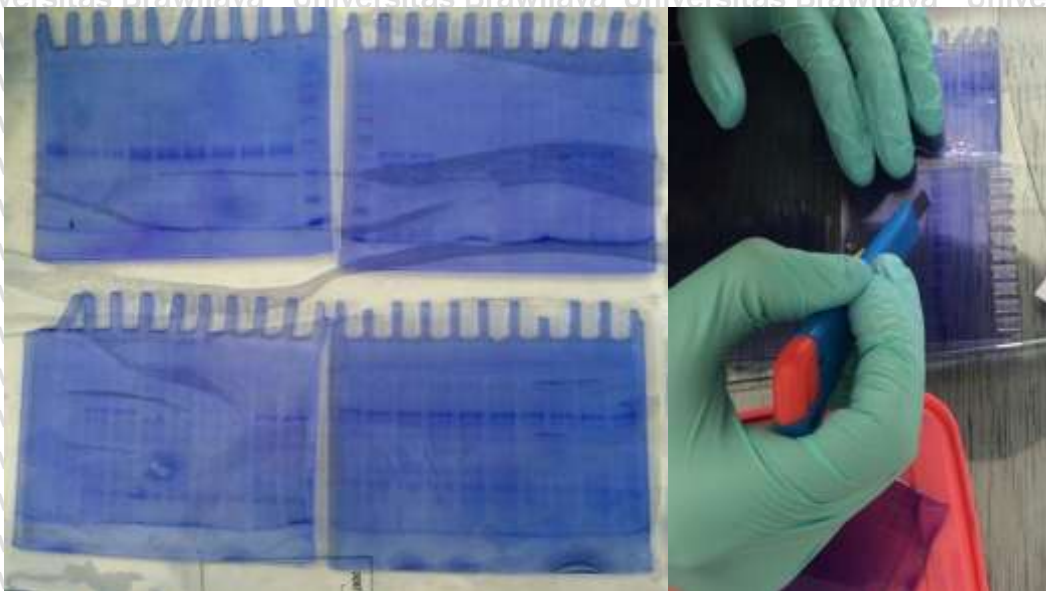
Pairwise Comparisons

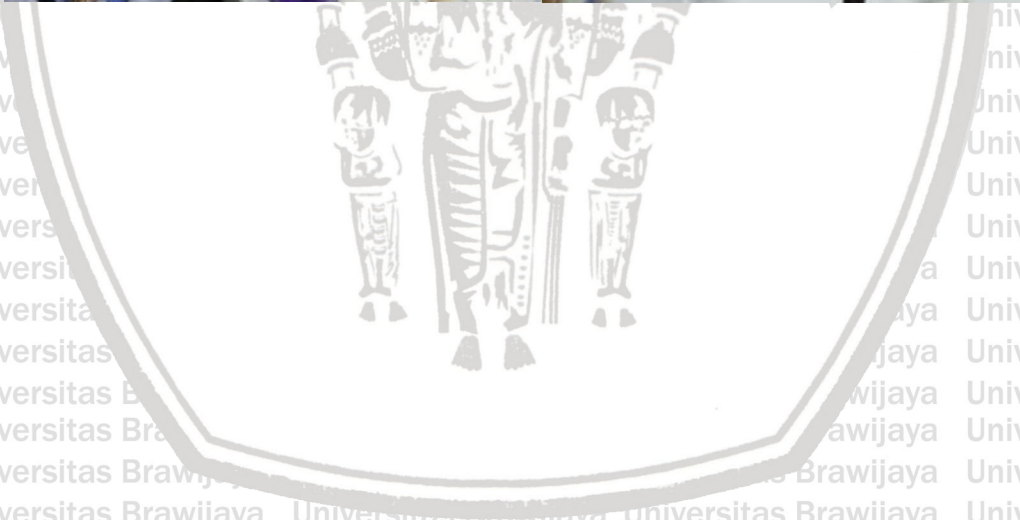
Measure: MEASURE_1

(I) Hasil	(J) Hasil	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-,290	,109	,135	-,625	,046
	3	-2,090*	,271	,000	-2,926	-1,254
	4	-1,504*	,230	,000	-2,214	-,793
	5	-,970*	,241	,005	-1,714	-,226
2	1	,290	,109	,135	-,046	,625
	3	-1,800*	,269	,000	-2,631	-,969
	4	-1,214*	,238	,000	-1,949	-,479
	5	-,681	,245	,103	-1,437	,075
3	1	2,090*	,271	,000	1,254	2,926
	2	1,800*	,269	,000	,969	2,631
	4	,586	,213	,112	-,073	1,246
	5	1,120*	,338	,029	,074	2,165
4	1	1,504*	,230	,000	,793	2,214
	2	1,214*	,238	,000	,479	1,949
	3	-,586	,213	,112	-1,246	,073
	5	,533	,177	,060	-,013	1,079
5	1	,970*	,241	,005	,226	1,714
	2	,681	,245	,103	-,075	1,437
	3	-1,120*	,338	,029	-2,165	-,074
	4	-,533	,177	,060	-1,079	,013

Lampiran 5. Dokumentasi







Lampiran 6. Hasil Uji Nanodrop dan rerata kadar beta-defensin

Sampel	Tanggal	Waktu	mg/mL
<i>Vibrio cholerae</i>	9/21/2018	10.47	2,47

Kelompok	Rata-rata (ng/mL) $\pm$ SD	Signifikansi (p)
Kontrol	3,92 $\pm$ 2,07	0,03
Vaksinasi	5,73 $\pm$ 1,93	



Lampiran 7. Letter of Submission

16:07 BL

50%



[IJMM]:Acknowledgment of Online Submission:IJMM_19_411



Inbox



Indian Journal of M... 28/10/2019

to me

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

Dear Miss. Widyani,

NOTE: This e-mail is sent to you as one of the contributing authors. If you are not corresponding author, please co-ordinate 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

RIWAYAT HIDUP

Elsa Larissa Widyani lahir di Solo, 14 Oktober 1996. Elsa adalah putri pertama dari Kolonel (Purn.) Yuddy Hartanto, S. IP dan dr. I Made Dewi Kristiawati, Sp. Rad. Ia menempuh jenjang pendidikan dasar di SDN Blimbing 3 Malang (2003-2009), lalu menempuh jenjang pendidikan menengah di SMPN 3 Malang (2009-2011) yang dilanjutkan di SMAN 5 Malang (2011-2013). Selanjutnya ia kuliah di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yaitu Program Studi S1 Pendidikan Dokter (2013-2016) dan Profesi Dokter (2017-2019). Ia juga melanjutkan pendidikan S2 Program Studi Magister Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Malang, 5 Februari 2020