



EFEK PEMBERIAN MOLEKUL ADHESIN 37,8 kDa *Vibrio cholerae* TERHADAP EKSPRESI DARI SEL T LIMFOSIT SUBSET Th17 DAN Treg DI LIEN MENCIT

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Magister



Oleh:

Aisyah Amalia

166070112011006

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2020**



IDENTITAS KOMITE PEMBIMBING DAN PENGUJITESIS

Judul Tesis: EFEK PEMBERIAN MOLEKUL ADHESIN 37,8 kDa *Vibrio cholerae*
TERHADAP EKSPRESI DARI SEL T LIMFOSIT SUBSET Th17 DAN Treg DI
LIEN MENCIT

Nama : Aisyah Amalia
NIM : 166070122011006
PS : Ilmu Biomedik
Bidang Minat : Mikrobiologi

Komite Pembimbing

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

Komite Penguji

Penguji 1 : Dr. rar. nat. Tri Yudani Mardining Raras, M.App., Sc
Penguji 2 : Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS., DMM, Sp.MK

Komite Monitoring dan Evaluasi

Dr. dr. Endang Sriwahyuni, MS

Tanggal Ujian : 13 Februari 2020

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warrahmatullahi Wabarokatuh,

Puji syukur senantiasa penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul "EFEK PEMBERIAN MOLEKUL ADHESIN 37,8 kDa *Vibrio cholerae* TERHADAP EKSPRESI DARI SEL T LIMFOSIT SUBSET Th17 DAN Treg DI LIEN MENCIT".

Karya akhir ini disusun sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Magister Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari bahwa penelitian ini jauh dari kesempurnaan, untuk itu penulis terbuka untuk saran dan kritik demi bekal penulis ke jenjang selanjutnya.

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang sedalamnya penulis sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu menyelesaikan proses penulisan tesis ini terutama kepada:

1. Rektor Universitas Brawijaya atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti Program Magister Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan kesempatan untuk menempuh pendidikan di Program Magister Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Ketua Program Magister Ilmu Biomedik, dr. Hidayat Sujuti, Sp.M, PhD, atas bimbingan, dukungan, dan arahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan S2 ini.
4. Dr. dr. Sri Poeranto, M.Kes, SpPark sebagai pembimbing yang telah menyempatkan waktu untuk membimbing secara teliti dan



memberikan banyak masukan terutama dalam penyusunan makalah ini.

5. Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, Sp.MK(K) selaku untuk ketua penelitian kros reaksi molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* dengan molekul adhesin 49,8 kDa *Shigella flexnerii* sekaligus pembimbing, yang telah menyediakan waktu untuk mengarahkan penelitian dan memberikan wawasan mengenai .molekul adhesin.

6. Dr. rar. nat. Tri Yudani Mardining Raras, M.App., Sc, selaku penguji yang telah memberikan masukan dan arahan dalam penulisan tesis ini.

7. Prof. Dr. dr. Noorhamdani, DMM, Sp.MK, selaku penguji yang telah memberikan masukan dan arahan dalam penulisan tesis ini.

8. Keluarga tercinta, orang tua penulis, ayah, ibu dan juga adik – adik penulis, serta keluarga besar yang tidak bisa saya sebutkan satu per satu yang memberikan dukungan, baik finansial dan doa yang terbaik agar penulis dapat segera menyelesaikan tesis ini.

9. Anggota Tim Penelitian Adhesion Molecule, dr. Merika Soraya, dr. Elsa Larissa Widayani, dr. Genitri Indraswari, dr. Septha Rully, dan dr. Adrian Prasetya yang telah memberikan waktu, pikiran, tenaga, dukungan dan semangat selama penelitian serta telah menjadi teman diskusi yang luar biasa bagi penulis.

10. Teman – teman Fast Track Biomedik 2017 yang selalu bekerja sama saling mendukung satu sama lain dalam perkuliahan hingga tahap ini.

11. Para Analis Laboratorium Biomedik dan Mikrobiologi, yang ikut berperan menyusun penelitian serta Mas Yayan yang mendukung penyelesaian dari tesis ini.



12. Teman – teman penulis, dr. Saskia Diva Kamila, dr. Elsa Sucahyo, dr. Clarabella Sabrina, dr. Merika Soraya, dr. Raehani Ajeng, dr. Irene Oktadiana, dr. Vanni Putri, dan dr. Nadinne Ilma yang selalu menyemangati penulis.

Penulis menyadari banyaknya kekurangan dalam penulisan tesis ini, namun penulis berharap tesis ini dapat bermanfaat untuk kemajuan ilmu kedokteran dan biomedik di masa yang akan datang. Semoga Allah Subhanallahu Wata'ala menganugerahkan segala rahmat dan kasih sayangNya kepada kita semua. Amin.

Wassalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh.

Malang, Februari 2020

Penulis

RINGKASAN

Aisyah Amalia, NIM. 166070122011006. Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, 28 Januari 2020. EFEK PEMBERIAN MOLEKUL ADHESIN 37,8 kDa *Vibrio cholerae* TERHADAP EKSPRESI DARI SEL T LIMFOSIT SUBSET Th17 DAN Treg DI LIEN MENCIT. Pembimbing (1) Dr. dr. Sri Poeranto, M.Kes, SpParK, (2) Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, Sp.MK(K).

Diare kolera adalah diare yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio cholerae* yang memiliki gejala diare berair dan sekretori dan mudah menular melalui air yang terkontaminasi. Bakteri ini meski tidak menginvasi, namun ia mensekresikan toksin yang dapat merusak integritas dari sel dan menyebabkan peningkatan cAMP di intraseluler sehingga mengakibatkan keluarnya ion elektrolit dan air dari dalam sel ke lumen usus. Kolera yang tidak tertangani memiliki angka mortalitas yang tinggi, dikarenakan dehidrasi yang bisa jatuh ke kondisi syok. Kolera sudah pernah menjadi wabah di banyak negara, tidak terkecuali di Indonesia. Diperkirakan terdapat 2.298 kasus kolera per tahun dan menyebabkan kematian 23 jiwa per tahunnya. Sampai saat ini belum ada vaksin yang ideal untuk kolera di Indonesia, vaksin yang ada saat ini memiliki kekurangan seperti protektivitasnya suboptimal terhadap anak – anak yang merupakan usia tersering yang mengalami kolera dan tidak protektif terhadap strain asia.

Pengembangan vaksin per oral dengan memanfaatkan imunitas mukosa merupakan pilihan yang rasional. Selain karena mudah, tidak membutuhkan tenaga profesional, tapi juga mengikuti perjalanan dari penyakit dimana Kolera merupakan patogen yang menginfeksi usus. Dengan ditemukannya molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* yang berperan dalam perlekatan bakteri ke enterosit, maka muncullah ide untuk mencegah perlekatan bakteri dengan memanfaatkan molekul ini. Bila imunitas terhadap molekul adhesin ini terbentuk maka proses perlekatan tidak akan terjadi, sehingga *Cholera toxin* tidak akan masuk ke dalam sel enterosit dan kondisi patologis tidak akan terjadi.

Sebagai pemeran utama sel T di mukosa, Th17 dan Treg berperan penting dalam keseimbangan homeostasis mikrobiota usus dan toleransi terhadap makanan. Saat proses vaksinasi, paparan antigen akan dipresentasikan kepada sel Th17 ataupun Treg. Dari sana sel Th17 dan Treg yang teraktivasi dan sel B yang menghasilkan IgA (sel B IgA) akan berlanjut menuju limfonodus dan lien sebelum akhirnya menuju darah dan sirkulasi sistemik dan menuju tempat asal paparan yaitu di usus.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui bagaimana pengaruh pemberian molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* (MAV) terhadap ekspresi dari sel T limfosit subset Th17 dan Treg di lien mencit. MAV akan diberikan dengan ajuvan *Cholera toxin B* (CTB) untuk meningkatkan imunogenisitas dari antigen. Diharapkan terbentuk respon imun layaknya bagaimana proses vaksinasi terjadi.

Setelah dilakukan pemberian molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* pada mencit di hari ke 7, 14, 21 dan 28, di hari ke 35 mencit lalu dibedah. Lien mencit diambil dan dilakukan isolasi limfosit untuk kemudian diukur dengan menggunakan marker CD4+ dan IL17 serta CD25+ dan Foxp3+ untuk ekspresi Th17 dan Treg berturut – turut dengan menggunakan flowsitometri.

Setelah didapatkan data terdistribusi normal ($p>0,05$), Uji Tes T Independen dilakukan untuk mengetahui perbedaan antara kelompok kontrol dan



MAV baik untuk Th17 maupun Treg. Hasil menunjukkan nilai persentase ekspresi dari sel Th17 pada kelompok MAV ($0,1863 \pm 0,08\%$) lebih tinggi secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol ($0,078 \pm 0,03\%$) ($p < 0,05$). Sedangkan pada ekspresi sel Treg tidak didapatkan perbedaan yang signifikan pada kelompok kontrol ($0,068 \pm 0,02\%$) maupun kelompok MAV ($0,012 \pm 0,07\%$). Hasil ini menunjukkan bahwa molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* dapat meningkatkan respon imun dan menyebabkan inflamasi yang diharapkan terjadi agar tercetus imunitas adaptif. Diharapkan dari proses inflamasi tersebut terdapat antigen epitop dari molekul adhesin yang dipresentasikan oleh sel dendritik ke sel T sehingga terbentuklah respon imun yang spesifik dan sekretori IgA terbentuk. Treg yang tidak meningkat menandakan bahwa tidak terbentuk toleransi terhadap antigen MAV. Setelah dianalisis secara jumlah, fenotip dari sel Th17 dan Treg juga perlu dievaluasi. Selain itu perlu dievaluasi apakah imunitas jangka lama yang diharapkan sudah terbentuk untuk mengevaluasi apakah MAV dapat dimanfaatkan sebagai kandidat vaksin Kolera.

SUMMARY

Aisyah Amalia, NIM. 166070122011006. Master in Biomedical S Universitas Brawijaya Malang, 28th January 2020. THE EFFECT OF 37.8 kDa ADHESIN MOLECULE *Vibrio cholerae* ON EXPRESSION T LYMPHOCYTE SUBSET Th17 AND Treg CELLS IN MICE SPLEEN. Supervisor chairman (1) Dr. dr. Sri Poeranto, M.Kes, SpParK, (2) Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, Sp.MK(K).

Cholera is a diarrhea caused by the bacterium *Vibrio cholerae* characterized with watery and secretory diarrhea and is easily transmitted through water contamination. Although this bacterium does not invade mucosal epithelium, it secretes toxins that can caused damage to cell integrity, increase intracellular cAMP and the electrolyte ions and water are released from the cell to the intestinal lumen. Untreated cholera has a high mortality rate due to dehydration which can fall into shock condition. Cholera has been an epidemic in many countries, including Indonesia. There are estimated 2,298 cases of cholera per year and cause 23 deaths each year. There is no cholera vaccine available in Indonesia. The current licensed vaccine has disadvantages such as its suboptimal protection for children who are very susceptible to cholera and not protective against Asian strains.

The development of an oral vaccine utilizing mucosal immunity is a rational choice. Apart from being easy, it does not require professional staff, but also follows the course of the disease where Cholera is a pathogen that infects the intestine. With the discovery of 37.8 kDa adhesion molecule of *Vibrio cholerae* which plays a role in attachment of bacteria to enterocytes, the idea of using this molecule as vaccine to prevent the attachment of bacteria is being developed. If immunity to this adhesion molecule is formed, the attachment process will not occur and Cholera toxin will not enter the enterocyte cells and pathological conditions will be prevented.

As the main role of T cells in the mucosa, Th17 and Treg play an important role in the balance of intestinal microbiota homeostasis and tolerance for food. During the vaccination process, antigen exposure will be presented to Th17 or Treg cells. From there, activated Th17, Treg cells and B cells that produce IgA (IgA B cells) will continue to lymph nodes and spleen before finally goes to the blood and systemic circulation and back to the exposed place in the intestine.

The purpose of this study was to determine how the effect of giving 37.8 kDa *Vibrio cholerae* (MAV) adhesion molecule to the expression of Th17 and Treg subset lymphocyte T cells in mice spleen. An MAV will be given with adjuvant which is Cholera toxin B (CTB) to increase the immunogenicity of the antigen. It is hoped that an immune response will be formed similar to the vaccination process.

After administration of 37.8 kDa *Vibrio cholerae* adhesion molecule on mice on days 7, 14, 21 and 28, on day 35 mice and then dissected. Spleen of mice were taken and isolated lymphocytes to be measured using CD4 + and IL17 markers and CD25 + and Foxp3 + for Th17 and Treg expression respectively using flowcitometry.

After obtaining normally distributed data ($p > 0.05$), Independent T-Test was conducted to determine differences between the two control groups and MAVs both Th17 and Treg. The percentage value of expression of Th17 cells in the MAV group ($0,1863 \pm 0,08\%$) was significantly higher when compared to the



control group ($0,078 \pm 0,03\%$) ($p < 0,05$). Whereas in Treg cell expression there was no significant difference in the control group ($0,068 \pm 0,02\%$) or the MAV group ($0,012 \pm 0,07\%$). These results indicate that the adhesion molecule 37.8 kDa *Vibrio cholerae* can increase the immune response and cause inflammation that is expected to occur in order to trigger adaptive immunity. It is expected that from the inflammatory process, specific epitope from the adhesin molecule are presented by dendritic cells to T cells so that a specific immune response and IgA secretory is formed. It is also hoped that Tregs is not increasing which indicate that tolerance is not established for MAV antigens. After being analyzed in number, it is best to also analyzed the phenotype of Th17 and Treg cells. In addition, it is necessary to evaluate whether the expected long-term immunity has been formed to evaluate whether the MAV can be used as a cholera vaccine candidate.



DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
LEMBAR ORISINALITAS.....	iii
IDENTITAS KOMITE PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
RINGKASAN.....	viii
SUMMARY.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR SINGKATAN.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xx
BAB 1.....	1
PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	6
1.3. Tujuan Penelitian.....	6
1.4. Manfaat Penelitian.....	6
BAB 2.....	8
TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. Diare Kolera.....	8
2.1.1. Etiologi Diare Kolera.....	8
2.1.2. Komponen Dinding Sel dan Struktur Tambahan Bakteri <i>Vibrio cholerae</i> 10.....	12
2.1.3. Patogenesis Diare Kolera.....	13
2.1.4. Molekul Adhesin 37,8 kDa.....	15
2.2. Imunitas Mukosa.....	19
2.2.1. Respon Imun Terhadap Infeksi Kolera.....	21
2.3. Vaksinasi.....	22
2.3.1. Jenis Vaksin.....	26
2.3.2. Vaksin Kolera.....	35
2.4. Sel T helper 17.....	36
2.4.1. Fungsi Th17.....	37
2.4.2. Pembentukan T helper 17.....	



2.4.3.	Th17 di dalam imunitas mukosa.....	38
2.4.4.	Th17 dalam Vaksinasi.....	39
2.5.	Sel T regulator.....	40
2.5.1.	Fungsi Treg.....	41
2.5.2.	Pembentukan Treg.....	42
2.5.3.	Treg dalam imunitas mukosa.....	44
2.5.4.	T reg dalam Vaksinasi.....	44
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS		46
3.1.	Kerangka Teori.....	46
3.2.	Kerangka Konsep.....	50
3.3.	Deskripsi Kerangka Konsep.....	50
3.4.	Hipotesis Penelitian.....	51
BAB 4		52
METODE PENELITIAN		52
4.1.	Rancangan Penelitian.....	52
4.2.	Jumlah Sampel.....	52
4.3.	Variabel Penelitian.....	53
4.3.1.	Variabel Bebas.....	53
4.3.2.	Variabel Terikat.....	53
4.4.	Lokasi dan Waktu Penelitian.....	53
4.5.	Definisi Operasional.....	53
4.6.	Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian.....	54
4.7.	Prosedur Penelitian/ Pengumpulan Data.....	57
4.8.	Analisis Data.....	66
4.9.	Alur Penelitian.....	67
BAB 5		69
HASIL PENELITIAN		69
5.1.	Identifikasi Sub Unit Pili <i>Vibrio cholerae</i>	69
5.2.	Hasil Penghitungan Th17.....	71
5.3.	Hasil Penghitungan Treg.....	73
BAB 6		75
PEMBAHASAN		75
6.1.	Efek Pemberian Molekul Adhesin 37,8 kDa terhadap ekspresi sel T limfosit subset Th17.....	75



6.2. Efek Pemberian Molekul Adhesin 37,8 kDa terhadap ekspresi sel T limfosit subset Treg.....	79
6.3. Keterbatasan Penelitian.....	82
BAB 7.....	84
KESIMPULAN DAN SARAN.....	84
7.1. Kesimpulan.....	84
7.2. Saran.....	84
DAFTAR PUSTAKA.....	85
LAMPIRAN.....	97



DAFTAR TABEL

Tabel 4.2.1 Tabel Kelompok Perlakuan	53
Tabel 5.2.1 Data Deskriptif Sel T Limfosit Subset Th17	71
Tabel 5.3.1 Data Deskriptif Sel T Limfosit Subset Treg	74

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.1 <i>Vibrio cholerae</i> dalam pewarnaan gram (Kamel <i>et al.</i> , 2016).....	10
Gambar 2.1.2 Patogenesis Kolera (Baker-Austin <i>et al.</i> , 2018).....	13
Gambar 2.1.3 Uji Hemaglutinin molekul adhesin 37,8 kDa <i>Vibrio cholerae</i>	14
Gambar 2.2.1 Peran respon imun Treg dan Th17 terhadap mikrobiota Usus (Omenetti <i>et al.</i> , 2015).....	18
Gambar 2.3.1 Beberapa Jenis Vaksin (Vetter <i>et al.</i> , 2018).....	22
Gambar 2.3.2 Vaksin Kolera Dukoral (kiri) dan Shanchol (kanan).....	26
Gambar 2.3.3 Pembentukan sel B IgA yang sel T-independen (Tezuka <i>et al.</i> , 2019).....	30
Gambar 2.3.4 Pembentukan Sel B IgA lewat sel T-dependen di GALT (Tezuka <i>et al.</i> , 2019).....	31
Gambar 2.3.5 Perbandingan Penggunaan Ajuvan Pada Vaksin (Di Pasquale <i>et al.</i> , 2015).....	33
Gambar 2.4.1 Tahap Pembentukan sel Th17 (Awasthi <i>et al.</i> , 2009).....	37
Gambar 2.4.2 Th17 efektor pada imunitas mukosa (Kolls <i>et al.</i> , 2010).....	38
Gambar 2.4.3 Proteksi terhadap patogen melalui induksi IL-17 (Lin <i>et al.</i> , 2010).....	39
Gambar 2.5.1 Mekanisme Treg melakukan supresi (Zhu <i>et al.</i> , 2017).....	41
Gambar 2.5.2 Treg menginduksi kematian sel T efektor lewat perforin & granzyme (Arce-sillas <i>et al.</i> , 2016).....	42
Gambar 2.5.3 Proses Pembentukan Treg (Abbas, Abul K, Lichtman, Andrew H. and Pillai, 2015).....	43
Gambar 3.1.1 Kerangka teori.....	46
Gambar 3.2.1 Kerangka Konsep.....	50
Gambar 4.9.1 Alur Penelitian.....	67
Gambar 5.1.1 Hasil SDS Page pemotongan pili bakteri <i>Vibrio cholerae</i>	70
Gambar 5.2.1 Gambaran Representatif Dot Plot Ekspresi Th17.....	71
Gambar 5.2.3 Rerata ekspresi Th17 pada kelompok kontrol dan MAV.....	72
Gambar 5.3.1 Gambar Representatif Dot Plot Ekspresi Treg.....	73
Gambar 5.3.3 Rerata ekspresi Treg pada kelompok Kontrol dan MAV.....	74

**DAFTAR SINGKATAN**

ADP	: Adenosine diphosphate
AID	: activation-induced deaminase
aP	: acellular pertussis
APC	: Antigen Presenting Cells
APRIL	: a proliferation-inducing ligand
ARF6	: ADP ribosylation factor 6
BAFF	: B-cell activating factor
BCG	: Bacillus Calmette–Guérin
cAMP	: Cyclic adenosine monophosphate
CD	: cluster of differentiation
CCL	: Chemokine (C-C motif) ligand
CCR	: Chemokine receptor
CFTR	: cystic fibrosis transmembrane receptors
CT	: Cholera toxin
CTB	: Cholera toxin B
CTxB	: Cholera toxin B
CTxA	: Cholera toxin A
CTLA-4	: Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCL	: C-X-C motif chemokine
FHA	: Filamen hemagglutinin
Foxp3	: Forkhead box P3
GALT	: Gut-associated lymphoid tissue
GM-CSF	: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Hib	: Haemophilus influenzae tipe b
IEC	: Intestinal epithelial cells
IL	: Interleukin



IgA : Immunoglobulin A

IgG : Immunoglobulin G

IgM : Immunoglobulin M

IPV : *Inactivated polio virus*

kDa : kilo Dalton

LAG : *Lymphocyte-activation gene*

LAV : *Live Attenuated Vaccine*

LPS : Lipopolisakarida

MW : *Molecular Weight*

MAV : Molekul Adhesin Vibrio

NKT : NK cell

OM : *Outer membrane*

OMP : *Outer membrane protein*

OPV : *Oral Polio Vaccine*

pIgR : polimer imunoglobulin reseptor

PBS : *Phosphate-buffered saline*

PCV : *pneumococcal conjugate vaccine*

PKA : *protein kinase A*

PRN : Pertactin

PRR : *pattern recognition receptors*

PP : *Peyer's patches*

ROR- γ t : *RAR (retinoic acid receptor)-related orphan nuclear receptor γ t*

sIgA : Sekretori Immunoglobulin A

T4P : Type IV pili

T6SS : *type-six secretion system*

Tcp : *toxin-co-regulated pilus*

TD : T dependen



Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Ti : T independent

Tfh : T follicular helper

TGF : Transforming growth factor

Th17 : T helper 17

Treg : T regulator

TT : Tetanus Toxoid

SDS Page : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel

SPSS : Statistical Package for the Social Sciences

wP : whole cell pertussis

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository
Repository
Repository



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Kelaikan Etik.....	97
Lampiran 2 Data Penelitian.....	98
Lampiran 3 Analisis Statistik Data.....	99
Lampiran 4 Uji Independen T Test.....	102
Lampiran 5 Acknowledgment of Online Submission.....	103



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Diare Kolera disebabkan oleh bakteri *Vibrio cholerae*. Manifestasi dari kolera ditandai dengan diare berair dan mudah menular melalui air.

Vibrio cholerae menghasilkan toksin menghambat absorpsi cairan sehingga menimbulkan gejala diare sekretori (Perez-Lopez *et al.*, 2016).

Kolera yang tidak tertangani memiliki angka mortalitas yang tinggi hingga mencapai 50 sampai 60%, sebagian besar disebabkan karena dehidrasi yang berat. Mudahnya bakteri ini menular melalui air yang terkontaminasi dan masa inkubasi yang sangat bervariasi menyebabkan wabah mudah terjadi terutama di beberapa negara (Baker-Austin *et al.*, 2018). Di Indonesia diperkirakan terdapat 2.298 kasus kolera per tahun dan menyebabkan kematian 23 jiwa tiap tahunnya (Ali *et al.*, 2015). Bahkan di Jakarta sempat menjadi mengalami peningkatan angka terjadinya kolera karena es yang terkontaminasi (Waturangi *et al.*, 2017).

Dalam perjalanan penyakitnya, sebelum bakteri menimbulkan infeksi, bakteri patogen termasuk *Vibrio cholerae*, harus melalui proses perlekatan untuk bertahan di lumen usus. Umumnya bakteri *Vibrio cholerae* menyerang pada usus halus. Perlekatan ini diperankan oleh molekul adhesin dari bakteri yang nantinya berikatan dengan epitel dari host. Kondisi di usus menyebabkan *Vibrio cholerae* mengaktifasi *toxR regulon* yang mengendalikan ekspresi dari *Cholera toxin* (CT) dan *toxin-co-regulated pilus* (TCP). CtxB sebagai komponen dari CT akan berikatan dengan reseptor permukaan dari epitel, sehingga proses endositosis



terjadi dan lepasnya CtxA ke dalam sitosol sel. CtxA sebagai salah satu subunit CT menjadi aktif dan menyebabkan tingginya cAMP dalam sel.

Proses inilah yang menyebabkan keluarnya ion klorida dan cairan sekresi dalam jumlah banyak menuju usus halus dan menimbulkan diare sekretori yang berat hingga dapat jatuh ke kondisi dehidrasi (Weil *et al.*, 2019).

Penelitian oleh Sumarno *et al.*, (2011) membuktikan bahwa terdapat pili dari *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa yang memiliki peran sebagai molekul adhesin dan berperan dalam patogenesis dari kolera.

Mukosa sebagai bagian terluas dari tubuh dan sering terpapar antigen, memiliki sistem imunnya sendiri yang dapat mengenali paparan antigen mana yang membutuhkan respon imun protektif untuk menjaga

sistem imun tubuh secara keseluruhan. Bakteri patogen yang masuk akan dikenali oleh sel dendritik. Selain itu antigen juga bisa dipresentasikan di

innate lymphoid follicles (ILF) ataupun di *Peyer's patches* (PP). Setelah proses presentasi dari antigen disana, sel limfosit T dan sel B yang

teraktivasi, akan menuju sistem limfatik menuju limfonodus mesenterium, lien, dan ductus thoracicus, hingga darah sebelum akhirnya kembali ke

tempat asal antigen dan menuju lamina propria untuk menjalankan fungsinya yaitu mensekresikan IgA (Tezuka *et al.*, 2019). Beberapa

antigen yang lolos akan dibawa ke limfonodus mesenterium untuk dipresentasikan pada sel T. Disana antigen akan dipresentasikan ke sel T

CD4, dan sel T CD4 yang teraktivasi dengan sitokin IL-4 dan TGF- β akan menstimulasi sel B (Murphy *et al.*, 2018). Baik yang teraktivasi di

limfonodus maupun yang teraktivasi di PP, semua sel T akan berkumpul di lien untuk akhirnya dilanjutkan ke saluran limfatik selanjutnya. Namun

sebuah studi membuktikan bahwa limfonodus mesenterium tidak terlalu banyak berperan dalam imunitas mukosa, justru setelah dilakukan reseksi



limfonodus, jumlah IgA dan sel B lebih banyak bila dibandingkan yang tidak dilakukan reseksi (Hahn *et al.*, 2010). Saat ini diyakini bahwa proses presentasi antigen oleh *Antigen presenting cells* (APC) pada sel T dan stimulasi sel B tidak terjadi di limfonodus, melainkan terjadi di lien, sedangkan limfonodus berperan dalam *class-switching* dari sel B yang yang awalnya memproduksi IgM menjadi IgA, hingga menjadi sel plasma yang memproduksi IgA (Weiberg *et al.*, 2018).

Vaksinasi adalah proses pembentukan sistem imun tubuh terhadap penyakit infeksi melalui pemberian antigen dengan harapan terbentuk respon imun yang protektif untuk mengeliminasi patogen tanpa beresiko untuk mengalami penyakit tersebut dan komplikasinya (Vetter *et al.*, 2018). Beberapa tipe dari vaksin ialah vaksin bakteri hidup yang dilemahkan (*Live attenuated vaccine/ LAV*), bakteri yang dimatikan, toksin, maupun subunit antigen tertentu yang sudah dimurnikan (Vetter *et al.*, 2018). Namun saat ini sudah dikembangkan banyak cara untuk membuat dan memproduksi vaksin. Contohnya adalah vaksin Hepatitis B yang menggunakan sel ragi atau *yeast* dengan menggunakan metode rekombinan DNA (Kumar *et al.*, 2019).

Vaksin untuk penyakit kolera yang sudah tersedia dan sudah direkomendasikan WHO adalah Dukoral dan Shanchol. Kedua vaksin ini dikembangkan dari *Whole cell killed* yaitu dari *Vibrio cholerae* yang dimatikan. Kedua jenis vaksin tersebut belum masuk ke Indonesia. Di Indonesia, vaksin kolera Kotipa pernah terbentuk dan diproduksi, sebelum akhirnya produksinya dihentikan dikarenakan efektifitasnya yang rendah.

Meski telah dipasarkan, kedua vaksin kolera tersebut dianggap masih memiliki kekurangan, mulai dari efikasi proteksi yang rendah untuk anak – anak, mahalnya harga vaksin dan biaya distribusinya, hingga proteksinya



yang tak bisa bertahan lebih dari satu tahun. Selain itu masalah yang mungkin ditimbulkan oleh *Whole cell killed* sebagai salah satu vaksin generasi awal antara lain berisiko untuk petugas produksi dan kemungkinan masih berlangsungnya perjalanan penyakit setelah vaksinasi (Shah *et al.*, 2017).

Pengembangan molekul adhesin sebagai vaksin berhasil dilakukan pada vaksin pertussis. Vaksin pertussis aseluler (aP) memiliki komponen pertactin (PRN) yaitu molekul adhesin 68-70 kDa protein. PRN adalah protein permukaan dari bakteri *Bordetella pertussis* paling immunogenik yang memediasi perlekatan ke sel eukariot. Dengan terbentuknya imunitas terhadap molekul adhesin maka tidak ada perlekatan sehingga tidak terjadi proses kolonisasi dari bakteri dan infeksi (Wizemann *et al.*, 1999).

Namun pemberian antigen immunogenik tidak cukup untuk menginduksi respon imunologis. Pemberian ajuvan perlu diberikan bersama vaksin untuk meningkatkan immunogenisitas dari vaksin. Salah satu ajuvan yang paling poten dan paling banyak dipelajari saat ini adalah *Cholera toxin* (CT) (Ekman *et al.*, 2015).

Hal penting dalam vaksinasi adalah kemampuan vaksin tersebut menginduksi sistem imun yang dapat memberikan proteksi dalam jangka waktu yang lama. Pada vaksinasi per oral, sistem imun yang diharapkan terbentuk tidak hanya sistem imun mukosa, namun juga sistem imun sistemik. Respon imun sistemik yang tepat dapat menginduksi produksi IgA melalui proses sel T-dependen yang memiliki kekebalan yang lebih lama dan lebih kompeten bila dibandingkan sel T independen (Bemark *et al.*, 2012).



Sel T-helper 17 (Th17) berperan penting untuk proteksi dari mukosa bersama dengan Treg. Th17 diduga menjadi respon awal terhadap patogen yang masuk, memicu adanya inflamasi. Ekspresi Th17 terlihat setelah 2 hari pasca infeksi *Vibrio cholerae*. Perannya dalam sistem imun mukosa juga ditunjukkan bahwa setelah vaksinasi terhadap tetanus toksoid, terbentuk Th17 yang mampu bertahan dalam jangka waktu yang lama (Perez-Lopez *et al.*, 2016).

T-regulator (Treg) dikenal sebagai sel yang berperan dalam menekan sistem imun untuk mencegah terjadinya autoimun (Omenetti *et al.*, 2015). Treg mencegah terbentuknya respon imun yang berlebihan yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan. Peningkatan Treg pada kondisi infeksi parasit terbukti menurunkan efek proteksi dari beberapa jenis vaksinasi seperti vaksin BCG dan tetanus toksoid (TT) (Labeaud *et al.*, 2009). Efek vaksinasi terhadap Treg perlu dievaluasi dikarenakan bila didapatkan kelainan dari respon imun menjadi autoimunitas maka akan mempengaruhi keamanan dari vaksin tersebut (De Wolf *et al.*, 2017). Dari sudut pandang lain, vaksin dalam proses pemberiannya sering kali menyerupai proses infeksi dan respon Treg dianggap menurunkan respon terhadap vaksin dan berpotensi menurunkan efikasi dari vaksin (De Wolf *et al.*, 2017).

Peneliti ingin mengetahui apakah terdapat pengaruh dari vaksinasi dengan menggunakan molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* terhadap sel limfosit T subset Th17 dan Treg di dalam lien mencit.



1.2. Rumusan Masalah

Apakah ada efek pemberian molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* terhadap ekspresi dari sel T limfosit subset Th17 dan Treg di lien mencit?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk membuktikan efek pemberian molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* terhadap ekspresi dari sel T limfosit subset Th17 dan Treg di lien mencit.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk membuktikan efek pemberian molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* terhadap ekspresi sel T limfosit subset Th17 di lien mencit.

2. Untuk membuktikan efek pemberian molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* terhadap ekspresi sel T limfosit subset Treg di lien mencit.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Akademik

Menambah wawasan ilmu kedokteran terutama mengenai respon imun sistemik mencit terhadap molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* sehingga dapat dijadikan ide dalam pengembangan penelitian selanjutnya dan dasar ilmu pengetahuan.

1.4.2. Manfaat Praktis



Mendapatkan informasi mengenai respon imun sistemik setelah dilakukan pemberian molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* sehingga dapat menjadikan molekul adhesin ini sebagai kandidat vaksin.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Diare Kolera

Diare kolera adalah diare yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio cholerae*. Diare ini mengancam banyak negara berkembang dengan angka mortalitas yang tinggi hingga mencapai 50 – 60%. Kolera banyak menyerang anak usia kurang dari 5 tahun, dengan hampir dari setengahnya mengalami kematian (Baker-Austin *et al.*, 2018).

Kolera adalah penyakit endemis di beberapa negara di Asia, umumnya ditemukan di Bengal, Bangladesh dan India. Kolera juga banyak terjadi di negara – negara di Afrika, Haiti dan Latin Amerika (Silva *et al.*, 2016). Kolera sering kali menyebabkan wabah yang berulang dengan pola tertentu yang berkaitan erat dengan iklim (Baker-Austin *et al.*, 2018). Kolera sudah menjadi endemis di 69 negara, salah satunya adalah Indonesia. Di Indonesia diperkirakan terdapat 2298 kasus kolera pertahun dengan perkiraan kematian 23 orang per tahun (Ali *et al.*, 2015).

Bahkan di Jakarta sempat menjadi mengalami peningkatan angka terjadinya kolera karena es yang terkontaminasi. Kondisi ini diperparah dengan bakteri *Vibrio cholerae* yang mulai mengalami resistensi antibiotik (Waturangi *et al.*, 2017).

2.1.1. Etiologi Diare Kolera

Diare kolera disebabkan oleh bakteri *Vibrio cholerae*. Bakteri ini adalah bakteri gram negatif berbentuk batang. *Vibrio cholerae* merupakan salah satu dari spesies dari genus *Vibrio*.



Genus *Vibrio* dikarakterisasikan dengan bakteri batang berbentuk koma gram negatif, fakultatif anaerob, basil fermentatif, yang aktif bergerak dengan menggunakan flagella. *Vibrio* merupakan mikroorganisme akuatik. Beberapa spesies *Vibrio* dapat menyebabkan penyakit yang serius. Terdapat 3 spesies utama *Vibrio* yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia, yaitu: *Vibrio cholerae* yang dapat menyebabkan kolera; *Vibrio parahaemolyticus* dan *Vibrio vulnificus* yang dapat menyebabkan enteritis akut dan diare bakteri (Kamel *et al.*, 2016).

Faktor virulensi utama dari bakteri *Vibrio cholerae* O1 dan O139 adalah *Cholera toxin* (CT) dan *toxin-coregulated pilus* (Tcp).

Selain itu flagella juga berperan penting dalam patogenesis dari kolera. Motilitas dari flagella membutuhkan ekspresi dari rentetan regulator bertahap yang melibatkan RNA polimerase subunit σ^{54} dan σ^{28} dan aktivator transkripsi FirA dan FlrC (Silva *et al.*, 2016).

Vibrio cholerae memiliki lebih dari 200 serogrup, namun hanya 2 serogrup yang dapat menyebabkan pandemik, yaitu O1 dan O139 (Harris, 2018). *Vibrio cholerae* serogrup O1 banyak menyebabkan wabah di beberapa area nonendemis, dikarenakan feses pada penderita kolera mengandung *Vibrio cholerae* yang sangat banyak dan mudah menginfeksi orang lain terutama bila sanitasinya buruk. Serogrup O1 sendiri dibagi menjadi 2 biotipe, yaitu Klasik dan El Tor yang dibedakan berdasarkan gejala klinis dan ekspresi serta regulasi dari faktor virulensinya (Silva *et al.*, 2016).



Gambar 2.1.1 *Vibrio cholerae* dalam pewarnaan gram (Kamel *et al.*, 2016). *Vibrio cholerae* adalah bakteri batang gram negatif berbentuk koma yang ditandai dengan warna merah saat dilakukan pewarnaan gram.

2.1.2. Komponen Dinding Sel dan Struktur Tambahan Bakteri *Vibrio cholerae*

Dinding sel berperan untuk menjaga sel dari gangguan mekanik dan mencegah sel pecah dikarenakan perbedaan tekanan. Dinding sel pula yang bertanggung jawab untuk memberi bentuk dari sel. Dinding sel tidak hanya melindungi tapi juga mengatur pertukaran nutrisi dan metabolik yang keluar masuk sel agar sel dapat tumbuh dan berkembang (Tortora *et al.*, 2013).

Secara umum, bakteri dibagi menjadi 2 berdasarkan karakteristik dari dinding sel, yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri *Vibrio cholerae* sebagai salah satu bakteri batang gram negatif memiliki karakteristik dinding sel yang kurang lebih sama dengan bakteri gram negatif lainnya. Bakteri gram negatif memiliki peptidoglikan yang lebih sedikit dibandingkan bakteri gram positif. Bakteri gram negatif juga memiliki membran



yang unik yaitu *outer membrane* (OM) yang hanya ada di bakteri gram negatif. Membran ini hanya ada memiliki molekul khusus yaitu lipopolisakarida (LPS) yang sangat toksik bagi hewan dan manusia. Lipopolisakarida umumnya dikenal sebagai endotoksin.

OM juga menjadi salah satu yang menjaga bentuk dari sel bakteri dan menjaga permeabilitas bakteri gram negatif. Protein khusus yaitu porin membentuk lubang melewati OM agar molekul nutrisi dan zat hidrofilik lainnya dapat dan keluar dari sel (Ray *et al.*, 2018).

Struktur tambahan dari sel bakteri dapat berupa pili atau fimbriae dan flagella. Fimbriae atau pili berbentuk seperti rambut.

Pili tersusun dari protein yang membentuk seperti tabung. Pili sering dikenal sebagai faktor virulensi utama dari bakteri. Pada umumnya ribuan pili tersebar di seluruh permukaan dari bakteri.

Hanya pili khusus yang dapat berikatan dengan sel tertentu seperti sel uroepitelial atau enterosit. Bakteri *Vibrio cholerae* memiliki jenis *Type IV pili* (T4P). Pili selain berfungsi untuk adhesi ke sel host tapi juga berperan dalam pembentukan biofilm, pengambilan DNA, motilitas dari sel serta pembentukan mikrokoloni. Selain itu T4P dapat berfungsi sebagai alat untuk menggerakkan diri. Berbeda dengan flagella, T4P menimbulkan gerakan *twitching* atau bergetar (Lukaszczuk *et al.*, 2019).

Sedangkan flagella terdiri dari protein yang terhubung ke sel melalui protein yang tergabung membentuk lingkaran. Flagella berguna untuk motilitas dan pergerakan dari bakteri. Pada bakteri *Vibrio cholerae*, memiliki flagella di satu sisi (*polar flagellum*) menyebabkan bakteri sangat motil (Brooks *et al.*, 2013).



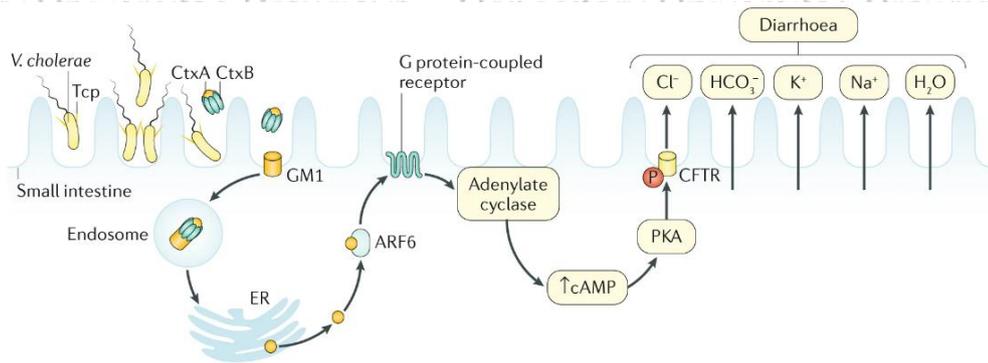
2.1.3. Patogenesis Diare Koler

Bakteri *Vibrio cholerae* banyak ditemukan di lingkungan perairan. Di lingkungan ini, bakteri dapat bertahan dari segala stres fisik, kimiawi dan biologis termasuk temperatur yang ekstrim, stres oksidatif, pemakan bakteri, dan protozoa (Silva *et al.*, 2016).

Bakteri masuk ke dalam tubuh. Untuk terjadi infeksi dibutuhkan konsentrasi inokulasi bakteri dalam jumlah tinggi. Sebuah studi pada populasi dewasa di Amerika utara membutuhkan sekitar 10^8 hingga 10^{11} organisme viabel. Hal ini dikarenakan sebagian besar bakteri *Vibrio cholerae* terbunuh karena pH asam di lambung (Weil *et al.*, 2019).

Setelah bakteri *Vibrio cholerae* masuk ke dalam tubuh, ia akan melakukan penetrasi ke barier mukus untuk melakukan adhesi pada permukaan mukosa dari usus halus. Pada hewan coba, umumnya proses kolonisasi di hewan coba terjadi di distal dari usus halus dimana terbentuk mikrokoloni pada kripte villous (Saha *et al.*, 2006). Adanya mukus, empedu dan sinyal eksternal lainnya menyebabkan bakteri *Vibrio cholerae* mengaktifkan sinyal *toxR* regulon yang mengatur ekspresi dari faktor virulensi dari *Vibrio cholerae*, contohnya yaitu *Cholera toxin* (CT) dan *toxin-coregulated pilus* (Tcp) (Weil *et al.*, 2019). CT terdiri 2 subunit, yaitu CtxA dan CtxB, dimana subunit B akan berikatan dengan GM1 dan subunit A berperan dalam mengaktifkan adenilat siklase yang menyebabkan gejala patologis pada kolera. Sedangkan Tcp diproduksi oleh bakteri *Vibrio cholerae* untuk berikatan satu sama lain dan membentuk mikrokoloni di usus (Harris, 2018).

Mekanisme mendetail dari patogenesis kolera dijelaskan pada Gambar 2.1.2.



Gambar 2.1.2 Patogenesis Kolera (Baker-Austin *et al.*, 2018). Bakteri *Vibrio cholerae* setelah mencapai usus halus akan mengekspresikan gen dari faktor virulensi, seperti *toxin-co-regulated pilus* (Tcp) dan *Cholera toxin* (CT). CT terdiri dari subunit CtxA dan CtxB yang akan berikatan dengan gangliosida GM1 pada membran plasma enterosit. Setelah diendositosisi, CT akan dibawa ke retikulum endoplasma dan subunit akan terdisosiasi. Subunit CtxA yang lepas dari retikulum endoplasma akan menuju sitosol dan berikatan dengan *ADP ribosylation factor 6* (ARF6). Ikatan dengan ARF6 akan mengaktifkan subunit CtxA untuk mengkatalis *ADP ribosylation* dari *G protein-coupled receptor*. Akibatnya adenyl cyclase teraktivasi dan meningkatkan cAMP di dalam sel, menyebabkan fosforilasi dari *cystic fibrosis transmembrane receptor* (CFTR) yang dependen terhadap protein kinase A (PKA). Keseluruhan proses ini menyebabkan ion dan air keluar dari sel menuju lumen dari usus halus dan menyebabkan diare.

Diare yang disebabkan karena *Vibrio cholerae* sangat memungkinkan untuk menjadi cara penularan. Setelah jumlah bakteri di usus halus tinggi, akan ada organisme dari permukaan usus yang lepas dari host dan siap untuk menginfeksi orang lain.

Pada kolera berat, lebih dari 10^9 bakteri viabel disekresikan dari feses dan muntahan dari seseorang yang mengalami kolera dan tetap infeksius selama lebih dari 24 jam dikeluarkan dari host (Weil *et al.*, 2019).

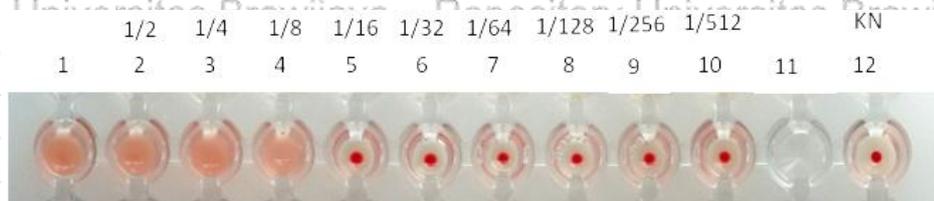
2.1.4. Molekul Adhesin 37,8 kDa

Sebuah penelitian oleh Sumarno (2000) berhasil melakukan isolasi terhadap pili dari *Vibrio cholerae* O1 M094V.



Isolasi pili dilakukan dengan menggunakan *pili bacteria cutter* yang merupakan modifikasi dari omni mixer. Berbeda dengan omni mixer, *pili bacteria cutter* tidak menggunakan naif, namun digantikan dengan silinder metal dengan permukaan yang kasar dan tajam. Kecepatan dan durasi waktu juga diukur dan disesuaikan untuk memotong pili dari bakteri (Sumarno et al., 2011).

Hasilnya didapatkan beberapa protein pili yang ditemukan dengan berat molekul 50,3 kDa, 37,8 kDa, 35,9 kDa, 21,3 kDa, 16,6 kDa dan 10,5 kDa. Selain itu juga ditemukan *outer membran protein* (OMP) dengan berat molekul 37,8 kDa. Studi tersebut menyimpulkan bahwa protein 37,8 kDa berfungsi sebagai molekul adhesin dari *Vibrio cholerae*. Molekul adhesin 37,8 kDa ini merupakan molekul reseptor yang paling ujung tersusun oleh protein pili yang lain untuk bisa berikatan dengan reseptornya yang ada di enterosit inang (Sumarno, 2003).



Gambar 2.1.3 Uji Hemagglutinin molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae*. Uji hemagglutinin dilakukan dengan molekul adhesin 37,8 kDa yang dimurnikan terhadap eritrosit yang konsentrasinya didilusi serial. Didapatkan konsentrasi protein yang telah dimurnikan adalah 80 µg/ml. Dianggap positif bila tidak didapatkan titik merah yang menandakan adanya aglutinasi. Didapatkan titer tertinggi hemagglutinin adalah 1/8.

Karakteristik untuk dapat mengagglutinasikan eritrosit atau hemagglutinasikan diketahui merupakan karakteristik bagi molekul adhesin dari *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella Thyphii* dan banyak



bakteri lainnya (Thomas *et al.*, 2002; Sumarno, 2003; Agustina, 2012; Mufida *et al.*, 2018; Darmawati *et al.*, 2019). Menilai agglutinasi dari eritrosit dianggap sebagai kemampuan fungsional dari molekul adhesin tersebut (Thomas *et al.*, 2002). Sebuah studi juga menunjukkan aktivitas hemagglutinasi yang tinggi berhubungan langsung dengan kemampuan bakteri *Shigella spp* untuk berkolonisasi (Mitra *et al.*, 2012). Untuk menilai kemampuan hemagglutinasi, molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* dengan konsentrasi 80 µg/ml diletakkan dalam well untuk dilakukan uji hemagglutination test (Gambar 2.1.3). Dari gambar tersebut terbukti bahwa molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* memiliki karakteristik hemagglutinasi dengan nilai titer dilusi tertinggi pada 1/8.

Sejak ditemukannya protein adhesin dengan berat molekul 37,8 kDa ini, berbagai penelitian telah dikembangkan dengan menggunakan molekul adhesin sebagai kandidat dari vaksin. Penggunaan molekul adhesin 37,8 kDa dengan *cholera toxin* sebagai ajuvan telah terbukti dapat menginduksi sekretori IgA yang berperan penting dalam imunitas mukosa (Sumarno *et al.*, 2011).

2.2. Imunitas Mukosa

Mukosa sebagai bagian terluas dari tubuh merupakan salah satu tempat tersering terjadinya infeksi. Mukosa adalah organ yang paling sering terpapar antigen dan bahan lain di lingkungan menyebabkan produksi sebagian besar imunoglobulin berada di mukosa. Tidak semua antigen yang berada di mukosa adalah antigen patogen. Terdapat



mikrobiota dan protein makanan yang mengandung antigen asing dikenal oleh sistem imun mukosa. Memberikan respon imun protektif pada makanan dan mikrobiota justru akan menyebabkan gangguan mengingat mikrobiota berperan dalam absorpsi makanan dan makanan dibutuhkan oleh tubuh (Abbas, Abul K, Lichtman, Andrew H. and Pillai, 2015). Respon imun protektif tidak terjadi pada mikrobiota dan protein makanan dikarenakan telah terjadi evolusi dari sistem imun mukosa dalam mengenali antigen mana yang merupakan antigen makanan dan mikrobiota normal dan yang mana yang merupakan patogen berbahaya (Murphy *et al.*, 2018).

Tidak jarang mikroba masuk karena terkonsumsi atau terinhalasi, mengancam sistem imun mukosa. Oleh karena itu, antibodi disekresikan ke lumen dari saluran gastrointestinal ataupun respirasi untuk berikatan dengan mikroba tersebut dan mencegah kolonisasi. Antibodi yang berperan utama pada jaringan mukosa adalah Imunoglobulin A (IgA) yang diproduksi oleh sel plasma di dinding mukosa (Abbas, Abul K, Lichtman, Andrew H. and Pillai, 2015). Sel B naive atau prekursor dari sel plasma mukosa sebelumnya harus diaktivasi terlebih dahulu di *Peyer patches* (PP) dan limfonodus mesenterium sebelum akhirnya bisa mensekresikan IgA dimer. Setelah teraktivasi, akan terjadi *class switching* sel B teraktivasi yang diperankan oleh sitokin TGF- β . Teori saat ini menyebutkan bahwa *class switching* membutuhkan peranan dari sel T *follicular helper* (Tfh) (Murphy *et al.*, 2018).

Imunoglobulin A (IgA) mukosa menjadi sangat penting dikarenakan berperan utama dalam imunitas mukosa. IgA mukosa berbeda dengan IgA di darah yang berbentuk monomer, di usus, IgA berbentuk polimer (dimer). Bentuk ini harus ditranspor secara aktif ke

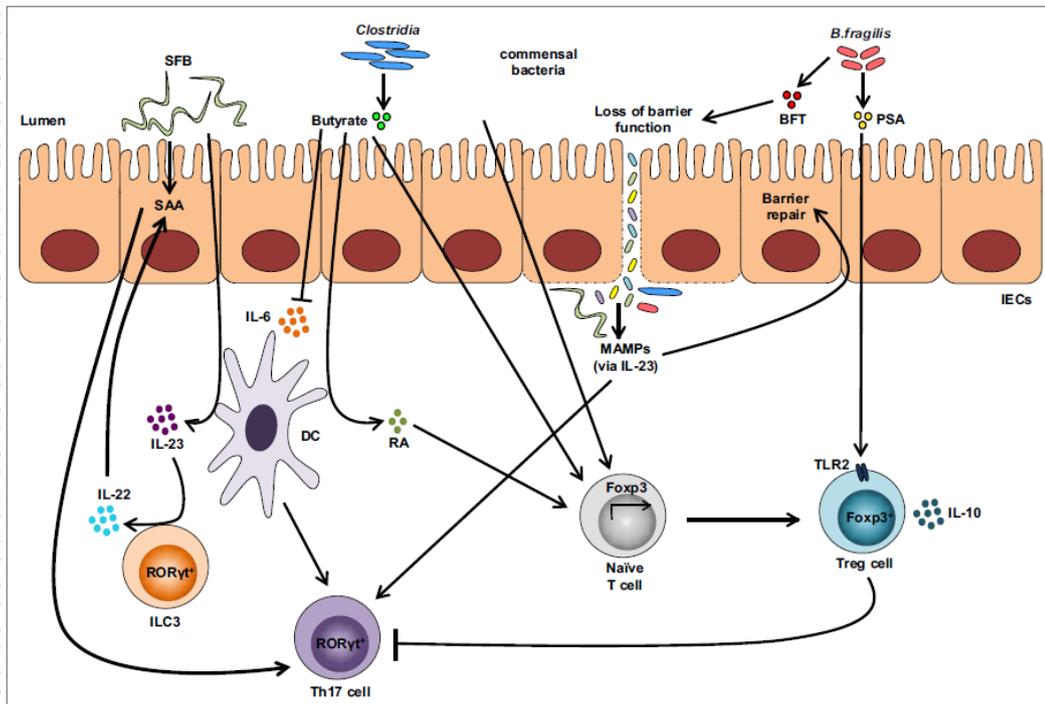


permukaan mukosa sebelum dapat berfungsi. Transpor ini diperankan oleh polimerik Ig reseptor (plgR). Tidak hanya memindahkan namun IgA juga menambahkan komponen sekretori sehingga dapat membentuk sekretori IgA (SigA) (Pabst *et al.*, 2019). SigA dapat berfungsi dalam berbagai cara, yaitu (1) menetralsir patogen dan toksin di permukaan usus, (2) berikatan dan menetralsir antigen di endosome, (3) mengeksport toksin dan patogen yang berada di lamina propia kembali ke lumen dan (4) mengikat Dectin-1 pada M cell di PP sehingga mudah dikenali oleh sel dendritik (Murphy *et al.*, 2018).

Respon imun seluler yang berada di mukosa diperankan oleh Th17 dan Treg. Th17 dikenal berperan penting dalam menjaga permukaan mukosa terhadap patogen termasuk bakteri, jamur dan virus. Sementara Treg berperan dalam mentoleransi paparan antigen yang ada di mukosa. Ini juga dibuktikan melalui pemberian antibiotik pada mencit dapat menurunkan jumlah mikrobiota yang ada di usus, diikuti dengan penurunan dari jumlah Treg secara drastis (Pandiyan *et al.*, 2019). Setiap spesies dari bakteri akan memicu diferensiasi dari sel T yang berbeda pula (Harrison *et al.*, 2013).

Mikrobiota komensal dan metabolit makanan yang berada di usus akan mempengaruhi adaptasi sel T usus di mukosa untuk memberikan respon imun. Mekanisme induksi serta respon imun spesifik terhadap antigen tertentu masih memerlukan studi lebih lanjut. Namun diketahui bahwa diferensiasi dari sel T efektor dimediasi oleh aktivasi STAT3, sehingga sitokin IL-6, IL-23 dan IL-21 terbentuk. Sedangkan produksi retinoid acid dan TGF- β 1 menyeimbangkan antara respon efektor dan regulator (Harrison *et al.*, 2013).

Meskipun Treg dan Th17 memiliki fungsi yang berbeda, mereka memiliki beberapa kesamaan. Treg dan Th17 memiliki subpopulasi yang dapat berubah menjadi efektor atau supresor sesuai dengan kondisi. Mediator yang dibutuhkan untuk meregulasi Th17 dan Treg pun kurang lebih sama, yaitu TGF- β (Diller *et al.*, 2016).



Gambar 2.2.1 Peran respon imun Treg dan Th17 terhadap mikrobiota usus (Omenetti *et al.*, 2015). Kolonisasi dari bakteri mikrobiota terjadi setelah adanya ikatan antara epitel usus. Ikatan ini akan memicu pembentukan sel Th17 lewat sitokin yang berasal dari *Intestinal epithelial cells* (IEC). Adhesi dari Bakteri mikrobiota dan IEC berpotensi membentuk sirkuit dimana IL-23 dari sel dendritik akan memstimulasi produksi IL-22 lewat *type 3 innate lymphoid cells* (ILC3). Ini akan menginduksi IEC mensekresikan SAA dan menyebabkan diferensiasi dari sel Th17. Kolonisasi dari bakteri komensal menginduksi pembentukan Treg dan menurunkan respon imun dari Th17. Bakteri komensal memproduksi asam lemak rantai pendek yang berkontribusi dalam pembentukan Treg dan menekan sitokin proinflamasi dengan meningkatkan produksi RA dari sel dendritik dan menginduksi transkripsi Foxp3. Polisakarida A (PSA) memediasi pembentukan Treg lewat reseptor TLR2 sementara sel B, dan toksin mengganggu ikatan antara IEC. Gangguan fungsi barrier, peningkatan produk mikroba dan pengenalan *microbe-associated molecular patterns* (MAMPs) akan mengaktifkan jalur IL-23 yang berujung pada perbaikan dari barrier dan stimulasi respon imun Th17.

Sebuah studi membuktikan dengan melakukan reseksi limfonodus, jumlah IgA dan sel B lebih banyak bila dibandingkan yang tidak dilakukan



reseksi. Studi ini membuktikan bahwa limfonodus mesenterium tidak terlalu banyak berperan untuk membentuk imunitas mukosa (Hahn *et al.*, 2010). Setelah antigen di usus diambil oleh sel epitel usus, makrofag ataupun sel dendritik di mukosa, mereka akan ditransfer ke limfonodus mesenterium untuk selanjutnya dibawa ke lien. Antigen yang lolos dari sistem imun akan ditangkap oleh sel B di area marginal zone lien, sedangkan yang dibawa APC akan dipresentasikan ke sel T di lien. Sel B yang teraktivasi akan kembali ke tempat antigen berasal. Peningkatan IgA dan sel B setelah dilakukan reseksi menunjukkan bahwa lien menjadi sumber asal dari sel-sel yang menyebabkan terbentuknya respon imun di mukosa usus (Weiberg *et al.*, 2018).

2.2.1. Respon Imun Terhadap Infeksi Kolera

Setelah melewati gaster, bakteri patogen harus berkompetisi dengan bakteri komensal yang berada di usus sebelum akhirnya berkolonisasi dan menyebabkan kondisi patologis. Untuk bersaing dengan bakteri komensal, bakteri *Vibrio cholerae* menggunakan *type-six secretion system* (T6SS) mengirim efektor toksik pada sel prokariot maupun eukariot. Dengan matinya sel komensal ataupun sel epitel, bakteri *Vibrio cholerae* akan mengambil alih tempat sel tersebut dan melakukan kolonisasi (Fast *et al.*, 2018).

Saat terjadi infeksi *Vibrio cholerae*, imunitas bawaan dari mukosa teraktivasi. Berbeda dengan patogen lain seperti *Shigella* atau *Salmonella*, *Vibrio cholerae* tidak bersifat invasif dan menyebabkan inflamasi yang jelas. Kolera hanya merusak barier



mukosa pada level mikroskopis dan menyebabkan terbentuknya jarak dari intraselular, inisiasi dari respon imun bawaan seperti masuknya neutrofil, makrofag dan limfosit ke lamina propria (Saha *et al.*, 2006) serta pelepasan efektor dari respon imun bawaan seperti laktoferin dan defensin (Sit *et al.*, 2019).

Infeksi dari *Vibrio cholerae* mengaktifkan beberapa *signalling* dari imunitas bawaan. Saat epitel usus manusia (HT-29) dipaparkan dengan *Vibrio cholerae*, didapatkan peningkatan ekspresi dari reseptor TLR1, kemokin CCL5, dan ICAM-1.

Ekspresi CCR4, TLR4, TLR6, dan IL13 juga ditemukan mengalami peningkatan (Winstead *et al.*, 2013). Dalam studi *in vitro*, *Vibrio cholerae* O1 mengaktifkan beberapa jalur sinyal TLR/MyD88 di permukaan sel. Sinyal ini termasuk juga adalah sinyal dari lipopolisakarida dari bakteri yang berikatan dengan reseptor TLR4 dan cytolysin yang berikatan dengan reseptor TLR2/TLR6 heterodimer (Bourque *et al.*, 2018). Pada awal infeksi kolera, didapatkan peningkatan sekresi dari sitokin IL-1 β , IL-6 dan IL-8 oleh limfosit T di lamina propria menunjukkan tanda adanya respon imun bawaan (Kuchta *et al.*, 2011).

Vibrio cholerae juga memicu imunitas adaptif. Biopsi duodenal pada pasien yang menderita kolera menunjukkan infeksi kolera dapat menginduksi sel Th17 di lamina propria Selain itu didapatkannya respon sel B memori terhadap antigen protein dari kolera menunjukkan bahwa terdapat peran sel T helper dalam infeksi kolera (Kuchta *et al.*, 2011). Ini juga dibuktikan lewat pemeriksaan darah pada pasien dengan *Vibrio cholerae* yang sel T CD4 nya memiliki reseptor *homing* ke usus, kadar antibodi



vibriosidal di darah juga meningkat pada hari ke 7 setelah terjadi infeksi (Bhuiyan *et al.*, 2009).

Infeksi terhadap *Vibrio cholerae* terbukti dapat membentuk proteksi dalam jangka waktu yang lama. Sebuah studi menunjukkan proteksi yang terbentuk setelah infeksi kolera dapat bertahan setidaknya selama 3 tahun (Levine *et al.*, 1981). Hasil ini memberikan ide bahwa agar terbentuk imunitas yang protektif maka induksi sistem imun baiknya dilakukan sesuai dengan perjalanan penyakit, dalam hal infeksi kolera, maka diberikan vaksin per oral lebih disarankan.

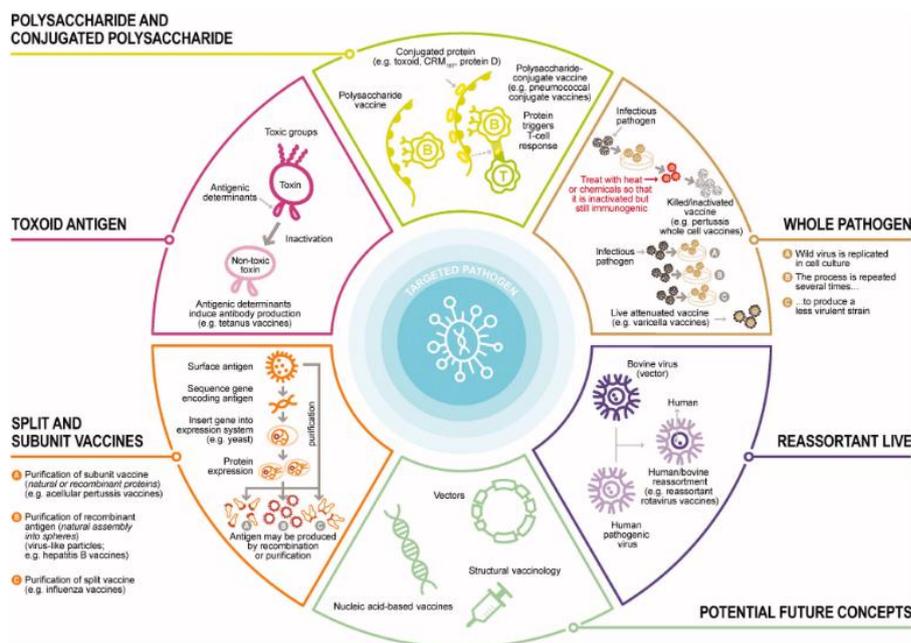
2.3. Vaksinasi

Vaksinasi dianggap sebagai pencegahan utama untuk semua penyakit infeksi. Vaksin yang dianggap ideal adalah vaksin yang menginisiasi respon imun bawaan dan menginduksi respon imun adaptif, dilanjutkan dengan inaktivasi dan pembasmian patogen yang efisien diikuti dengan terbentuknya memori dari sistem imun (Di Pasquale *et al.*, 2015).

Vaksin bekerja seperti infeksi dari penyakit, dengan menginisiasi respon imun bawaan, yang dilanjutkan respon imun adaptif yang spesifik terhadap antigen yang dipapar. Respon imun bawaan akan terbentuk beberapa jam pertama setelah paparan antigen, namun ini tidak spesifik terhadap antigen tertentu dan tidak memiliki memori. Yang diharapkan ialah respon imun adaptif dimana ia mengaktifkan limfosit T yang sangat spesifik dan imunitas humoral dengan stimulasi sel B limfosit untuk memproduksi antibodi yang spesifik. Setelah eliminasi umumnya sistem

imun adaptif membentuk memori imunologis. Memori inilah yang menjadi dasar proteksi jangka lama dan tujuan vaksinasi (Vetter *et al.*, 2018).

2.3.1. Jenis Vaksin



Gambar 2.3.1 Beberapa Jenis Vaksin (Vetter *et al.*, 2018). Vaksin dapat dibuat melalui beberapa proses. Vaksin dapat berisi patogen yang dilemahkan (biasanya virus), patogen yang dimatikan, toksin (toksin yang diproduksi oleh bakteri) atau bagian dari patogen (seperti protein rekombinan atau natural, polisakarida, polisakarida yang terkonjugasi atau partikel seperti virus).

Vaksin dibagi berdasarkan antigennya yaitu (1) *Live attenuated Vaccine* (LAV), (2) *Inactivated Vaccine*, (3) Subunit (antigen dimurnikan) dan (4) toksoid (toksin tidak aktif) (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) *et al.*, 2015). Vaksin pada generasi awal dikembangkan dengan menggunakan keseluruhan dari organisme penyebab, baik dalam keadaan hidup/ LAV, ataupun mati. Vaksin LAV meski memiliki kemampuan untuk menginduksi sistem imun hingga terbentuk imunitas jangka



panjang, faktor virulensi yang tinggi menjadikan vaksin LAV membutuhkan perhatian khusus, terutama individu yang beresiko tinggi seperti pekerja laboratorium. Beberapa masalah muncul dari vaksin generasi awal ini, mulai dari munculnya kelainan patologis yang menyerupai perjalanan dari penyakit infeksi yang berusaha dihindari, hingga pemberian vaksin kurang efektif dikarenakan tidak mampu membentuk imunitas protektif (Kumar *et al.*, 2019). Vaksin LAV bahkan sempat bermutasi dan menimbulkan ancaman untuk petugas laboratorium hingga menyebabkan kematian pada bayi pada tahap *clinical trial* dari vaksin RSV yang diinaktivasi dengan formalin (Shah *et al.*, 2017).

Contoh vaksin tipe LAV seperti Tuberkulosis (BCG), vaksin polio oral (OPV), measles, rotavirus dan *yellow fever* memanfaatkan bakteri yang masih hidup namun sudah dilemahkan. Penggunaan LAV ini sangat terbatas, umumnya dilakukan pada virus (Vetter *et al.*, 2018).

Sedangkan *Inactivated* adalah vaksin yang memanfaatkan bakteri yang sudah dimatikan untuk memicu respon imun dari tubuh, seperti yang ada pada pertusis *whole-cell* (wP) dan *inactivated polio virus* (IPV) (Shah *et al.*, 2017).

Tipe lain dari vaksin adalah *subunit vaccine* dimana vaksin ini memanfaatkan subunit antigen tertentu dari bakteri yang sudah dimurnikan untuk memicu sistem imun. Contoh vaksin subunit adalah pertusis (aP), *Haemophilus influenzae* tipe b (Hib), pneumokokus (PCV-7, PCV-10, PCV-13), dan hepatitis B (HepB) (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) *et al.*, 2015).



Toksin yang disekresikan oleh bakteri yang menginfeksi juga dapat digunakan untuk pembentukan vaksin toksoid. Vaksin yang menggunakan cara ini adalah tetanus (TT) dan difteri (Vetter *et al.*, 2018).

Vaksin generasi baru menggunakan antigen yang mampu menginduksi sistem imun protektif tanpa adanya progresi dari perjalanan penyakit. Berbeda dengan vaksin generasi pertama yang bisa menyebabkan demam, vaksin antigen dinilai lebih unggul secara penggunaan, lebih mudah dikarakterisasi, lebih aman dan mudah diproduksi membuat pengembangan vaksin berbasis antigen mulai banyak dikembangkan (Shah *et al.*, 2017).

Namun pemberian antigen tidak cukup untuk menginduksi respon imunologis, oleh karena itu perlu diberikan ajuvan dari vaksin untuk meningkatkan imunogenisitas dari vaksin. Formulasi kombinasi dari komponen antigenik dari patogen digabung dengan ajuvan yang kuat memiliki kapasitas untuk menginduksi respon seluler dan menyebabkan respon imun lokal dan sistemik. Contohnya adalah vaksin hepatitis B memanfaatkan sel ragi atau yeast sebagai ajuvan dengan teknologi DNA rekombinan (Kumar *et al.*, 2019).

Molekul adhesin berperan penting dalam kolonisasi. Bakteri ekstraseluler perlu menjaga posisinya untuk menginfeksi sel inang.

Adhesin ini mencegah bakteri patogen tersingkirkan. Salah satu struktur bakteri yang terlibat dalam perlekatan bakteri ke sel inang adalah pili. Adhesin juga diketahui berperan dalam pembentukan biofilm (Ribet *et al.*, 2015).



Pengembangan vaksin dengan menggunakan molekul adhesin ini bukan untuk pertama kalinya. Vaksin pertusis aseluler (aP) adalah salah satu jenis vaksin yang berhasil dan banyak digunakan saat ini. Vaksin aP memiliki beberapa komponen dalam vaksinnya yaitu toksin pertusis, filamen hemagglutinin (FHA), pertactin (PRN) yang adalah molekul adhesin 68-70 kDa protein, fimbrial-2 dan fimbrial-3 serta tentunya adjuvan dari vaksin. PRN adalah protein permukaan dari bakteri *Bordetella pertussis* paling immunogenik yang memediasi perlekatan ke sel eukariot (World Health Organization, 2013).

Studi yang dilakukan oleh Sumarno tahun 2003 juga menyebutkan adanya perlekatan antara bakteri penyebab kolera yaitu *Vibrio cholerae* dengan bobot molekul 37,8 kDa. Dengan metode ELISA, ditemukan Fibronectin, laminin dan RGD berikatan dengan protein OMP 37,8 kDa ini. Sumarno et al., (2011) juga membuktikan pemberian vaksin subunit pili 37,8 kDa dengan cholera toxin sebagai adjuvan mampu memberikan proteksi dengan menginduksi IgA sekretori. Merujuk pada keberhasilan vaksin aseluler pertusis, studi dengan menggunakan protein 37,8 kDa ini mulai dikembangkan.



2.3.2. Vaksin Kolera

Hingga saat ini, vaksin yang umum digunakan adalah vaksin oral *whole-cell killed* yang diberikan berupa cairan untuk diminum maupun kapsul. Produk vaksin oral *whole-cell killed* yang sudah disetujui WHO sampai saat ini adalah Shanchol dan Dukoral. Vaksin tersebut mampu memberikan respon antibodi IgA lokal (Karlsen *et al.*, 2003).



Gambar 2.3.2 Vaksin Kolera Dukoral (kiri) dan Shanchol (kanan). Dukoral adalah vaksin kolera *whole cell recombinant Cholera Toxin B*. Dikonsumsi dengan dilarutkan dengan air terlebih dahulu sebelum diminum. Sedangkan Shanchol adalah vaksin oral kolera bivalen yang berasal dari *whole cell killed*.

Meski sudah dipasarkan, vaksin kolera ini memiliki beberapa kelemahan. Setelah dilakukan pemberian 3 kali dosis, efektifitas yang dicapai pada anak – anak masih suboptimal.

Virulensi yang berbeda untuk setiap spesies juga dianggap menjadi batasan dan kekurangan dari *whole-cell* vaksin kolera.

Apalagi mengingat anak – anak adalah usia yang rentan terhadap kolera (Ranheim *et al.*, 2015). Shanchol yang dianggap vaksin yang lebih bisa diterima ternyata juga hanya mampu memberikan

efikasi proteksi sebanyak 17% untuk anak dibawah 5 tahun. Pemberian Sanchol dosis tunggal juga tidak dapat memberikan proteksi pada anak usia kurang dari 5 tahun (Qadri *et al.*, 2018).

Biaya yang mahal – baik harga vaksin dan harga distribusinya –



dan sulitnya mempertahankan suhu dingin sebagai rantai penyimpanan vaksin dianggap menjadi salah satu hambatan besar dalam cakupan vaksin kolera saat kejadian luar biasa terjadi di Haiti tahun 2010 lalu. Beberapa studi skala besar bahkan menunjukkan Dukoral sudah tidak memberikan proteksi setelah 1 tahun pemberian bahkan setelah 2 kali pemberian. Imunitas setelah vaksin Shanchol ataupun Dukoral baru terbentuk setidaknya 1 minggu setelah vaksinasi. Selain itu komponen vaksin yang diinaktivasi oleh suhu tinggi dan formalin dapat berpotensi menurunkan imunogenisitas dari sel T (Kabir, 2014).

Meskipun sudah terbentuk imunitas yang protektif, detail mekanisme terbentuknya respon imun setelah vaksinasi *Vibrio cholerae* per oral masih belum diketahui secara pasti. Sebuah studi membuktikan bahwa vaksin *whole cell recombinant cholera toxin* memiliki respon imun seluler yang jauh lebih terbatas dibanding proses infeksi Kolera sendiri. Ini diduga menjadi penyebab respon imun memori berbeda antara yang divaksin dengan yang pernah mengalami infeksi (Kuchta *et al.*, 2011). Diduga jalur TLR berperan penting setelah pemberian vaksin Dukoral yang mampu menginduksi respon imun humoral (Sirskyj *et al.*, 2016).

Di Indonesia, vaksin Kotipa sempat dikembangkan untuk melawan kolera. Vaksin yang diproduksi oleh PT Bio Farma ini tidak hanya melindungi terhadap Kolera, namun juga penyakit tipus dan paratypus. Pemberian dosis pertama dari vaksin kotipa adalah dengan pemberian injeksi intramuskular 0,5 mL dilanjutkan 1 mL setelah 4 minggu untuk dosis kedua dan booster tiap 6 bulan



bila terdapat paparan yang terus menerus. Namun meskipun sudah mendapat izin penggunaan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM), pemberian vaksin Kotipa tidak mendapat izin dari WHO dikarenakan efektivitasnya yang rendah, hanya berkisar 30 – 50%.

2.3.3. Vaksinasi Mukosa

Mengingat area mukosa adalah area tersering tempat patogen masuk, maka pemilihan vaksinasi melewati mukosa dianggap rasional (Tezuka *et al.*, 2019). Sistem imun mukosa dinilai berperan penting baik mukosa oral, nasal, rectal maupun vaginal dikarenakan sebagian besar infeksi berawal dari mukosa, sehingga pemberian vaksin di mukosa dianggap mampu memicu sistem imun yang protektif, terutama untuk infeksi yang noninvasif.

Namun tantangan dalam pemberian vaksin mukosa adalah sulitnya membentuk respon imun sekretori IgA yang kuat dan membentuk proteksi (Holmgren *et al.*, 2005). Beberapa studi menunjukkan bahwa respon imun mukosa yang tidak maksimal menjadi masalah eradikasi dan mencegah transmisi polio. Ini menyebabkan munculnya kejadian luar biasa yang terselubung dari polio di Israel (Xiao *et al.*, 2017).

Vaksin mukosa dalam jenisnya tidak jauh berbeda dengan vaksin biasa, dapat berupa *whole cell* dan ada yang subunit saja. Namun yang tersedia saat ini adalah vaksin tradisional berupa bakteri yang dilemahkan ataupun patogen yang dilemahkan, dimana memiliki masalah dalam keamanan. Berbanding terbalik



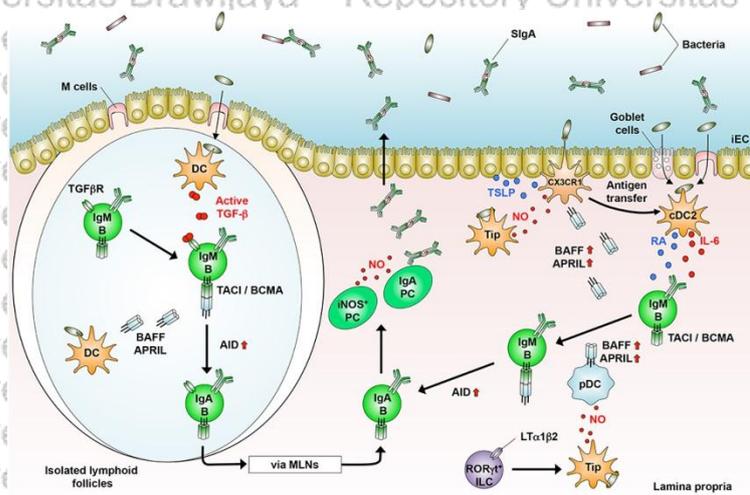
dengan vaksin subunit terdiri dari molekul patogen dianggap aman, namun imunogenisitasnya lebih rendah (Tezuka *et al.*, 2019). Vaksin kolera yang ada saat ini adalah HAP yang disekresikan oleh *Vibrio cholerae* dapat merupakan faktor reaktogenik dari vaksin. Kultur supernatan dari vaksin reaktogenik dapat menurunkan resistensi trans epitelial dari sel usus. Penurunan ini juga berkorelasi dengan adanya protease hemaglutinin (Saha *et al.*, 2006).

Pemberian protein dengan karakteristik adhesin seperti pili, subunit B *E. coli* LT toksin, hemaglutinin virus influenza dan *Cholera toxin* secara oral terbukti sangat efektif untuk menginduksi respon imun mukosa dan memicu respon antibodi serum (Ogra *et al.*, 2001).

Pada respon imun sistemik, antibodi bakterisidal seperti IgG digunakan sebagai parameter efektor utama. Namun pada mukosa, Immunoglobulin A (IgA) dianggap lebih berperan dibanding IgG. Ini dikarenakan jumlah komplemen di mukosa lebih sedikit sehingga proses bakterisidal melalui aktivasi komplemen yang dependen terhadap antibodi tidak terjadi. Di mukosa, dimer IgA bekerja dengan menghambat motilitas dan menahan bakteri patogen di mucus layer menyebabkan proses kolonisasi tidak terjadi (Harris, 2018). Hasil yang diharapkan dari pemberian vaksin mukosa adalah IgA yang disekresi ke lumen mukosa dapat mencegah penetrasi bakteri ke barrier epitel (Tezuka *et al.*, 2019).

Antigen dari vaksin protein, toksin, LAV baik yang bakteri maupun virus akan ditangkap oleh APC dan merespon melalui sekresi antibodi melalui sel T (*T-dependent antibody response*)

atau TD. Sedangkan pada vaksin dengan antigen berupa polisakarida dapat menginduksi respon dari sel B tanpa melalui sel T (*T-independent antibody response*) atau TI (Pabst *et al.*, 2019).



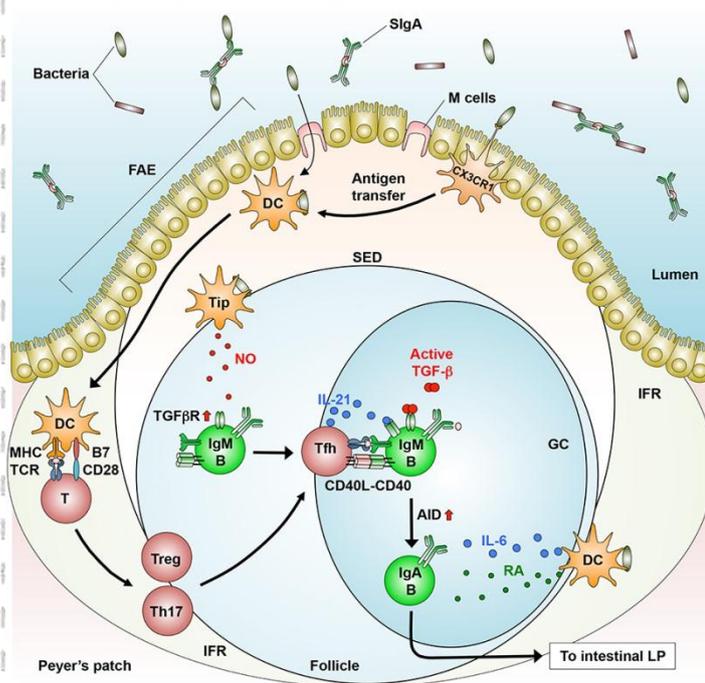
Gambar 2.3.3 Pembentukan sel B IgA yang sel T-independen (Tezuka *et al.*, 2019).

Di folikel limfoid terisolasi (*isolated lymphoid follicle*), sel dendritik (DC) yang menangkap bakteri lumen akan memproduksi TGF-β. DC juga memproduksi BAFF dan APRIL untuk membentuk sel B yang memproduksi IgA yang menuju lamina propria (LP) dan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi IgA (PCs). Di LP, sel dendritik (cDC2) yang mengambil bakteri di lumen juga akan memproduksi IL-6 dan *retinoic acid* (RA). Antigen selain diambil lewat DC, juga dibantu oleh sel CX3CR1⁺. BAFF dan APRIL juga diproduksi sebagai respon dari nitric oxide (NO). RORγt⁺ *innate lymphoid cells* (ILCs) menginduksi DC memproduksi NO sehingga BAFF/APRIL terbentuk. Adanya BAFF/APRIL, RA dan IL-6, akan mengubah sel B yang memproduksi IgM menjadi sel B yang memproduksi IgA. Ini dilanjutkan dengan diferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi IgA. AID: *activation-induced cytidine deaminase*; APRIL: *a proliferation-inducing ligand*; BAFF: *B-cell activating factor*.

Meski IgA dapat terbentuk secara T independen (TI), namun IgA yang dihasilkan dianggap masih kurang baik dikarenakan memorinya yang singkat dan afinitasnya yang rendah dibandingkan melalui jalur produksi antibodi dengan melalui sel T.

IgA yang terbentuk melalui proses ini umumnya adalah IgA terhadap bakteri komensal. Afinitas yang rendah terjadi karena proses *somatic hypermutation* yang terjadi tidak terjadi secara lengkap (Gommerman *et al.*, 2014). Imunitas jangka panjang

dinilai dari pemeliharaan dari efektor antigen spesifik atau induksi dari sel memori yang efisien dan cukup cepat diaktivasi kembali pada paparan patogen (Siegrist, 2008). Meskipun IgA lewat jalur TI tidak bertahan lama, namun jalur TI sangat berperan dalam homeostasis produksi IgA dalam menjaga keseimbangan mikroba usus (Tezuka *et al.*, 2019).



Gambar 2.3.4 Pembentukan Sel B IgA lewat sel T-dependen di GALT(Tezuka *et al.*, 2019). Di Peyer's patches (PP), sel dendritik (DC) menangkap antigen secara direk ataupun tidak (melalui transfer antigen oleh sel CX3CR1) bakteri di lumen. Sel DC akan memproduksi IL-6 dan berpindah dari SED menjadi IFR, dimana terjadi pengenalan antigen ada sel CD4 menjadi sel *T follicular helper* (Tfh), dimana ini dapat berasal dari sel Th17 dan Treg. Sel Tfh akan berpindah menuju folikel dimana akan ada interaksi sel B IgM melalui reseptor MHC-TCR dan CD40-CD40L. Tip-DC akan menginduksi ekspresi reseptor TGF- β selama produksi nitric oxide (NO). Selanjutnya sel B akan berdiferensiasi menjadi sel B yang memproduksi IgA melalui ekspresi AID sebagai respon dari TGF- β , IL-21 (dari sel Tfh), dan RA (dari DC). Sel B IgA akan bermigrasi ke lamina propria (LP) dimana dia akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi IgA. FAE: *Follicle-associated epithelium*; M cells: *microfold cells*; SED: *Subepithelial dome*; IFR: *interfollicular regions*.

Sedangkan proses pembentukan IgA melalui jalur T dependen (TD) umumnya diperankan oleh *T follicular helper* (Tfh). Th17 dan Treg diketahui berperan dalam membantu diferensiasi



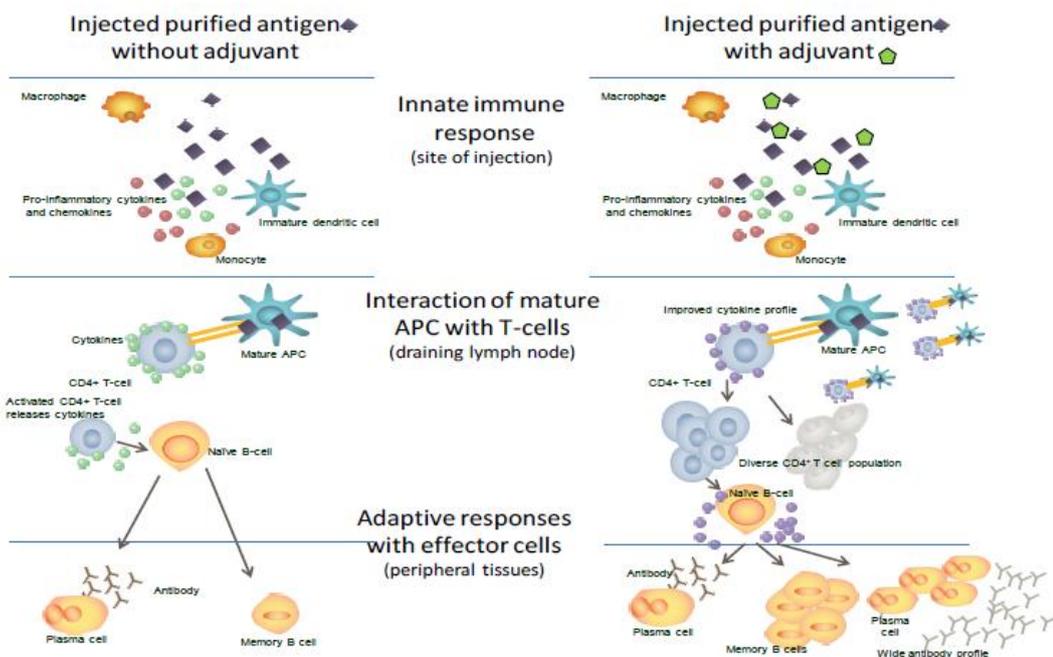
sel CD4 menjadi Tfh. Tfh akan menyebabkan diferensiasi dari sel B hingga akhirnya menjadi sel plasma untuk memproduksi IgA yang spesifik terhadap antigen dengan afinitas yang tinggi (Hirota *et al.*, 2013).

Sebuah studi dilakukan dengan melakukan reseksi dari limfonodus mesenterium sebelum melakukan paparan terhadap cholera toxin. Dari hasilnya didapatkan IgA tetap terbentuk meski tanpa limfonodus mesenterium, sedangkan pada liennya didapatkan peningkatan dan proliferasi dari sel B IgM (Hahn *et al.*, 2010). Selain itu, lien juga menjadi organ pengumpul dari sel T. Setelah teraktivasi, baik di limfonodus ataupun patch of peyer, limfonodus akan masuk ke jalur limfatik, menuju lien, ductus thoracicus, darah dan kembali ke usus untuk menuju lamina propria. Semua sel T yang teraktivasi akan berkumpul di lien sehingga pengukuran sel T di lien dianggap mengukur sel T keseluruhan di usus secara kumulatif.

Salah satu poin penting dari vaksinasi adalah terbentuknya memori. Sampai saat ini belum diketahui cara terbaik untuk membentuk imun memori pada mukosa. Setelah vaksinasi diharapkan terbentuk sel plasma IgA yang dapat bertahan lama. (Tezuka *et al.*, 2019). Namun sebuah teori mengatakan imunitas jangka lama yang protektif diperankan oleh sel B memori dimana sel ini tidak memproduksi IgA. Sel ini dapat bertahan lama, dan akan berdiferensiasi dengan cepat menjadi plasmablas setelah paparan antigen. Studi pada manusia menunjukkan bahwa respon sel B memori yang spesifik terhadap antigen O berkaitan dengan perlindungan terhadap infeksi (Haney *et al.*, 2018).

2.3.4. Ajuvan Vaksin

Salah satu cara untuk meningkatkan keberhasilan vaksin terutama mukosa ialah penggunaan ajuvan. Ajuvan didefinisikan sebagai bahan yang ditambahkan pada vaksin untuk meningkatkan respon imun. Ajuvan memiliki banyak keuntungan mulai dari mengurangi frekuensi vaksinasi, mengurangi dosis antigen setiap vaksin, meningkatkan kualitas respon imun dan memungkinkan terbentuknya imunitas silang dan pada beberapa kasus dapat meningkatkan stabilitas dari formulasi vaksin. Beberapa ajuvan yang umum digunakan adalah alum, emulsi, liposom dan mikropartikel (Shah *et al.*, 2017).



Gambar 2.3.5 Perbandingan Penggunaan Ajuvan Pada Vaksin (Di Pasquale *et al.*, 2015). Vaksin meningkatkan respon imun bawaan di tempat injeksi atau tempat masuk, meningkatkan maturasi dari APC sehingga dapat menginduksi sel T yang ada di limfonodus dan menyebabkan terbentuknya respon imun adaptif melalui sel – sel efektor yang mampu bertahan lebih lama di jaringan perifer.



Imunisasi kurang lebih memiliki proses yang mirip dengan agen infeksius. Saat terdapat paparan dari benda asing, efektor seluler dari respon imun bawaan seperti makrofag, monosit, neutrofil dan sel dendritik dapat mengenali pola spesifik permukaan *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) menggunakan pola *pattern recognition receptors* (PRR) yang akan menentukan agen tersebut adalah ancaman atau bukan. Bila dikenali sebagai patogen yang potensial, proses fagositosis, pelepasan mediator inflamasi termasuk kemokin dan sitokin, aktivasi komplemen dan rekrutmen dari sel akan diaktifkan dan menimbulkan inflamasi. Pada vaksin yang menggunakan subunit atau komponen murni, tidak terdapat PAMP sehingga respon imun bawaan yang teraktivasi tidak efektif menyebabkan respon imun adaptif tidak terbentuk. Disinilah peran dari adjuvan, dimana bekerja seperti PAMP, memicu respon imun bawaan melalui beberapa mekanisme sesuai dengan Gambar 2.3.5, membuat komponen vaksin seperti ancaman, sehingga terjadi maturasi dari APC dan inisiasi dari aktivitas imun adaptif (Di Pasquale *et al.*, 2015).

Saat ini banyak jenis adjuvan lain yang mulai dikembangkan. Pada vaksin hepatitis B, sel ragi digunakan untuk menginduksi terbentuknya respon imun. Ragi memiliki imunogenisitas yang tinggi, mengandung karbohidrat dan mampu memodulasi respon imun sehingga memiliki potensi untuk menjadi adjuvan (Angrand *et al.*, 2019). Namun pemanfaatan ragi sebagai vaksin memiliki resiko, dikarenakan terdapat kesamaan antigen mimikri antara peptida dari sel ragi dengan protein myelin manusia. Meski ini



masih berupa teoritis, masalah ini perlu dipertimbangkan dengan hati – hati.

Salah satu ajuvan mukosa yang paling poten dan paling banyak dipelajari hingga saat ini adalah *Cholera toxin* (CT). CT yang tidak mengalami rekombinasi (holotoxin) dapat menginduksi respon sel T CD4+ secara luas, termasuk respon Th1, Th2, Th17 dan T regulator (Kuchta *et al.*, 2011). Penggunaan CT sebagai ajuvan terbanyak adalah dengan mennggabungkan *Cholera Toxin B* (CTB) dengan antigen yang diinginkan. Ikatan dengan CTB dapat berada di N-terminal, C-terminal ataupun keduanya sekaligus. Pemanfaatan CTB selain melalui rekombinasi juga dapat diberikan bersamaan dengan antigen yang diharapkan tanpa ikatan fisik (Stratmann, 2015).

Mekanisme CT sebagai ajuvan adalah dengan memiliki aktivitas ajuvan yang kompleks yaitu dengan meningkatkan ekspresi kostimulator CD40, CD80, dan CD86, ekspresi IL-4 yang dilanjutkan dengan respon dari sel Th2, *isotype-switching* IgA oleh sel B, produksi IgG dan ekspresi CD40 pada sel T yang berujung menahan respon dari sel Th1 (Petrovsky, 2015). Pemberian kolera toksin dapat meningkatkan imunitas mukosa utamanya melalui sekretori IgA untuk patogen (Holmgren *et al.*, 2005).

2.4. Sel T helper 17

T helper 17 (Th17) dikenal sebagai salah satu subset sel T yang unik, berbeda dengan sel Th1 ataupun Th2. Pada tahun 2005, Sel T helper baru yang memproduksi IL17 pertama kali digagas dan diberi nama Th17 (Tesmer *et al.*, 2008). Th17 bersifat proinflamatori yang

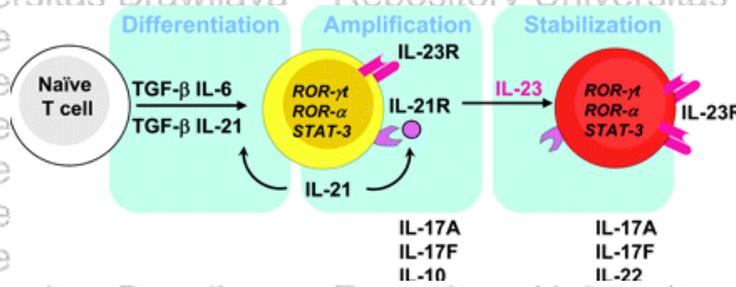


berperan penting dalam mekanisme tubuh melawan patogen dan menjadi jembatan antara imunitas bawaan dan adaptif. Th17 mengekspresi *retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor- γ t* (ROR- γ t) sebagai penanda. Th17 memproduksi IL17 yang bertugas merekrut sel imun seperti netrofil yang berguna untuk memicu terjadinya inflamasi (Perez-Lopez *et al.*, 2016). Selain IL17, Th17 juga mensekresikan sitokin lain seperti GM-CSF dan IL-22. Sebagai sel yang bertanggung jawab untuk inflamasi, ekspresi Th17 tidak jarang dikaitkan dengan penyakit inflamasi yang kronis (Sehrawat *et al.*, 2017).

2.4.1. Fungsi Th17

Peran Th17 sebagai pertahanan tubuh dapat dibagi menjadi beberapa mekanisme. Diawali oleh pelepasan dari peptida antimikrobal oleh sel epitel, perekrutan netrofil dan makrofag, menginisiasi imunitas humoral dan mengamplifikasi subset T *helper* yang lain. Beberapa studi terbaru menunjukkan peran sel Th17 mampu memberikan proteksi dengan mengaktifkan sel B dan pembentukan germinal center. Th17 juga berperan meningkatkan sel B masuk ke paru dan meningkatkan ekspresi *polimer imunoglobulin reseptor* (pIgR) yang mengatur transportasi imunoglobulin (Ig) A dan IgM ke lumen mukosa. Beberapa studi bahkan menunjukkan Th17 dipertahankan sebagai sel memori efektor di jaringan mukosa untuk waktu yang lama (Kumar *et al.*, 2013).

2.4.2. Pembentukan T helper 17

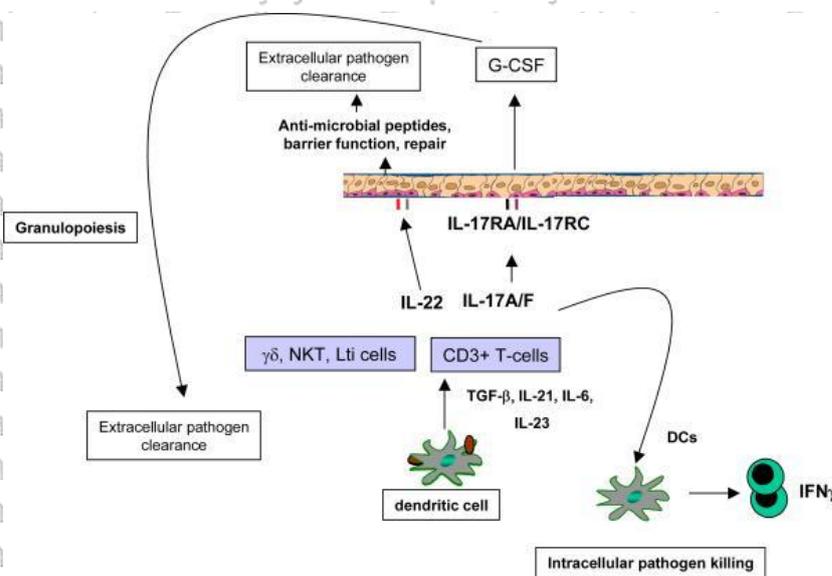


Gambar 2.4.1 Tahap Pembentukan sel Th17 (Awasthi *et al.*, 2009). Aktivasi dari sel T naive dengan paparan TGF-β dan IL-6 menginisiasi diferensiasi sel Th17. Sel Th17 memproduksi IL-21 yang bekerja secara autokrin untuk mengamplifikasi Th17. IL-21 juga menginduksi IL-23R dan membantu diferensiasi dari Th17 agar berespon pada IL-23. IL-23 juga menstabilkan fenotip Th17 dengan mensekresikan IL-17A, IL-17F dan IL-22, membantu sel Th17 membentuk fungsi efektor. STAT2 berperan penting dalam diferensiasi, amplifikasi dan stabilisasi Th17 melalui sinyal IL-6, IL-21 dan IL-23.

Proses pembentukan dari sel Th17 dijelaskan dalam Gambar 2.4.1. Sitokin IL-6 dan TGF-β menjadi penginduksi terbentuknya diferensiasi dari sel Th17 pada mencit (Blaschitz *et al.*, 2010), sementara TGF-β sendiri juga merupakan penginduksi utama dalam pembentukan sel Treg. Pada manusia, proses pembentukan sel Th17 diperankan oleh IL-1 dan IL-23 (Kumar *et al.*, 2013). Kesamaan sitokin menyebabkan kecondongan Th17 ataupun Treg bergantung pada konsentrasi dari sitokin TGF-β itu sendiri. Pada konsentrasi rendah, TGF-β akan bersinergi dengan IL-6 dan IL-21 untuk mengekspresikan reseptor IL-23 sehingga berdiferensiasi menjadi Th17. IL-21 dan IL-23 akan melepaskan kemampuan Foxp3 untuk menghambat RORγt sehingga terjadi diferensiasi dari sel Th17. (Omenetti *et al.*, 2015).

2.4.3. Th17 di dalam imunitas mukosa

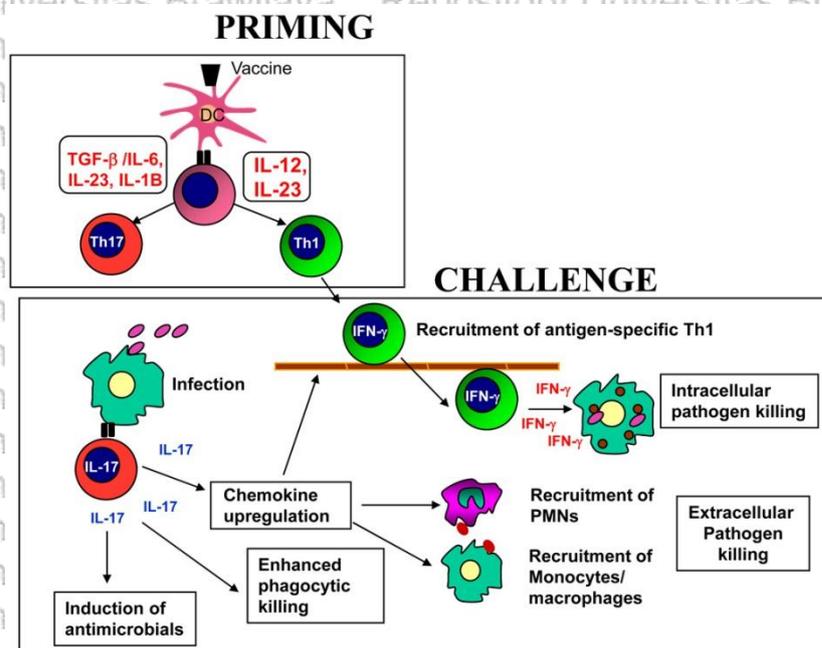
Th17 memiliki peranan penting di mukosa. Th17 memproduksi IL-17 yang penting untuk menjaga homeostasis intestinal bekerja sama dengan Treg. Sel T dari sistemik akan kembali ke tempat asalnya (*homing*) di mukosa akan tinggal di lamina propia usus dengan bantuan ekspresi kemokin reseptor CCR9 dari sel T yang akan berikatan dengan CCL25 dari sel epitel (Murphy *et al.*, 2018). Namun belakangan diketahui Th17 bermigrasi ke mukosa melalui ikatan antara CCR6 dan CCL20 di permukaan sel epitel intestinal (Shen *et al.*, 2014).



Gambar 2.4.2 Th17 effektor pada imunitas mukosa (Kolls *et al.*, 2010). Th17 terbentuk setelah sel dendritik mempresentasikan pada sel T dengan stimulasi dari sel TGF- β , IL-21, IL-6 dan IL-23. Selain Th17, IL-17 serta IL-22 juga diproduksi yang diproduksi oleh sel $\gamma\delta$ dan sel NK. Sel epitel mukosa memiliki reseptor terhadap IL-17A, IL-17F dan IL-22 yang bila teraktivasi akan menginduksi produksi G-CSF dan CXC kemokin. Kombinasi dari G-CSF dan CXC kemokin seperti CXCL1, CCXL2, CXCL5 dan CXCL8 menyebabkan rekrutmen dari netrofil untuk menyerang patogen bakteri ekstraseluler ataupun jamur di mukosa. IL-22 dan IL-17 juga menyebabkan ekspresi dari peptida antimikrobal. IL-22 yang mengaktivasi STAT3 juga memediasi perbaikan epitel yang memediasi perbaikan epitel. Bila patogen berada di intraseluler, IL-17 akan menginduksi produksi IL-12 sel dendritik dan memicu imunitas Th1 untuk mengontrol bakteri intraseluler.

Pada beberapa kasus infeksi pada menciit, sel Th17 diketahui berkontribusi dalam respon imun mukosa dari inang (Blaschitz *et al.*, 2010). Hal tersebut terjadi dikarenakan sitokin efektor dari Th17 yaitu IL-17A, IL-17F dan IL-22. Th17 bersama dengan Treg juga berperan dalam menjaga keseimbangan dari mikrobiota yang ada di lumen usus. IL-17 dan IL-22 yang disekresikan oleh sel Th17 juga memiliki banyak fungsi, mulai dari menjadi kemoatraktan terhadap sel proinflamatori, tapi juga dapat meningkatkan sekresi antimikrobal peptida (Boyaka, 2017).

2.4.4. Th17 dalam Vaksinasi



Gambar 2.4.3 Proteksi terhadap patogen melalui induksi IL-17 (Lin *et al.*, 2010).

Vaksinasi menginduksi pembentukan sel Th1 dan Th17. Setelah mendapatkan paparan dari patogen, sel memori Th17 akan berekspansi dan memproduksi IL-17. IL-17 akan meningkatkan ligan CXCR3 dan menarik efektor Th1, memproduksi IFN- γ , untuk mengendalikan patogen intraseluler. Vaksin yang menginduksi IL-17 juga akan menyebabkan sel epitel mengekspresikan kemokin untuk rekrutmen dari netrofil, monosit dan makrofag serta memicu sel fagositik. IL-17 juga menginduksi peptida antimikroba yang penting untuk mengendalikan patogen ekstraseluler. Selain itu IL-17 juga meningkatkan sekresi mukosa sehingga melindungi dari bakteri.



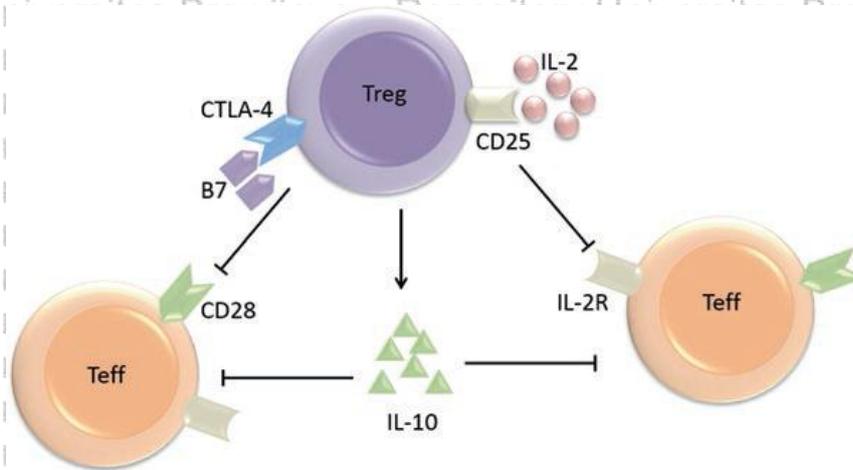
Beberapa penelitian menunjukkan peningkatan Th17 sebagai respon dari imunisasi. Vaksin mikroba seperti *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori* dan virus influenza dapat menginduksi sel Th17 dan membentuk imunitas mukosa. Induksi dari IL-17 dapat melindungi *Klebsiella pneumoniae* secara efektif. Vaksin LAV dari *Yersinia pestis* juga meningkatkan respon Th17 di paru yang dapat menurunkan morbiditas. IL-17 juga diduga memiliki peran proteksi. Dalam eksperimen laboratorium, setelah dilakukan infeksi *Pseudomonas aeruginosa* didapatkan peningkatan IL-17 yang cepat yang bila ditekan menyebabkan perburukan patologi dan meningkatkan memperberat gejala (Kumar *et al.*, 2013). Pemberian kolera toksin terbukti mampu menstimulasi sel dendritik untuk meningkatkan diferensiasi dari sel Th17 dengan menghasilkan sitokin yang menggeser polarisasi dari sel T (Kang *et al.*, 2016).

2.5. Sel T regulator

Sel T regulator (Treg) umumnya ditandai dengan ekspresi CD25 atau faktor transkripsi Foxp3 yang diekspresikan intraseluler sebagai marker yang paling banyak digunakan (Berod *et al.*, 2012). Treg umumnya dikenal berperan menjaga toleransi dan homeostasis, sehingga menghambat pembedaan self antigen yang memicu inflamasi dan autoimunitas (Beer *et al.*, 2010). Rangkaian IL-2 berperan penting dalam diferensiasi Treg. Sel Treg mengekspresikan reseptor IL-2 dengan

afinitias yang tinggi. Selain itu IL-2 juga menginduksi *Transforming growth factor-β* (TGF-β) dan menstabilkan sel Treg (Sehrawat *et al.*, 2017).

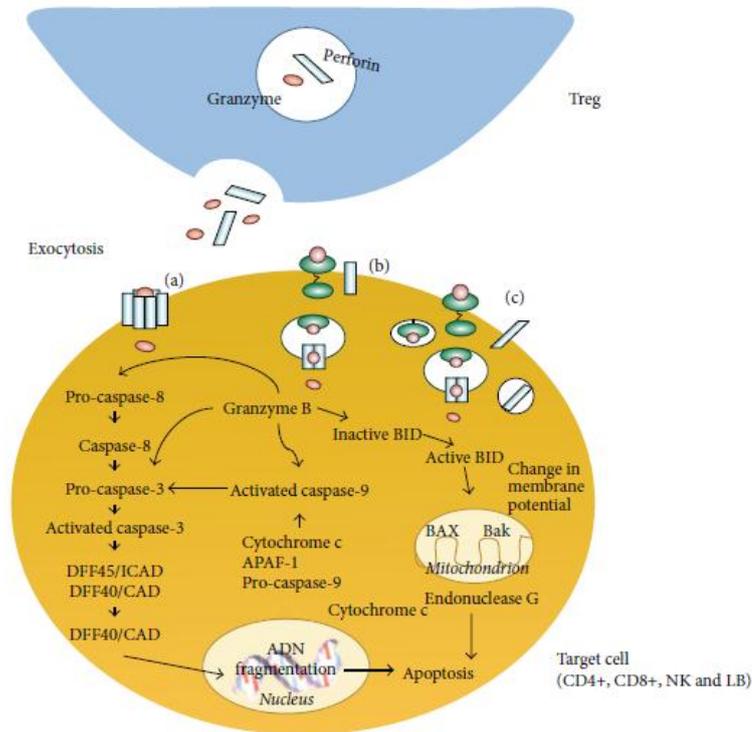
2.5.1. Fungsi Treg



Gambar 2.5.1 Mekanisme Treg melakukan supresi (Zhu *et al.*, 2017). Permukaan Treg terdapat reseptor CTLA-4 yang akan berkompetisi dengan sel T efektor lainnya untuk berikatan dengan CD28. IL-2 yang dibutuhkan untuk proliferasi dan keberlangsungan dari sel T efektor (Th1 ataupun Th2) akan diambil oleh Treg yang tidak memproduksi IL-2 namun sangat membutuhkan IL-2 untuk bertahan. IL-10 yang diproduksi oleh Treg akan mengeluarkan fungsi supresif dengan mempengaruhi sel T efektor.

Terdapat beberapa mekanisme peran Treg dalam melakukan perannya menekan sistem imun. Yang pertama adalah mensekresikan sitokin yang bersifat imunoregulatori seperti TGF-β, IL-10, dan IL-35. Treg juga mengganggu proses metabolik dari sel T salah satunya ialah dengan menghambat respon proliferaatif lewat reseptor IL-2, menghambat metabolik lewat cAMP, dan mediasi immunomodulasi lewat reseptor adenosin A2. Treg juga berinteraksi dengan sel dendritik lewat reseptor *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4* (CTLA-4) dan *Lymphocyte-activation gene* (LAG) untuk fungsi dan maturasi dari sel dendritik agar mengeluarkan fenotip yang lebih tolerogenik (Abbas, Abul K,

Lichtman, Andrew H. and Pillai, (2015). Treg juga memproduksi granzyme dan perforin sehingga menyebabkan lisis dan apoptosis dari sel T efektor. (Arce-sillas *et al.*, 2016).



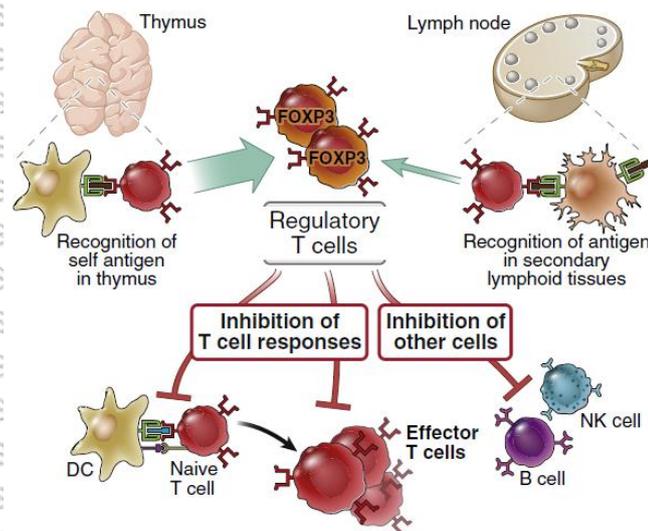
Gambar 2.5.2 Treg menginduksi kematian sel T efektor lewat perforin & granzyme (Arce-sillas *et al.*, 2016). Granzyme dapat masuk ke sel efektor melewati channel yang dimediasi perforin (a), melalui endositosis setelah berikatan dengan reseptor (b) atau melalui celah dari kerusakan sel membran akibat perforin (c).

2.5.2. Pembentukan Treg

Treg dibagi menjadi natural Treg yang berasal dari timus dan adaptif Treg yang terbentuk di perifer yaitu GALT, lien, limfonodus dan jaringan yang mengalami inflamasi. Natural Treg adalah Treg yang terbentuk saat terjadi interaksi antara *T cell receptor* (TCR) dengan MHC class 2 yang merupakan self antigen.

Sedangkan adaptif Treg terbentuk karena interaksi dengan alergen, mikrobiota komensal, neoantigen, alloantigen dan

inflamasi. Perbedaan dari kedua Treg ini selain berasal dari tempat terbentuknya, Treg natural membutuhkan kostimulasi CD28, sedangkan adaptif Treg membutuhkan CTLA-4. Treg natural lebih sering dikaitkan dengan respon imun berlebihan atau autoimun, sementara Treg adaptif lebih dikaitkan pada kondisi menjaga keseimbangan pada proses inflamasi, alergi makanan, dan mencegah inflamasi kronis (Curotto de Lafaille *et al.*, 2009). Treg yang akan dibahas disini adalah Treg perifer atau adaptive Treg.



Gambar 2.5.3 Proses Pembentukan Treg (Abbas, Abul K, Lichtman, Andrew H. and Pillai, 2015). Sel CD4 yang mengenali self antigen dapat berdiferensiasi menjadi sel regulator di timus maupun jaringan perifer, sebagai proses dari faktor transkripsi FoxP3. Umumnya di dalam tubuh, sebagian besar sel T regulator berasal dari timus. Sel regulator ini menghambat aktivasi dari sel T naive dan diferensiasinya menjadi sel efektor dengan mekanisme kontak ataupun sitokin yang disekresi untuk menghambat respon dari sel T.

Mekansime terbentuknya Treg dijelaskan pada Gambar 2.5.3. Treg terbentuk setelah sel APC mempresentasikan antigen, dengan stimulasi TGF- β , tanpa adanya sitokin proinflamasi lainnya seperti IL-6 atau IL-21. Konsentrasi TGF- β yang tinggi



menyebabkan penurunan dari ekspresi reseptor IL-23 sehingga terbentuklah Foxp3 Treg yang menghambat fungsi ROR γ D.

Mediator lain seperti metabolit dari vitamin A juga cenderung menginduksi Treg dibanding Th17 dengan meningkatkan sinyal TGF- β sambil menghambat ekspresi IL-6 (Omenetti *et al.*, 2015).

2.5.3. Treg dalam imunitas mukosa

Sekitar lebih dari 10¹⁴ bakteri dan virus komensal pada manusia yang sehat. Treg memiliki peran yang penting dalam imunitas mukosa bebarengan dengan Th17 untuk menjaga keseimbangan tersebut. Sebagai organ yang sering terpapar antigen, Treg yang ditemukan di mukosa sebagian besar adalah Treg yang berasal dari perifer. Dengan adanya Treg yang memproduksi IL-10 dalam jumlah banyak, sel dendritik akan mengirim sinyal pada *toll-like receptors* untuk menghentikan proses inflamasi. Treg akan berpindah ke lamina propria untuk melakukan fungsinya sebagai regulator dari sistem imun (Shen *et al.*, 2014).

Treg dapat berdiferensiasi menjadi *T follicular helper cells* (Tfh) sel di *Gut-associated lymphoid tissue* (GALT) untuk membantu respon dari IgA (Boyaka, 2017).

2.5.4. T reg dalam Vaksinasi

Tidak hanya pada infeksi, Treg juga mengendalikan respon imun terhadap vaksinasi. Tidak hanya efektor, tapi Treg juga bisa membentuk terbutuk spesifik terhadap antigen tertentu.



Keduanya akan membentuk interaksi yang kompleks dan menyeimbangkan respon imun setelah proses vaksinasi. Selain bagaimana Treg terbentuk, efek vaksinasi terhadap Treg juga perlu diamati. Ini dikarenakan perubahan Treg baik jumlah maupun fungsi dapat menyebabkan respon autoimunitas dan mempengaruhi keamanan dari vaksin (De Wolf *et al.*, 2017).

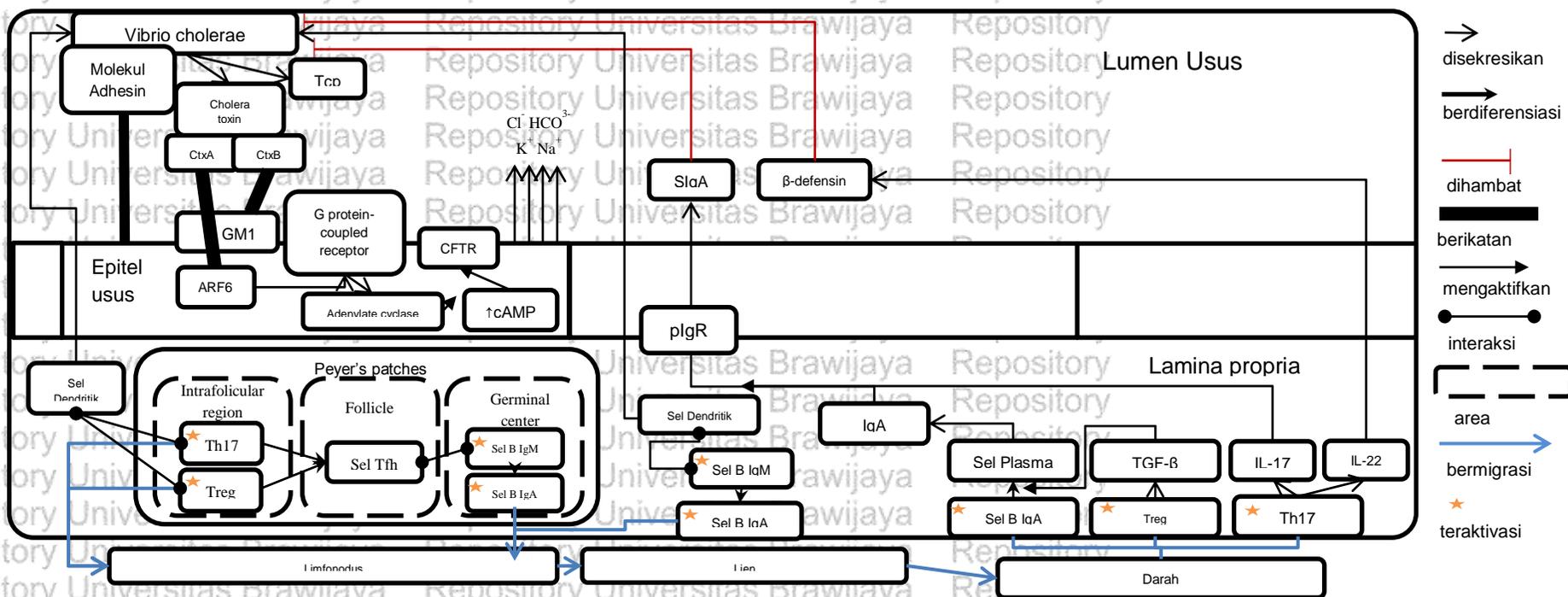
Saat infeksi parasit terutama cacing, didapatkan peningkatan Treg diiringi dengan peningkatan IL-10 dan TGF- β , membuat tubuh menjadi hiporesponsif terhadap vaksinasi sehingga efikasinya menurun (Gazzinelli-Guimaraes *et al.*, 2018).

Teori tersebut menggagas ide vaksinasi dengan melakukan deplesi dari sel Treg atau menghambat Treg demi mencapai keefektifan dari vaksin.

Vaksinasi kolera dengan menggunakan *Whole cell* rekombinan subunit B menunjukkan pergeseran respon menuju Treg, bukan seperti yang diharapkan yaitu Th1 dan Th17 (Kuchta *et al.*, 2011).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori



Gambar 3.1.1 Kerangka teori



Vibrio cholerae setelah melewati gaster, akan berhasil masuk ke lumen usus. Disini bakteri akan dipertemukan dengan enterosit. *Vibrio cholerae* yang memiliki molekul adhesin dengan berat molekul 37,8 kDa akan berikatan dengan enterosit (Sumarno, 2003). *Vibrio cholerae* setelah yang berada di lumen usus akan mengeluarkan faktor virulensinya yaitu Tcp dan Cholera Toxin (CT). CT terdiri dari 2 subunit yaitu subunit CtxA dan subunit CtxB. CtxB yang terdiri dari pentamer akan berikatan dengan reseptor GM1 yang ada di permukaan enterosit. Ikatan ini menyebabkan CtxA masuk ke dalam enterosit. Di dalam enterosit, CtxA akan menuju sitosol dan berikatan dengan ADP *ribosylation factor* 6. Ikatan CtxA dengan ARF6 akan mengaktifkan CtxA sehingga akan mengkatalis ADP *ribosylation* dari *G-protein coupled receptor*. Ikatan ini akan menyebabkan adenyl cyclase teraktivasi dan meningkatkan cAMP di intrasel. Akibatnya akan terjadi fosforilasi dari *cystic fibrosis transmembrane receptor* (CFTR). Proses ini akan menyebabkan ion baik Cl^- , HCO_3^- , K^+ , Na^+ dan H_2O keluar menuju lumen dari usus dan menyebabkan diare berair atau sekretori.

Masuknya bakteri *Vibrio cholerae* selain menyebabkan perjalanan dari penyakit kolera, sistem imun tubuh juga teraktivasi secara bersamaan, utamanya adalah sistem imun mukosa usus. Adanya patogen di lumen usus akan dikenali oleh sel dendritik. Sel dendritik akan menangkap patogen dan mempresentasikan untuk nantinya membentuk perlindungan terhadap patogen tersebut. Immunoglobulin A sebagai komponen utama dalam imunitas mukosa dapat dibentuk melalui 2 proses, yaitu melalui T-independent (TI) ataupun melalui T-dependen



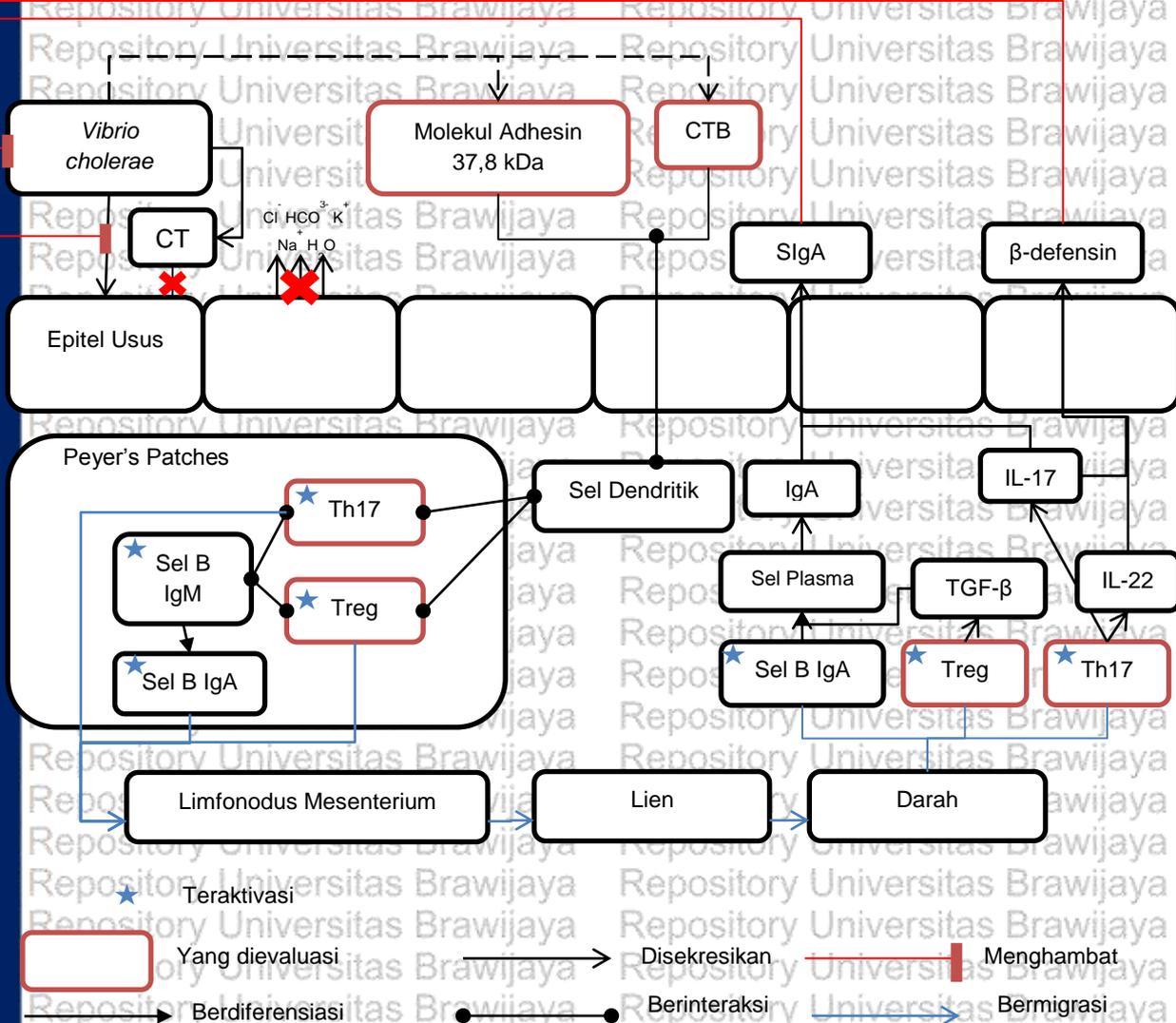
(TD). Pada proses TD, IgA diperoleh saat antigen yang ditangkap oleh sel dendritik dipresentasikan pada sel T. Proses presentasi yang berada di Peyer's patches (PP), dimana saat sel dendritik masuk mempresentasikan antigennya di *interfollicular regions* (IFR). Presentasi antigen dapat terjadi antara sel dendritik dengan sel Th17 ataupun sel Treg dimana keduanya merupakan sel yang penting dalam imunitas mukosa. Presentasi antigen ke sel T akan menyebabkan sel Th17 ataupun Treg memiliki karakteristik seperti sel T *follicular helper* (Tfh), dimana dia akan berinteraksi dengan sel B. Sel B yang sebelumnya memproduksi IgM akan berdiferensiasi menjadi sel B yang memproduksi IgA. Proses ini lalu dilanjutkan dengan migrasi dari sel Th17 dan Treg yang teraktivasi serta sel B IgA menuju sistem limfatik, menuju limfonodus, dan semua akan berkumpul di lien. Dilanjutkan ke sirkulasi sistemik melalui darah dan akhirnya kembali menuju ke daerah yang terpapar, yaitu mukosa usus dengan arahan dari ekspresi kemokin reseptor CCR9. Sel Th17, Treg dan sel B IgA yang teraktivasi ini akan menjalankan fungsinya di lamina propria usus. Sel Treg akan mensekresikan TGF- β yang membantu differensiasi dari sel B IgA menjadi sel plasma. Sel plasma akan mensekresikan IgA di lamina propria. Sedangkan sel Th17 akan mensekresikan IL17 dan IL22. IL17 akan membantu mensekresikan IgA yang berada di lamina propria menuju lumen usus dengan memanfaatkan *polymeric Immunoglobulin receptor* (pIgR) yang berada di epitel usus. Dengan penambahan komponen sekretori, IgA di lamina propria akan menjadi sekretori IgA (sIgA) dan disekresikan menuju lumen usus. Tidak hanya sIgA yang



bertugas mengeliminasi bakteri *Vibrio cholerae* di lumen usus, tapi juga ada peran β -defensin yang merupakan antimikrobal peptida natural juga disekresikan oleh sel epitel usus setelah distimulasi oleh IL-22 yang disekresikan Th17.

Selain melalui TD, pembentukan IgA juga bisa terbentuk secara TI. Antigen yang didapat oleh sel dendritik akan dipresentasikan langsung pada sel B IgM yang ada di lamina propria. Presentasi ini langsung akan menyebabkan *class-switching* sel B IgM menjadi sel B IgA. Sel B IgA ini akan menuju limfonodus, lien, darah dan akhirnya menuju mukosa usus untuk diubah menjadi sel plasma dan mensekresikan IgA. IgA nantinya juga diubah menjadi sIgA dan disekresikan di lumen usus.

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2.1 Kerangka Konsep

3.3. Deskripsi Kerangka Konsep

Bakteri *Vibrio cholerae* setelah masuk ke dalam tubuh manusia, akan melakukan infeksi di lumen usus. Sebelum proses infeksi dimulai,



perlu adanya perlekatan antara molekul adhesin dari bakteri *Vibrio cholerae* dengan sel epitel usus. Perlekatan ini menjadi penting sebelum tahap kolonisasi terjadi dan menyebabkan gejala klinis. Molekul adhesin dari bakteri *Vibrio cholerae* telah diidentifikasi sebelumnya dan ditemukan molekul adhesin memiliki berat molekul 37,8 kDa. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk membuktikan molekul adhesin 37,8 kDa ini dapat menjadi kandidat vaksin. Pemberian molekul adhesin 37,8 kDa diharapkan dapat dikenali oleh sistem imun mukosa sebagai antigen, dipresentasikan oleh sel dendritik ke sel T, baik itu adalah sel Th17 ataupun sel Treg. Diharapkan terbentuk sel T follicular helper (Tfh) yang dapat menginduksi terbentuknya sel B yang memproduksi IgA. Sel Tfh dan sel B IgA ini akan dibawa ke limfonodus, diteruskan ke lien, melewati ductus thoracicus dan darah menuju tempat asal vaksin masuk untuk memproduksi antibodi IgA yang nantinya akan disekresikan ke mukosa. Selain IgA terbentuk Th17 diharapkan dapat terinduksi untuk membentuk antimikrobal peptida. Sedangkan Treg dapat menjaga respon imun agar tidak terbentuk autoimunitas.

3.4. Hipotesis Penelitian

1. Pemberian molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* berefek pada peningkatan ekspresi sel T limfosit subset Th17 di lien mencit.
2. Pemberian molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* tidak berefek pada ekspresi sel T limfosit subset Treg di lien mencit.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Group Post Test Only Design*.

4.2. Jumlah Sampel

Perhitungan pengulangan sampel menggunakan rumus Federer (Federer, 1983) didapatkan hasil sebagai berikut:

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

t = jumlah perlakuan, r = jumlah pengulangan

pada penelitian ini didapatkan jumlah perlakuan (t) = 2, sehingga

jumlah pengulangan adalah :

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

$$2r - 2 \geq 15$$

$$2r \geq 17$$

$$r \geq 8,5$$

Untuk setiap perlakuan, dilakukan 2 kali pengulangan sehingga total sampel yang dibutuhkan adalah 9 ekor mencit.



Tabel 4.2.1. Tabel Kelompok Perlakuan

Kelompok	N	Induksi dan Perlakuan
Kontrol (K)	9	Tidak diberi molekul adhesin 37,8 kDa <i>Vibrio cholerae</i>
Pemberian Molekul Adhesin <i>Vibrio</i> (MAV)	9	Diberikan molekul adhesin 37,8 kDa <i>Vibrio cholerae</i> + CTB (ajuvan)

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian molekul adhesin *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa.

4.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah ekspresi sel T limfosit subset Th17 dan sel Treg di lien mencit.

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Animal Lab, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Laboratorium Mikrobiologi FKUB, Laboratorium Biomedik FKUB dan Laboratorium Farmako FKUB. Waktu penelitian dilaksanakan mulai sekitar bulan Mei sampai dengan Agustus 2017.

4.5. Definisi Operasional

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



b. **Bakteri *Vibrio cholerae* O1:** Bakteri *Vibrio cholerae* yang digunakan merupakan kultur dari Reto Prawiro *et al.* (2011). Bakteri ini sebelumnya diperoleh dari pasien di Rumah Sakit Saiful Anwar Malang yang diisolasi dan dikultur di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

c. **Molekul Adhesin 37,8 kDa:** Protein subunit pili *Vibrio cholerae* O1 dengan berat molekul 37,8 kDa yang diperoleh setelah proses kultur, pemotongan pili dengan *bacteria pili cutter*, dan berat molekulnya sudah dipastikan dengan SDS-Page.

d. **Pemberian Molekul Adhesin *Vibrio*:** Pemberian protein molekul adhesin 37,8 kDa sejumlah 80 µg dalam 1,5 ml PBS dan CTB 0,230 mg dalam 1,5 ml PBS yang diberikan ke mencit per oral dengan sonde pada hari ke 7, 14, 21, dan 28.

e. **Sel Th17:** Sel T limfosit yang diisolasi dari lien dan diukur dengan flowsitometri dengan mengekspresikan CD4 dan IL-17 lewat *intracellular staining*.

f. **Sel Treg/ T regulator:** Sel T limfosit yang diisolasi dari lien dan diukur dengan flowsitometri dengan mengekspresikan CD25 dan Foxp3 lewat *nuclear staining*.

4.6. Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian

1. Alat dan Bahan Kultur Bakteri *Vibrio cholerae*

Bahan yang digunakan adalah medium Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar, medium TCG yang terdiri atas 0,02% thioprolin, 0,3% NaHCO₃, 0,1% monosodium I-



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),

2. Alat dan Bahan Isolasi Protein Pili

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk isolasi protein pili

adalah botol roux, medium TCG, pili cutter, *tri chlor acetic acid*

(TCA), sentrifugator, PBS, tabung wadah pili, vortex, dan

refrigerator 4°C.

3. Alat dan Bahan Deteksi Molekul Adhesin Subunit Pili 37,8 kDa

Vibrio cholerae dengan metode SDS Page

Alat dan bahan yang diperlukan adalah mikropipet, DD H₂O,

Acrylamide/Bis, Gel Buffer, 10% w/v SDS, APS, TEMED, Gel

cassette, Chamber, *Running buffer (Coomassie Blue)*, RBS

(*Reducing sampel buffer*), Pemanas, Marker protein, Shaker

inkubator, *Destaining buffer* dan hasil isolasi pili.

4. Alat dan Bahan Elektroelusi dan Dialisis

Alat dan bahan yang diperlukan ialah cawan petri, kantong

selofan, chamber elektroelusi, power supply, stirrer,

sentrifugator, beaker glass, tabung eppendorf, nanodrop,

pendingin, 5% Na₂CO₃, ddH₂O, EDTA, akuades steril, running

buffer, PBS, ethanol absolut, comassie blue, destaining, tris-Cl,

dan gel yang sudah dipotong pada berat molekul 37,8 kDa.

5. Alat dan Bahan Konjugasi Ajuvan

Alat dan bahan yang dibutuhkan adalah mikropipet, tabung

eppendorf, stirrer, inkubator, lemari pendingin, PBS, 2%



glutaraldehyde, Glycine pH 7,2, Protein subunit pili 37,8 kDa dan *Cholera toxin B* (CtxB).

6. Alat dan Bahan Pembedahan Mencit

Alat dan bahan yang diperlukan adalah gunting bedah 2, pinset 2, jarum pentul 2 set, stereofom 2, penggaris, kertas label, termos es, kapas, wadah plastik + tutup 25 buah, spuit insulin 1 ml 30 buah, vacuotainer 25 buah, kloroform 20 ml, formalin 10% 200 ml, alkohol.

7. Isolasi Limfosit dari Lien Mencit

Alat yang digunakan adalah cawan petri, spuit 10 cc, vortex, swing sentrifuse, tabung sentrifus 1,5 ml, dan *Cell Strainer*.

Bahan yang digunakan adalah *Phosphat Buffer Saline* (PBS), *RBC lysing buffer* dan *Cell Staining Buffer*.

8. Alat dan Bahan Pengukuran Th17 dengan Flowsitometri

Alat yang digunakan adalah tabung sentrifus 15 ml, micropipette, *swing centrifugated*, tabung sentrifus 1,5 ml, sentrifuge dingin, *micropipette*, kuvet flowsitometri. Bahan yang digunakan adalah *Phosphat Buffer Saline* (PBS), antibodi *sel surface marker* CD4, larutan sel staining buffer (2% FBS dalam PBS).

9. Alat dan Bahan Pengukuran Treg dengan Flowsitometri

Alat yang digunakan vortex, flowcytometer. Bahan yang digunakan *Cell Staining Buffer*, residual buffer, antibodi FITC anti-mouse CD25, FOXP3 Fix/Perm buffer, PBS, antibodi fluorochrome conjugated anti-FOXP3.



4.7. Prosedur Penelitian/ Pengumpulan Data

4.7.1. Prosedur Kultur Bakteri *Vibrio cholerae* (Ehara et al., 1991)

Medium Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar digunakan sebagai media selektif. Sedangkan medium TCG digunakan untuk meningkatkan produksi dari pili *Vibrio cholerae*. Medium TCG terdiri dari 0,02% thioproline, 0,3% NaHCO₃, 0,1% monosodium l-glutamat, 1% 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). Lama inkubasi kultur dalam medium TCG adalah selama 2 x 24 jam.

4.7.2. Prosedur Isolasi Protein Pili (Reto Prawiro. et al, 2011)

- Kultur bakteri dikumpulkan dari medium TCG sebanyak 20 botol roux.
- Bakteri yang dikumpulkan dari 20 botol roux medium TCG diresuspensi dengan TCA hingga mencapai konsentrasi 3%.
- Suspensi dikocok menggunakan vortex selama 30 detik dan didiamkan dalam suhu 4°C selama 1 jam.
- Pelet bakteri diambil dari hasil sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.
- Tiga gram dari pelet diresuspensi menggunakan 6 ml PBS pH 7,4 .
- Hasil resuspensi tersebut kemudian ditempatkan pada *bacteria pili cutter* selama 1 menit dengan kecepatan 10.000 rpm.
- Supernatan yang mengandung protein pili dipisah dengan pelet dan disimpan di suhu 4°C.



- h. Pelet yang tersisa dilanjutkan series pemotongan kedua dengan pili cutter pada kecepatan 5000 rpm selama 30 detik dalam suhu 4°C, tahap ini terus dilanjutkan hingga supernatan berwarna jernih.

4.7.3. Prosedur SDS Page (Laemmli, 1970)

- a. Dilakukan pembuatan *stacking gel* dan *separating gel*.
- b. Konsentrasi dari gel ditentukan terlebih dahulu. Setelah itu *separating monomer solution* ditambahkan ke dalam *gel cassette*.
- c. Gel ditunggu hingga mengeras dan membentuk lapisan gel bening.
- d. Sedangkan untuk *stacking monomer solution* setelah dipersiapkan dalam konsentrasi tertentu dituangkan pada *gel cassette* yang telah berisi *separating monomer solution*. ddH₂O ditambahkan untuk mengukur ulang volume.
- e. Cetakan *comb* dipasang ke dalam gel casting dan dimasukkan ke dalam *chamber*.
- f. Protein isolasi pili yang sudah diambil tadi dipersiapkan. Protein dicampur dengan RSB (*Reducing Sample Buffer*) dengan perbandingan 1:1. Campuran ini dipanaskan selama kurang lebih 5 menit untuk mendenaturasi protein.
- g. Marker protein sebanyak 10 µl dimasukkan ke dalam *well*.
Dilanjutkan dengan memasukkan protein hasil isolasi pili ke dalam *well* yang telah tercetak dengan ukuran ±15-20 µl/*well*.
- h. Gel di-*running* gel selama 35 menit dengan tegangan 200v, *constant voltage*. Pergerakan marker protein dan *tracking dye* (berwarna biru) diamati.



i. Proses running dihentikan jika *tracking dye* sudah mencapai garis hijau dari gel cassette.

j. *Gel cassette* dilepaskan secara perlahan dan dimasukkan ke dalam *staining box*.

k. *Staining buffer* dituangkan hingga gel terendam sempurna. Gel diinkubasi selama ± 4 jam-semalam dalam shaker inkubator.

l. Larutan *staining buffer* lalu diganti dengan larutan *de-staining buffer* dan dilanjutkan inkubasi dalam shaker inkubator hingga pita-pita protein tampak jelas.

m. Gel diamati pada Doc EZ Imager untuk mengetahui berat molekul dari masing – masing band yang terbentuk pada gel.

4.7.4. Prosedur Elektroelusi dan Dialisis (Waterborg et al., 1994)

a. Pita protein yang diinginkan pada 37,8 kDa dipotong dari gel elektroforesis.

b. Pita dimasukkan ke dalam petri yang berisi *running buffer* dan dimasukkan dalam kantong selofan sebanyak 2 potong.

c. Kantong selofan dibilas dengan *running buffer* dan dijepit salah satu ujungnya. *Running buffer* lalu dimasukkan untuk menggenangi gel pita protein 37,8 kDa dengan cara melewati salah satu ujung yang terbuka. Kantong selofan dijepit kembali di ujung yang terbuka.

d. Selofan dimasukkan ke dalam *chamber* elektroelusi yang telah diisi oleh *running buffer*.

e. Mesin kemudian dinyalakan selama 60 menit dengan tegangan 120

v.



f. Selofan diangkat dan dilanjutkan dengan dialisis. Dialisis dilakukan dalam gelas beaker yang diisi dengan PBS pH 7,4. Selofan kemudian dimasukkan dan di *stirrer* dalam suhu 4°C selama 24 jam. Selofan diambil terlebih dahulu sebelum dilanjutkan ke proses selanjutnya.

g. Protein dimasukkan dalam tabung eppendorf dan ditambahkan ethanol absolut dengan perbandingan 1:1. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan endapan dikeringkan.

h. Protein kemudian diresuspensi dengan PBS dan dilakukan uji nanodrop untuk mengetahui kadarnya dalam setiap ml.

4.7.5. Prosedur Konjugasi Ajuvan (Reto Prawiro et al., 2011)

a. Protein subunit poli dengan konsentrasi 8 mg dalam PBS 1,5 ml dicampur dengan CTB dengan konsentrasi 0,230 mg dalam 1,5 ml PBS

b. Campuran tersebut lalu ditambahkan 3 ml 2% glutaraldehyde.

c. Kesemuanya diaduk dalam lemari asam dalam suhu 4°C dan diinkubasi selama 1 jam.

d. Dilanjutkan dengan penambahan glisin pH 7,2 dengan volume 2,24 ml sambil diaduk perlahan dan diinkubasi selama 1 jam.

e. Tahap akhir dilakukan dialisa dengan PBS sebanyak 4 kali selama semalam dan produk disimpan dalam suhu -20°C

4.7.6. Proses Pemberian Molekul Adhesin *Vibrio* pada Mencit (Reto Prawiro et al., 2011)



Mencit yang telah diaklimatisasi diberikan molekul adhesin *Vibrio cholerae* secara oral dengan konsentrasi 250 µg. Pemberian dilakukan secara berkala sebanyak 4 kali yakni sejak hari ke 7, 14, 21, dan 28 secara oral menggunakan sonde.

4.7.7. Prosedur Pembedahan Mencit (Greenfield, 2017)

- a. Semua mencit dibedah setelah seluruh dosis telah diberikan.
- b. Mencit dianestesi terlebih dahulu per inhalasi dengan kloroform di wadah 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. Posisi perut mencit berhadapan dengan operator, kulit yang berada di bagian anterior dari permulaan uretra mencit dipotong perlahan dengan gunting mengikuti garis tengah tubuh mencit hingga mencapai daerah dagu. Pemotongan dilakukan dengan hati hati agar tidak merobek daerah pelapis dinding peritoneum.
- e. Insisi dilakukan perlahan untuk mencapai lien sebagai sumber populasi limfosit T.
- f. Lien yang berada di daerah abdomen, di bawah lambung dan intestinum diambil menggunakan forsep dan diletakkan pada petri steril yang mengandung *autoMACS* sebanyak 5 ml. Pengambilan dilakukan dengan memindahkan lambung dan intestinum dengan memisahkannya dari pankreas, sehingga akses terhadap lien menjadi lebih mudah.

4.7.8. Isolasi Sel Limfosit dari Lien (Stemcell Technologies inc, 2012)



- a. Lien diletakkan pada wadah yang steril.
- b. Dilakukan persiapan pembuatan suspensi sel dengan menumbuk lien menggunakan ujung tumpul dari spuit 10 ml.
- c. Lien yang hancur diletakkan di *Cell Strainer* yang sudah terhubung dengan tabung sentrifugasi.
- d. Penyaringan dari lien dilakukan menggunakan *Cell Strainer*. Gumpalan dan debris disingkirkan agar terbentuk pellet sel.
- e. Pellet sel diambil 1 ml untuk dilakukan sentrifugasi 2500 rotasi per menit dalam suhu 4°C selama 3 menit dalam tabung sentrifugasi 1,5 ml.
- f. Setelah supernatan dibuang, *RBC lysing buffer* dimasukkan untuk menghilangkan sel eritrosit.
- g. Pellet dihomogenisasikan dengan vorteks, lalu dilakukan sentrifugasi kembali dengan kecepatan, suhu dan durasi yang sama.
- h. Setelah supernatan dibuang, *Cell Staining Buffer* ditambahkan dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan, suhu dan durasi yang sama.
- i. Langkah tersebut diulang dua kali berturut – turut.
- j. Pellet sel sudah siap di-*staining*. Pellet sel disimpan di lemari pendingin ketika tidak sedang digunakan

4.7.9. Prosedur staining antibodi sel *surface marker* CD4+ (Bio-Rad Protocols, 2016)

- a. Pelet sel dicuci dengan sel *staining buffer* 1 kali.



b. Kemudian disentrifus pada kecepatan 2500 rpm, 3 menit, suhu 4 derajat.

c. Supernatan dibuang dan Pelet sel yang terbentuk siap untuk distaining dengan antibodi sel surface marker CD4+ (5 uL Ab per sampel yang telah diencerkan 1:10 dalam sel staining buffer).

d. Antibodi yang telah diencerkan kemudian diambil sebanyak 50 µl dan dicampurkan dengan pelet sel dan dihomogenkan.

e. Pelet sel yang telah diberi antibodi diinkubasi selama 20 menit dalam gelap di suhu ruang.

f. Setelah inkubasi ditambahkan 500 uL sel staining buffer dan dihomogenkan kembali.

g. Selanjutnya siap dilakukan intraselular staining untuk pemeriksaan Th17 ataupun Treg.

4.7.10. Prosedur Pengukuran sel Th17 dengan flowsitometri (Best Protocols, 2010)

a. Pelet sel yang telah diinkubasi dengan antibodi sel *surface marker* kemudian dicuci dengan menambahkan 500 µl staining buffer, disentrifuge pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.

b. Supernatan dibuang, kemudian pelet yang terbentuk dicuci dengan 500 µl *Fixation and Permeabilization Solution*, dihomogenkan dan disentrifuge pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.



- c. Supernatan dibuang, kemudian pelet difiksasi dengan menambahkan 500 μ l *Fixation and Permeabilization Solution* lalu diinkubasi selama 20 menit dalam gelap di suhu ruang.
- d. Setelah inkubasi selesai, larutan disentrifugasi pada suhu 4^oC dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
- e. Supernatan dibuang, pelet sel yang terbentuk dicuci dengan larutan 1X *Perm/Wash Buffer*, disentrifuge pada suhu 4^oC dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
- f. Supernatan dibuang, kemudian pelet sel siap untuk distaining dengan antibodi intraseluler IL-17A (5 uL Ab per sampel yang telah diencerkan 1:10 dalam 1X *Perm/Wash Buffer*).
- g. Masing-masing larutan di staining dengan 50 μ l antibodi IL-17 A yang telah diencerkan, dipipeting hingga homogen, kemudian diinkubasi dalam gelap di suhu ruang selama 20 menit.
- h. Setelah diinkubasi dicuci dengan menambahkan 500 μ l 1X *Perm/Wash Buffer* dan disentrifuge pada suhu 4^oC dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
- i. Supernatan dibuang dan ditambahkan sel staining buffer, dihomogenkan
- j. Kemudian dipindahkan ke kuvet baca dan siap untuk dibaca dengan Flowsitometri
- k. Data yang keluar didokumentasikan.
- l. Melakukan gating pada populasi sel.
- m. Dari populasi sel hidup, gate pada populasi CD4+CD8-
- n. Dari populasi CD4+CD8-, gate pada populasi IL-17A+.



4.7.11. Prosedur Pengukuran sel Treg dengan flowsitometri (BestProtocols, 2010)

- a. Pelet sel yang telah diinkubasi dengan antibodi sel surface marker kemudian dicuci dengan menambahkan 500 μ l sel staining buffer, disentrifuge pada suhu 40C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
- b. Supernatan dibuang, kemudian pelet yang terbentuk dicuci dengan 500 μ l larutan FoxP3 fix/perm buffer, dihomogenkan dan disentrifuge pada suhu 40C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
- c. Supernatan dibuang, kemudian pelet difiksasi dengan menambahkan 500 μ l larutan FoxP3 fix/perm buffer lalu diinkubasi selama 20 menit dalam gelap di suhu ruang.
- d. Setelah inkubasi selesai, larutan disentrifuge pada suhu 40C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
- e. Pelet sel yang telah diinkubasi dalam larutan FoxP3 fix/perm buffer kemudian dicuci dengan menambahkan 500 μ l sel staining buffer, disentrifuge pada suhu 40C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
- f. Supernatan dibuang, pelet sel yang terbentuk dicuci dengan larutan FoxP3 *perm buffer*, disentrifugasi pada suhu 4^oC dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit. Larutan fox perm wash buffer tersedia dalam 10x konsentrasi, jadi apabila akan digunakan harus diencerkan terlebih dahulu menjadi 1x dengan PBS.



- g. Supernatan dibuang, kemudian pelet ditambahkan dengan 500 μ l FoxP3 perm buffer lalu diinkubasi selama 20 menit dalam gelap di suhu ruang.
- h. Setelah inkubasi selesai, larutan disentrifuge pada suhu 4^oC dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
- i. Supernatan dibuang, kemudian pelet sel siap untuk distaining dengan antibodi intraselluler (5 μ L Ab per sampel yang telah diencerkan 1:10 dalam FoxP3 Perm Buffer).
- j. Masing-masing larutan di staining dengan 50 μ l antibodi yang telah diencerkan, dipipeting hingga homogenkan, kemudian diinkubasi dalam gelap di suhu ruang selama 20 menit.
- k. Setelah diinkubasi dicuci dengan menambahkan 500 μ l larutan perm wash buffer dan disentrifuge pada suhu 4^oC dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
- l. Supernatan dibuang dan ditambahkan sel staining buffer, dihomogenkan.
- m. Kemudian dipindahkan ke kuvet baca dan siap untuk dibaca dengan Flowcytometri.
- n. Angka yang diperoleh lalu didokumentasikan.

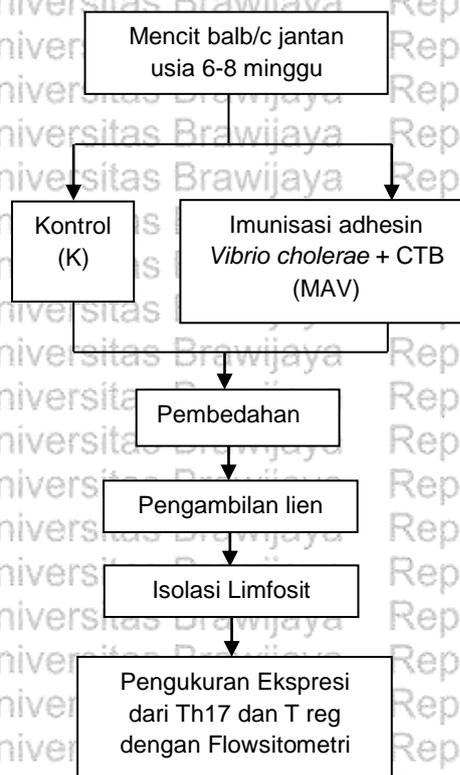
4.8. Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan analisis statistik dengan menggunakan SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versi

23. Data dianalisis dengan signifikansi $p < 0,05$. Analisis data yang dilakukan berupa normalitas data dengan menggunakan *Shapiro-wilk*,

data deskriptif dari masing – masing kelompok yang diberi molekul adhesin maupun yang tidak serta Th17 dan Treg, dan analisis uji beda dengan menggunakan independen T test bila pada uji normalitas didapatkan data terdistribusi normal ataupun *Mann-Whitney Test* bila data tidak terdistribusi normal.

4.9. Alur Penelitian



Gambar 4.9.1 Alur Penelitian

Mencit yang digunakan adalah mencit balb/c jantan berusia 6-8 minggu. Mencit ini lalu dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol (K) dimana mencit kelompok ini tidak mendapat perlakuan apapun, sedangkan kelompok lainnya adalah kelompok yang diberikan molekul adhesin dari bakteri *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa beserta ajuvannya dengan total volume 0,3 ml (MAV). Setelah diberikan



molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* pada hari ke 7, 14, 21 dan 28, mencit dibedah dan diambil liennya. Proses lalu dilanjutkan dengan melakukan isolasi limfosit T dan diukur ekspresi dari sel Th17 dan Treg dengan menggunakan flowsitometri.



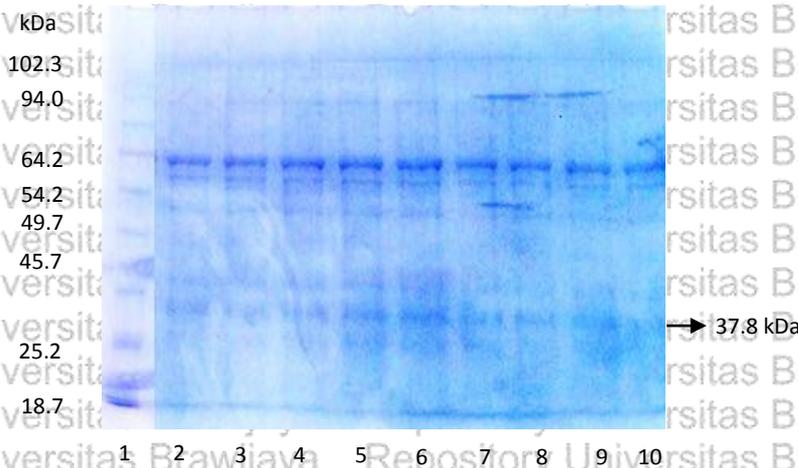
BAB 5

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana respon imun dari Th17 dan Treg yang terbentuk setelah dilakukan pemberian molekul adhesin 37,8 kDa dari *Vibrio cholerae*. Penelitian dilakukan selama 4 bulan dengan jumlah total mencit yang digunakan pada penelitian ini adalah 17 ekor. Setelah aklimatisasi, mencit diberikan perlakuan terutama pada kelompok molekul adhesin vibrio (MAV) yang diberikan molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* pada hari ke 7, 14, 21, dan 28. Selama proses perlakuan, mencit diberikan makan dan minum, kebersihan kandang dijaga serta tingkah laku mencit diperhatikan. Pada hari ke 35, mencit dibedah dan dilakukan pengambilan sampel sesuai variabel. Variabel yang diambil berupa sel Th17 dan Treg diukur dari lien dengan menggunakan flowsitometri.

5.1. Identifikasi Sub Unit Pili *Vibrio cholerae*

Untuk mendapatkan molekul adhesin dari *Vibrio cholerae*, bakteri *Vibrio cholerae* dikultur dengan medium selektif TCBS dan medium TCG untuk meningkatkan jumlah pili *Vibrio cholerae*. Pili lalu dipotong dengan *bacteria pili cutter*. Setelah dilakukan pemotongan dari pili dari bakteri *Vibrio cholerae*, SDS-Page elektroforesis dilakukan untuk memastikan apakah benar pili yang terambil memiliki hasil bobot molekul yang sama yaitu 37,8 kDa sesuai dengan penelitian sebelumnya (Sumarno, 2003).

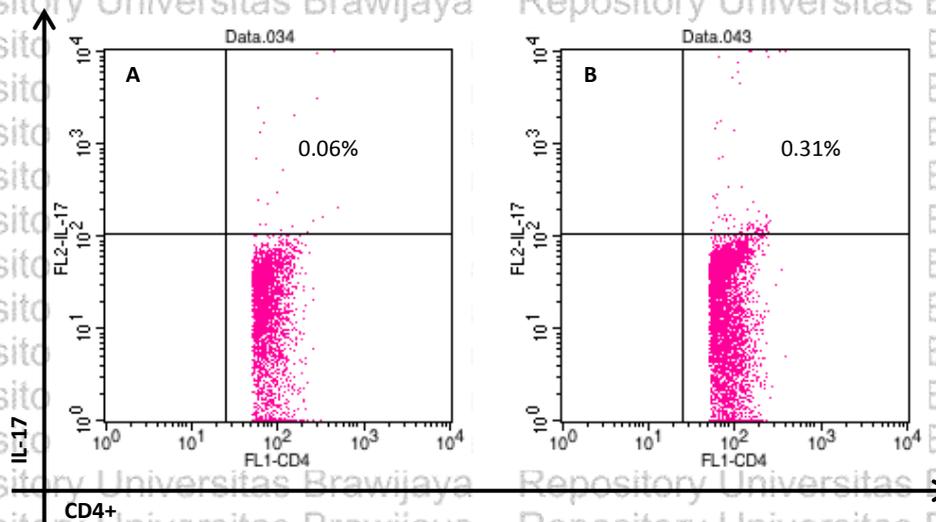


Gambar 5.1.1 Hasil SDS Page pemotongan pili bakteri *Vibrio cholerae*. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan 5% stacking gel dan 15% separating gel. Didapatkan gambaran pita pada berat molekul 37,8 kDa bakteri *Vibrio cholerae*. 1: Marker; 2-10: Hasil pemotongan pili bakteri *Vibrio cholerae*.

Hasil dari elektroforesis Gambar 5.1.1 menunjukkan setelah dilakukan pemotongan pili *Vibrio cholerae* dengan *pili cutter* selain didapatkan protein dengan berat molekul 37,8 kDa, juga didapatkan protein dengan berat 64,2 kDa. Protein ini belum pernah diidentifikasi sebelumnya. Protein dengan berat 37,8 kDa selanjutnya dipotong lalu diproses dan dijadikan salah satu bahan yang diberikan pada mencit.



5.2. Hasil Penghitungan Th17



Gambar 5.2.1 Gambaran Representatif Dot Plot Ekspresi Sel T limfosit subset Th17.

A. Kelompok Kontrol; B: Kelompok MAV

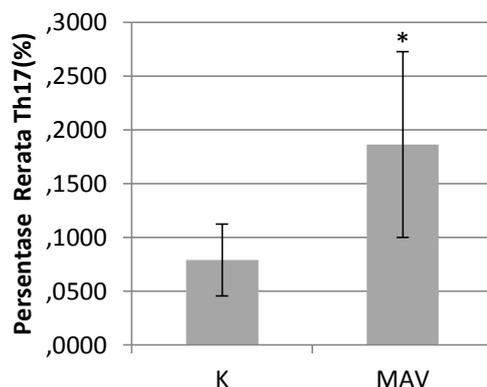
Gambar 5.2.1 merupakan gambaran representatif dari ekspresi Th17 pada lien mencit. Th17 pada penelitian ini ditandai dengan ekspresi CD4+ dan IL-17 pada intracelular staining. Pada gambar tersebut ekspresi Th17 ditandai pada kuadran kanan atas.

Tabel 5.2.1 Data Deskriptif Sel T Limfosit Subset Th17

	Mean	Standar Deviation	Min	Max
K	0,0789	,03333	0,03	0,14
MAV	0,1863	,08634	0,07	0,31



T helper 17



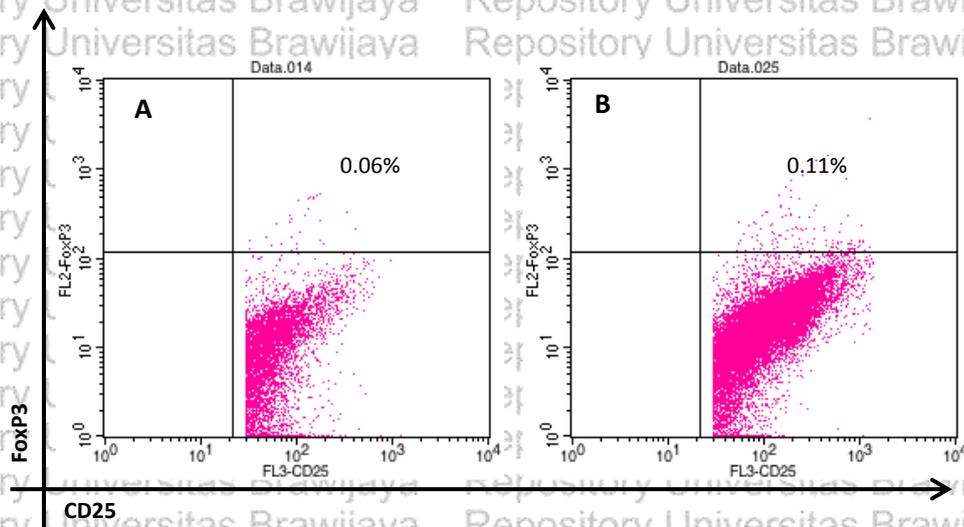
Gambar 5.2.2 Pengukuran ekspresi sel T limfosit subset Th17 pada kelompok kontrol (K) dan Molekul Adhesin Vibrio (MAV). Didapatkan ekspresi Th17 dari kelompok yang diberikan molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* lebih tinggi secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. K: Kontrol; MAV: molekul adhesin Vibrio. * mengindikasikan signifikansi.

Data Th17 yang telah direkam lalu dilakukan analisis. Dari hasilnya didapatkan data tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$). Data lalu dilakukan transformasi agar data terdistribusi normal ($p > 0,05$). Dari data tersebut didapatkan ekspresi Th17 terendah adalah 0,03% sedangkan tertinggi adalah 0,31%. Untuk menentukan perbedaan diantara kedua kelompok perlakuan, dilakukan analisis data dengan menggunakan *Independent T-test* dan didapatkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok MAV ($p < 0,05$).

Pada penelitian ini didapatkan rerata ekspresi Th17 pada kelompok kontrol jauh lebih rendah ($0,078 \pm 0,03\%$) secara signifikan dengan nilai kelompok yang diberikan molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* ($0,1863 \pm 0,08\%$).



5.3 Hasil Penghitungan Treg



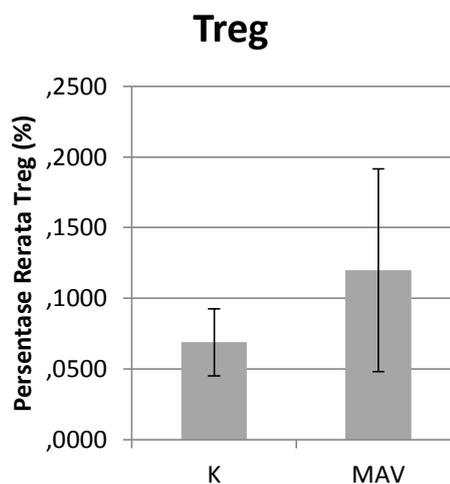
Gambar 5.3.1 Gambar Representatif Dot Plot Ekspresi sel T limfosit subset Treg di Lien. A: Kelompok Kontrol; B: kelompok MAV

Gambar 5.3.1 merupakan gambaran representatif dari ekspresi Treg pada lien mencit. Marker yang digunakan untuk mengevaluasi Treg adalah CD25 *surface antibody* dan Foxp3 *nuclear staining*. Pada gambar tersebut ekspresi Treg berada di kuadran kanan atas.

Data Treg yang diperoleh lalu dianalisis secara deskriptif dan dinilai distribusinya dengan menggunakan SPSS. Dari data deskriptif pada Tabel 5.3.1 didapatkan persentase Treg terkecil adalah 0,03% dan tertinggi adalah 0,23%. Selain itu juga diketahui bahwa kelompok MAV memiliki rerata yang cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Analisis distribusi dengan *Shapiro-wilk* menunjukkan data tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$). Data lalu dilakukan transformasi agar data terdistribusi normal ($p < 0,05$).

Tabel 5.3.1 Data Deskriptif Sel T Limfosit Subset Treg

	Mean	Standar Deviation	Min	Max
K	0,0689	0,02369	0,04	0,11
MAV	0,1200	0,07171	0,03	0,23



Gambar 5.3.2 Pengukuran ekspresi sel T subset Treg pada kelompok Kontrol (K) dan Molekul Adhesin Vibrio (MAV). Tidak terdapat perbedaan signifikan dari ekspresi Treg pada kelompok yang diberikan molekul adhesin vibrio dan kelompok kontrol. K: Kontrol; MAV: Molekul Adhesin Vibrio. * mengindikasikan signifikansi

Rerata ekspresi Treg pada kelompok kontrol adalah $0,068 \pm 0,02\%$.

Tes T independen juga dilakukan pada data Treg untuk menilai apakah ada perbedaan antara kelompok kontrol dengan MAV. Hasilnya meskipun

nilai Treg kelompok MAV lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol hingga 76,4%, namun tidak didapatkan perbedaan ekspresi Treg

yang signifikan dibanding kelompok perlakuan yang pemberian molekul adhesin dengan berat molekul 37,8 kDa ($p > 0,05$).



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1. Efek Pemberian Molekul Adhesin 37,8 kDa terhadap ekspresi sel T limfosit subset Th17

Th17 sebagai subset sel T yang dikenal sebagai marker inflamasi yang memproduksi IL-17. Th17 berperan untuk memproteksi diri dari mikroba patogen. Adanya TGF- β dan IL-6 menyebabkan terdiferensiasinya sel T CD4 naive menjadi sel Th17 yang memiliki ROR γ t sebagai faktor transkripsi regulator utama. Ekspresi dari ROR γ t dan IL-17 inilah yang digunakan menjadi penanda dari sel Th17 (Tesmer et al., 2008).

Proses pemberian molekul adhesin 37,8 kDa adalah proses pemaparan antigen yang diharapkan dapat menginduksi respon imun yang cukup untuk mencetuskan terbentuknya imun memori tanpa menyebabkan progresi perjalanan penyakit dari patogen. Bila kondisi tersebut terpenuhi, maka molekul adhesin 37,8 kDa dapat dimanfaatkan sebagai kandidat vaksin. Molekul adhesin sebagai antigen akan masuk dan dikenali oleh sel dendritik, dipresentasikan pada sel T sehingga sel T teraktivasi, dan menuju limfonodus, lien dan darah sebelum akhirnya kembali ke tempat asal tempat paparan antigen. Lien menjadi organ tempat berkumpulnya segala sel T yang teraktivasi di seluruh bagian usus sehingga dalam penelitian ini mengevaluasi sel T limfosit secara keseluruhan dilakukan dengan melakukan isolasi dari lien mencit (Tezuka et al., 2019).



Pada penelitian ini didapatkan bahwa kelompok yang diberikan molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* (MAV) memiliki nilai Th17 yang lebih tinggi secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol yang tidak diberikan apapun ($p < 0,05$). Ini menunjukkan bahwa MAV dapat meningkatkan respon imun dari host. Kondisi meningkatnya sel T limfosit subset Th17 di lien juga dapat ditemukan pada proses vaksinasi lainnya, seperti vaksin tetanus toksoid, vaksinasi UreB untuk *Helicobacter pylori*, Pertussis, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Streptococcus pneumoniae* (Aulja *et al.*, 2008; Moffitt *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; Wilson *et al.*, 2015; Perez-Lopez *et al.*, 2016). Selain itu pemberian ajuvan CTB juga dapat meningkatkan diferensiasi sel Th17 (Kang *et al.*, 2016).

Diharapkan proses pemberian molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* dapat menjadi vaksin, dimana saat MAV masuk, akan dapat menginisiasi respon imun layaknya proses infeksi. Berbagai proses infeksi menunjukkan peningkatan ekspresi Th17 di tahap awal, seperti pada *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteriodes fragilis*, *Candida albicans*, *Helicobacter pylori* dan *Streptococcus pneumoniae* (Aulja *et al.*, 2008; Morrison *et al.*, 2011). Proses ini juga terjadi pada infeksi *Vibrio cholerae* yang menyebabkan kolera (Kuchta *et al.*, 2011).

Th17 akan merekrut netrofil dan makrofag untuk menginisiasi respon imun agar sel Th1 bekerja melawan patogen (Lin *et al.*, 2010).

Th17 akan mensekresikan IL17 dan IL22. IL17 akan meningkatkan respon imun proinflamasi. IL17 dan IL22 juga akan meningkatkan produksi protein antimikroba dan defensin oleh sel epitel (Perez-Lopez *et al.*, 2016). Th17 menjadi salah satu sel T yang menerima presentasi dari



APC, yang nantinya akan mengaktifkan sel B untuk memproduksi IgA di lamina propria. IgA akan dibawa dari lamina propria menuju lumen menjadi sekretori IgA dimana sekretori IgA inilah yang menjadi harapan terbentuknya imunitas mukosa. Dalam rangkaian penelitian ini, selain Th17 dan Treg, kadar sekretori IgA dan β -defensin di sekret usus juga diukur. Hasilnya baik pada kelompok yang diberikan molekul adhesin vibrio ataupun kontrol didapatkan perbedaan kadar sekretori IgA maupun β -defensin yang signifikan lebih tinggi pada kelompok MAV daripada kelompok kontrol di sekret mukosa usus mencit (data tidak ditampilkan).

Tingginya Th17 membuktikan bahwa terdapat induksi terhadap respon imun bawaan. Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa Th17 juga meningkat pada vaksinasi: Hilangnya sel yang memproduksi IL-17 pada pemberian vaksin BCG *M. bovis* menunjukkan penurunan efek protektif dari vaksin (Romano *et al.*, 2006). Penelitian serupa juga menunjukkan kadar IL-17 meningkat setelah dilakukan booster dengan menggunakan vaksin BCG untuk tuberkulosis setelah sebelumnya dilakukan vaksinasi dengan menggunakan vaksin DNA vaxfectin.

Produksi IL-17 oleh sel T memori yang teraktivasi akan memobilisasi neutrofil dan berperan dalam inflamasi (Lin *et al.*, 2010). Pada vaksin tetanus toksoid, Th17 yang terbentuk tidak hanya meningkat namun dapat bertahan lama (Perez-Lopez *et al.*, 2016). Studi lainnya menunjukkan Th17 yang spesifik terhadap paparan antigen vaksin subunit *Mycobacterium tuberculosis*, dapat bertahan di limfonodus dan jaringan paru, setidaknya 2 tahun setelah proses vaksinasi (Lindenstrøm



et al., 2012). Ini menunjukkan bahwa Th17 tidak hanya bekerja pada fase akut, tapi juga berperan dalam imunitas jangka lama.

Beberapa studi telah mengevaluasi fenotip dari Th17 yang terbentuk setelah dilakukan vaksinasi. Pada vaksinasi *Helicobacter pylori* dengan menggunakan UreB, dilakukan adoptif transfer sel Th17 yang spesifik terhadap epitop dari *Helicobacter pylori*. Hasilnya menunjukkan bahwa tidak ada penurunan kolonisasi dari bakteri *Helicobacter pylori*, berbeda dengan adoptif transfer sel Th1 yang dapat menurunkan kolonisasi bakteri ini secara signifikan. Hal ini dikarenakan sel Th17 tidak mengekspresikan reseptor kemokin dan homing, yaitu L-selectin dan $\alpha\beta 7$ integrin (Li et al., 2015). Pada studi lain, proses vaksinasi terbukti dapat membentuk sel Th17 memori. Sel Th17 ini terbukti memiliki kapasitas proliferasi yang tinggi, ditandai dengan ekspresi Ki67 yang tinggi setelah diberikan paparan kembali pada mencit yang sebelumnya telah dilakukan vaksinasi (Lindenstrøm et al., 2012).

Namun ada penelitian yang menunjukkan Th17 menurun setelah vaksinasi. Sebuah studi oleh Lv et al., tahun 2014 menunjukkan pemberian kandidat vaksin epitop untuk *Helicobacter pylori* menunjukkan penurunan dari produksi IL-17, yang dapat diartikan terdapat penurunan respon dari sel Th17. Dalam penelitian tersebut, penurunan respon dari Th17 dianggap merupakan hambatan dari terbentuknya sel Th17 dan proses ini adalah proses yang diharapkan pada infeksi *Helicobacter pylori*.



6.2. Efek Pemberian Molekul Adhesin 37,8 kDa terhadap ekspresi sel T limfosit subset Treg

T regulator (Treg) awalnya dikenali dengan ekspresi dari CD25. Namun seiring berjalannya waktu, faktor transkripsi Foxp3 diketahui lebih berperan dalam peran Treg yang memiliki fenotip sebagai immunosupresif. Pada manusia, Treg tidak hanya menghambat respon imun berlebihan dari tubuh, namun juga membatasi respon efektor yang dibutuhkan untuk mengeliminasi bakteri patogen (Ndure *et al.*, 2014).

Treg merupakan immunoregulator yang penting untuk mencegah terjadinya proses autoimun. Treg sendiri dibagi berdasarkan asal terbentuknya, menjadi nTreg yang berasal dari timus dan iTreg yang terbentuk dari perifer. Dalam penelitian ini, yang disebut Treg adalah iTreg yang dibentuk sebagai respon dari paparan molekul adhesi. Rangsangan TGF- β akan menyebabkan diferensiasi dari sel T naive menjadi Treg. Selain CD4+, Treg juga mengekspresikan reseptor CD25+. Faktor transkripsi Foxp3 adalah bagian esensial dari T regulator (Curotto de Lafaille *et al.*, 2009).

Dalam penelitian ini meskipun didapatkan peningkatan presentase dari sel Treg, namun secara statistik tidak didapatkan perbedaan yang signifikan bila dibandingkan antara kedua kelompok. Ini juga selaras dengan penelitian lain yang menilai Treg setelah paparan vaksin Influenza, Hepatitis B dan Yellow Fever. Hal ini karena pemberian vaksin subunit hanya memiliki efek jumlah yang minimal terhadap jumlah Treg, bahkan setelah diberikan ajuvan (De Wolf *et al.*, 2017).



Pada proses vaksinasi, proses yang diharapkan terjadi setelah paparan antigen yang masuk adalah tercetusnya respon imun layaknya respon imun saat terjadi infeksi. Contohnya adalah peningkatan Treg yang spesifik pada faktor virulensinya pada pasien yang terinfeksi Tuberkulosis (Jackson-Sillah *et al.*, 2013). Pemaparan kembali mencit yang telah divaksinasi dengan antigennya juga menunjukkan adanya peningkatan jumlah iTreg secara cepat pada paru mencit (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009).

Meskipun De Wolf *et al.* (2017) telah menunjukkan bahwa penggunaan ajuvan menunjukkan tidak ada perbedaan ekspresi Treg, namun beberapa penelitian justru menunjukkan hasil yang berbeda. Penggunaan CTB menunjukkan dapat meningkatkan jumlah Treg. CTB akan berikatan dengan GM1 ganglioside yang memicu diferensiasi dari Treg adaptif ataupun natural yang memproduksi IL-10 dan menekan respon Th1, Th2 dan Th17 menyebabkan toleransi dari antigen yg dimasukkan secara bersamaan (Kuchta *et al.*, 2011). CT sebagai ajuvan juga ditemukan memiliki efek untuk mencegah bahkan mengembalikan toleransi dari mukosa oral (Mestecky *et al.*, 2007). Namun berbeda dengan pemberian OVA. Pemberian vaksinasi dengan antigen OVA yang dikongjugasikan dengan CTB sebagai ajuvan menyebabkan peningkatan nilai Treg CD25⁺ 2 kali lipat dibandingkan penggunaan OVA saja. Treg yang meningkat ini juga ditemukan memiliki fungsi supresor (Stratmann, 2015).

Sebuah penelitian menggunakan vaksin hepatitis B subunit menunjukkan adanya penurunan dari *activated/* Treg efektor (CD4⁺



CD45RA⁺ Foxp3⁺⁺) dan resting Treg (CD4⁺ CD45RA⁺ Foxp3⁺). Vaksin subunit hepatitis B ini juga meningkatkan ekspresi dari CD39 3 hari setelah dilakukan vaksinasi yang menandakan peran Treg sebagai efektor. Pemberian vaksinasi juga menunjukkan adanya peningkatan ekspresi dari CCR7 menandakan adanya migrasi dari sel Treg dari organ limfoid sekunder menuju darah (De Wolf *et al.*, 2017).

Mengesampingkan segala pengaruh vaksinasi terhadap Treg, Treg sendiri juga memiliki pengaruh terhadap vaksinasi. Pada kenyataannya Treg yang meningkat justru lebih sering dikaitkan dengan penurunan efektivitas vaksin, baik pada infeksi cacing maupun infeksi HIV (Gazzinelli-Guimaraes *et al.*, 2018). Peningkatan Treg juga ditemukan pada neonatus dan bayi yang menyebabkan imunogenisitas dari vaksin tuberkulosis, malaria dan HIV ikut menurun (Ndure *et al.*, 2014).

Peran Treg dalam vaksinasi lebih banyak dikenal sebagai tantangan terutama pada imunitas mukosa (Mestecky *et al.*, 2007; Berod *et al.*, 2012). Kemampuan Treg untuk membentuk toleransi dianggap mempersulit terbentuknya respon imun host untuk membentuk respon imun seluler yang kuat dan membentuk memori imunologis yang dapat bertahan lama.

Ide untuk melakukan deplesi dari Treg tercetus untuk meningkatkan respon imun dari vaksinasi. Namun beberapa studi yang melakukan deplesi Treg untuk meningkatkan respon imun adaptif, tidak selalu berakhir dengan luaran yang lebih baik. Ini menunjukkan regulasi dari Treg saat infeksi sangat kompleks dan sangat bergantung pada jenis patogen bahkan antigen yang ada. Ketimbang melakukan deplesi dari



Treg, pemilihan ajuvan yang tepat dianggap sebagai pilihan yang lebih rasional untuk mencegah ekspansi atau terinduksinya sel Treg (Berod *et al.*, 2012).

6.3. Keterbatasan Penelitian

Meski didapatkan hasil menunjukkan yang bermakna, namun dikarenakan tidak dilakukan perlakuan pemberian CTB atau ajuvan saja membuat evaluasi respon Th17 dan Treg yang terbentuk sulit dibedakan apakah dikarenakan pemberian CTB atau molekul adhesin. Sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membedakan respon imun disebabkan karena molekul adhesin 37,8 kDa atau ajuvannya yaitu *Cholera toxin B* dengan menggunakan molekul adhesin 37.8 kDa saja, dengan menggunakan CTB saja, dan dengan kombinasi dari keduanya.

Penelitian ini mampu menunjukkan efek dari pemberian molekul adhesi 37,8 kDa terhadap Th17 dan Treg, namun Th17 dan Treg hanya diukur secara jumlah, sedangkan fenotip dari Th17 dan Treg tidak diketahui. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa Treg dan Th17 yang dapat bekerja adalah yang memiliki reseptor *homing* seperti CCR9. Sementara hal tersebut tidak dievaluasi pada penelitian ini.

Selain itu perlu dilakukan studi untuk membandingkan bagaimana ekspresi Treg dan Th17 pada mencit yang divaksinasi, sebelum dan sesudah pemberian paparan. Pemberian paparan *Vibrio cholerae* bertujuan untuk menilai efektivitas dari pemberian molekul adhesin secara klinis maupun imunologis.



Pengembangan dari molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* ini sebagai kandidat vaksin pada dasarnya adalah menginduksi respon imun mukosa agar membentuk sekretori IgA (SigA). Nantinya bila didapatkan paparan dari bakteri *Vibrio cholerae*, SigA ini diharapkan akan berikatan dengan bakteri *Vibrio cholerae* sebelum terjadi perlekatan bakteri. Tanpa perlekatan dari bakteri, proses patogenesis dari bakteri tidak akan terjadi. Namun vaksin ini tidak dapat mencegah bakteri yang telah mengalami perlekatan. Oleh karena itu, perlu dilakukan studi lebih lanjut agar bisa menemukan cara menghambat perjalanan penyakit dari bakteri *Vibrio cholerae* secara menyeluruh.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

1. Pemberian molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* berefek pada peningkatan ekspresi sel T limfosit subset Th17 di lien mencit.
2. Pemberian molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* tidak berefek pada ekspresi sel T limfosit subset Treg di lien mencit.

7.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan CTB sebagai ajuvan terhadap ekspresi sel Th17 dan Treg, dengan atau tanpa molekul adhesin 37,8 kDa.
2. Perlu diadakan penelitian tentang fenotip dari Th17 dan Treg yang ada di lien mencit
3. Perlu diadakan penelitian lebih lanjut mengenai ekspresi Th17 dan Treg setelah pemberian molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* sebelum paparan dan setelah paparan bakteri *Vibrio cholerae*.
4. Perlu studi lebih lanjut mengenai ekspresi Th17 dan Treg di lamina propria usus.
5. Perlu dilakukan studi eksploratif setelah pemberian molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* terhadap ekspresi sel T limfosit subset lainnya selain sel Th17 dan Treg maupun sel B yang mensekresikan imunoglobulin A.
6. Perlu dilakukan studi dengan durasi waktu yang lebih lama untuk mengevaluasi terbentuknya imunitas jangka panjang.

**DAFTAR PUSTAKA**

Abbas, Abul K, Lichtman, Andrew H. and Pillai, S. 2015. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, Fifth Edition, *Elsevier Heal. Sci.*

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

Ali, M., Nelson, A. R., Lopez, A. L. and Sack, D. A. 2015. Updated Global Burden of Cholera in Endemic Countries, 1–13.

Angrand, G., Quillévéré, A., Loaëc, N., Daskalogianni, C., Granzhan, A., Teulade-Fichou, M. P., *et al.* 2019. Sneaking out for happy hour: Yeast-based approaches to explore and modulate immune response and immune evasion, *Genes (Basel)*. MDPI AG, **10**(9).

Arce-sillas, A., Álvarez-luquín, D. D., Tamaya-domínguez, B., Gomez-fuentes, S., Trejo-garcía, A., Melo-salas, M., *et al.* 2016. Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation, *J. Immunol. Res.*, **2016**.

Aulja, S. J., Dubin, P. J. and Kolls, J. K. 2008. Th17 cells and Mucosal Host Defense, *Semin. Immunol.*, **19**(6):377–382.

Awasthi, A. and Kuchroo, V. K. 2009. Th17 cells: From precursors to players in inflammation and infection, *Int. Immunol.*, **21**(5):489–498.

Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., *et al.* 2018. *Vibrio* spp. infections, *Nat. Rev. Dis. Prim.* Springer US, **4**(1).

Beer, M. and Magarian, T. J. 2010. T helper 17 cells : discovery , function , and physiological trigger, **4**:1407–1421.



Bemark, M., Boysen, P. and Lycke, N. Y. 2012. Induction of gut IgA production through T cell-dependent and T cell-independent pathways, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1247**(1):97–116.

Berod, L., Puttur, F., Huehn, J. and Sparwasser, T. 2012. Tregs in infection and vaccinology: heroes or traitors?, **5**:260–269.

BestProtocols 2010. Staining Intracellular Antigens for Flow Cytometry Staining Intracellular Antigens for Flow Cytometry, *Cytometry*, **6168**:1–5.

Bhuiyan, T. R., Lundin, S. B., Khan, A. I., Lundgren, A., Harris, J. B., Calderwood, S. B., *et al.* 2009. Cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 induces T-cell responses in the circulation, *Infect. Immun.*, **77**(5):1888–1893.

Bio-Rad Protocols 2016. Direct Immunofluorescence Staining of Surface Epitopes of Cells and Blood, 1.

Blaschitz, C. and Raffatellu, M. 2010. Th17 Cytokines and the Gut Mucosal Barrier, (February):196–203.

Bourque, D. L., Bhuiyan, T. R., Genereux, D. P., Rashu, R., Ellis, C. N., Chowdhury, F., *et al.* 2018. Analysis of the human mucosal response to cholera reveals sustained activation of innate immune signaling pathways, *Infect. Immun.*, **86**(2):1–17.

Boyaka, P. N. 2017. Inducing Mucosal IgA: A Challenge for Vaccine Adjuvants and Delivery Systems, *J. Immunol.*, **199**(1):9–16.

Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A. and Mietzner, T. A. 2013. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 26th edn. Edited by G. F. Brooks, K. C. Carroll, J. S. Butel, S. A. Morse, and T. A. Mietzner. McGraw-Hill Companies.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), War, W., Ii, W. W., Etiology,



T., Passive, R., War, W., et al. 2015. CDC Pink Book, *Epidemiol. Prev. Vaccine-Preventable Dis.* 13th ed.

Curotto de Lafaille, M. A. and Lafaille, J. J. 2009. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor?, *Immunity*. Elsevier Inc., **30**(5):626–635.

Darmawati, S., Ethica, S. N. and Dewi, S. S. 2019. Protein profile and hemagglutination activity of pilli, an adhesion factor causing typhoid fever by salmonella typhi, *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, **292**(1).

Diller, M. L., Kudchadkar, R. R., Delman, K. A., Lawson, D. H. and Ford, M. L. 2016. Balancing Inflammation: The Link between Th17 and Regulatory T Cells, **2016**.

Ehara, M., Iwami, M., Ichinose, Y., Shimotori, S., Kangethe, S. K. and Nakamura, S. 1991. Purification and characterization of fimbriae from fimbriate *Vibrio cholerae* O1 strain Bgd17, *Trop. Med.*, **33**(4):109–125.

Ekman, L., Fahle, L., Mattsson, J. and Scho, K. 2015. Cholera toxin adjuvant promotes a balanced Th1 / Th2 / Th17 response independently of IL-12 and IL-17 by acting on Gs a in CD11b⁺ DCs, **8**(4):815–827.

Fast, D., Kostiuk, B., Foley, E. and Pukatzki, S. 2018. Commensal pathogen competition impacts host viability, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **115**(27):7099–7104.

Federer, W. T. 1983. Principles of statistical design with special reference to experiment and treatment design, *Tech. Rep. BU-813-M, Biometrics Unit Cornell Univ.*

Gazzinelli-Guimaraes, P. H. and Nutman, T. B. 2018. Helminth parasites and immune regulation, *F1000Research*, **7**(0).



Gommerman, J. L., Rojas, O. L. and Fritz, J. H. 2014. Re-thinking the functions of IgA plasma cells, *Gut Microbes*, **5**(5):652–662.

Greenfield, E. A. 2017. Harvesting Tissue from Immunized Mice, Rats, and Hamsters, *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2017**(11):899–903.

Hahn, A., Thiessen, N., Pabst, R., Buettner, M. and Bode, U. 2010. Mesenteric lymph nodes are not required for an intestinal immunoglobulin A response to oral cholera toxin, *Immunology*, **129**(3):427–436.

Haney, D. J., Lock, M. D., Gurwith, M., Simon, J. K., Ishioka, G., Cohen, M. B., et al. 2018. Lipopolysaccharide-specific memory B cell responses to an attenuated live cholera vaccine are associated with protection against *Vibrio cholerae* infection, *Vaccine*. Elsevier Ltd, **36**(20):2768–2773.

Harris, J. B. 2018. Cholera: Immunity and prospects in vaccine development, *J. Infect. Dis.*, **218**(Suppl 3):S141–S146.

Harrison, O. J. and Powrie, F. M. 2013. Regulatory T cells and immune tolerance in the intestine, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**(7):1–17.

Hirota, K., Turner, J., Villa, M., Duarte, J. H. and Demengeot, J. 2013. TH 17 cell plasticity in Peyer's patches is responsible for induction of T cell-dependent IgA responses, *Nat Immunol*, **14**(4):372–379.

Holmgren, J. and Czerkinsky, C. 2005. Mucosal immunity and vaccines, *Nat. Med.*, **11**(4S):S45.

Jackson-Sillah, D., Cliff, J. M., Mensah, G. I., Dickson, E., Sowah, S., Tetteh, J. K. A., et al. 2013. Recombinant ESAT-6-CFP10 Fusion Protein Induction of Th1/Th2 Cytokines and FoxP3 Expressing Treg Cells in Pulmonary TB, *PLoS One*, **8**(6).

Kabir, S. 2014. Critical analysis of compositions and protective efficacies of oral



killed cholera vaccines, *Clin. Vaccine Immunol.*, **21**(9):1195–1205.

Kamel, F. H. and Jarjes, S. F. 2016. Essentials of Bacteriology and Immunology, (January 2015):218.

Kang, J. O., Lee, J. B. and Chang, J. 2016. Cholera toxin promotes th17 cell differentiation by modulating expression of polarizing cytokines and the antigen-presenting potential of dendritic cells, *PLoS One*, **11**(6):1–16.

Karlsen, T. H., Sommerfelt, H., Klomstad, S., Andersen, P. K., Strand, T. A., Ulvik, R. J., *et al.* 2003. Intestinal and systemic immune responses to an oral cholera toxoid B subunit whole-cell vaccine administered during zinc supplementation, *Infect. Immun.*, **71**(7):3909–3913.

Kolls, J. K. and Khader, S. A. 2010. The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **21**(6):443–448.

Kuchta, A., Rahman, T., Sennott, E. L., Bhuyian, T. R., Uddin, T., Rashu, R., *et al.* 2011. *Vibrio cholerae* O1 infection induces proinflammatory CD4 + T-cell responses in blood and intestinal mucosa of infected humans, *Clin. Vaccine Immunol.*, **18**(8):1371–1377.

Kumar, P., Chen, K. and Kolls, J. K. 2013. Th17 cell based vaccines in mucosal immunity, *Curr Opin Immunol*, **23**(1):1–7.

Kumar, R. and Kumar, P. 2019. Yeast-based vaccines: New perspective in vaccine development and application, *FEMS Yeast Res.* Oxford University Press, **19**(2):1–22.

Labeaud, A. D., Malhotra, I., King, M. J., King, C. L. and King, C. H. 2009. Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination?, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **3**(5):1–6.

Laemmli, U. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the



Head of Bacteriophage T4, *Nat. Publ. Gr.*, **227**(5259):680–5.

Levine, M. M., Black, R. E., Clements, M. L., Cisneros, L., Nalin, D. R. and

Young, C. R. 1981. Duration Of Infection-Derived Immunity To Cholera,
J. Infect. Dis., **143**(6):818–820.

Li, B., Chen, L., Sun, H., Yang, W., Hu, J., He, Y., *et al.* 2015. Immunodominant
epitope-specific Th1 but not Th17 responses mediate protection against

Helicobacter pylori infection following UreB vaccination of BALB/c mice,
Sci. Rep. Nature Publishing Group, **5**(October):1–15.

Lin, Y., Slight, S. R. and Khader, S. A. 2010. Th17 cytokines and vaccine-induced
immunity, *Semin. Immunopathol.*, **32**(1):79–90.

Lindenstrøm, T., Woodworth, J., Dietrich, J., Aagaard, C., Andersen, P. and
Agger, E. M. 2012. Vaccine-induced Th17 cells are maintained long-
term postvaccination as a distinct and phenotypically stable memory
subset, *Infect. Immun.*, **80**(10):3533–3544.

Lukaszczyk, M., Pradhan, B. and Remaut, H. 2019. The Biosynthesis and
Structures of Bacterial Pili, *Subcell. Biochem.* Springer International
Publishing.

Lv, X., Song, H., Yang, J., Li, T., Xi, T. and Xing, Y. 2014. A multi-epitope vaccine
CTB-UE relieves *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory
reaction via up-regulating microRNA-155 to inhibit Th17 response in
C57/BL6 mice model, *Hum. Vaccines Immunother.*, **10**(12):3561–3569.

Mestecky, J., Russell, M. W. and Elson, C. O. 2007. Perspectives on Mucosal
Vaccines: Is Mucosal Tolerance a Barrier?, *J. Immunol.*, **179**(9):5633–
5638.

Mitra, S., Saha, D. R., Pal, A., Niyogi, S. K., Mitra, U. and Koley, H. 2012.



Hemagglutinating activity is directly correlated with colonization ability of shigellae in suckling mouse model, *Can. J. Microbiol.*, **58**(10):1159–1166.

Moffitt, K. L., Gierahn, T. M., Lu, Y. J., Gouveia, P., Alderson, M., Flechtner, J. B., et al. 2011. TH17-based vaccine design for prevention of streptococcus pneumoniae colonization, *Cell Host Microbe*. Elsevier Inc., **9**(2):158–165.

Morrison, P. J., Ballantyne, S. J. and Kullberg, M. C. 2011. Interleukin-23 and T helper 17-type responses in intestinal inflammation: From cytokines to T-cell plasticity, *Immunology*, **133**(4):397–408.

Mufida, D. C., Handono, K., Prawiro, S. R. and Santoso, S. 2018. Identification of hemagglutinin protein from *Streptococcus pneumoniae* pili as a vaccine candidate by proteomic analysis, *Turkish J. Immunol.*, **6**(1):8–15.

Murphy, K. and Weaver, C. 2018. *Janeway's Immunobiology*. Ninth Edition, Q. Rev. Biol.

Ndure, J. and Flanagan, K. L. 2014. Targeting regulatory T cells to improve vaccine immunogenicity in early life, *Front. Microbiol.*, **5**(SEP):1–12.

Ogra, P. L., Faden, H. and Welliver, R. C. 2001. Vaccination Strategies for Mucosal Immune Responses, **14**(2):430–445.

Omenetti, S. and Pizarro, T. T. 2015. The Treg/Th17 axis: A dynamic balance regulated by the gut microbiome, *Front. Immunol.*, **6**(DEC):1–8.

Pabst, O. and Slack, E. 2019. IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific, *Mucosal Immunol.*, (July):1–10.

Pandiyani, P., Bhaskaran, N., Zou, M., Schneider, E., Jayaraman, S. and Huehn, J. 2019. Microbiome dependent regulation of Tregs and Th17 cells in



mucosa, *Front. Immunol.*, **10**(MAR):1–17.

Di Pasquale, A., Preiss, S., Da Silva, F. T. and Garçon, N. 2015. Vaccine adjuvants: From 1920 to 2015 and beyond, *Vaccines*, **3**(2):320–343.

Perez-Lopez, A., Behnsen, J., Nuccio, S. P. and Raffatellu, M. 2016. Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria, *Nat. Rev. Immunol.* Nature Publishing Group, **16**(3):135–148.

Petrovsky, N. 2015. Comparative Safety of Vaccine Adjuvants: A Summary of Current Evidence and Future Needs, *Drug Saf.* Springer International Publishing, 1059–1074.

Qadri, F., Ali, M., Lynch, J., Chowdhury, F., Khan, A. I., Wierzba, T. F., *et al.* 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, *Lancet Infect. Dis.* The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an Open Access article under the CC BY 4.0 license, **18**(6):666–674.

Ranheim, T., Mozier, N. and Egan, W. 2015. Vaccine potency assays, *Vaccine Anal. Strateg. Princ. Control.*

Ray, G., Plorde, J. J., Sherris, E. and Neidhardt, F. C. 2018. Sherris Medical Microbiology. 7th edn. Edited by K. J. Ryan. McGraw-Hill Education.

Reto Prawiro, S., Susanto, A., Ismanoe, G. and Wienarsih, S. 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.

Ribet, D. and Cossart, P. 2015. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues, *Microbes Infect.* Elsevier Masson SAS, **17**(3):173–183.



Romano, M., D'Souza, S., Adnet, P. Y., Laali, R., Jurion, F., Palfliet, K., *et al.*

2006. Priming but not boosting with plasmid DNA encoding mycolyl-transferase Ag85A from *Mycobacterium tuberculosis* increases the survival time of *Mycobacterium bovis* BCG vaccinated mice against low dose intravenous challenge with *M. tuberculosis* H37Rv, *Vaccine*, **24**(16):3353–3364.

Saha, D. R., Pal, A., Rajendran, K. and Dutta, P. 2006. Histopathological

changes in experimental cholera with a non toxigenic non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strain isolated from Kolkata, India, *Indian J. Exp. Biol.*, **44**(3):221–227.

Sehrawat, S. and Rouse, B. T. 2017. Interplay of regulatory T cell and Th17 cells

during infectious diseases in humans and animals, *Front. Immunol.*, **8**(APR):1–14.

Shah, R. R., Hassett, K. J. and Brito, L. A. 2017. Overview of Vaccine Adjuvants:

Introduction, History, and Current Status, in, 1–13.

Shen, X., Du, J., Guan, W. and Zhao, Y. 2014. The balance of intestinal Foxp3+

regulatory T cells and Th17 cells and its biological significance, *Expert Rev. Clin. Immunol.*, **10**(3):353–362.

Siegrist, C. 2008. General aspects of vaccination, in *Vaccines*.

Silva, A. J. and Benitez, J. A. 2016. *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera

Pathogenesis, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **10**(2):1–25.

Sirskyj, D., Kumar, A. and Azizi, A. 2016. Mechanisms underlying the immune

response generated by an oral *Vibrio cholerae* vaccine, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**(7).

Sit, B., Zhang, T., Fakoya, B., Akter, A., Biswas, R., Ryan, E. T., *et al.* 2019. Oral



immunization with a probiotic cholera vaccine induces broad protective immunity against vibrio cholerae colonization and disease in mice, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **13**(5):1–20.

Stemcell Technologies inc 2012. How to Prepare a Single Cell Suspension from Primary Tissue Samples, 4–6. <https://www.stemcell.com/how-to-prepare-a-single-cell-suspension-from-primary-tissue-samples.html>.

Diakses pada tanggal 8 Januari 2020.

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

Sumarno 2000. Karakterisasi Molekuler Protein Adesi Vibrio cholerae O1 M094V dan Protein Reseptornya pada sel epitel usus halus tikus putih (Wistar). Universitas Airlangga.

Sumarno 2003. Bobot molekuler protein reseptor vibrio cholerae 0 1 M094V pada enterosit tikus putih Molecular weight of protein receptor of vibrio cholerae 0 1 M094V in enterocyte of rat, *J. Kedokt. Yars.*, **29**(S):20–29.

Tesmer, L. A., Lundy, S. K., Sarkar, S. and Fox, D. A. 2008. Th17 cells in human disease, *Immunol. Rev.*, **223**(1):87–113.

Tezuka, H. and Ohteki, T. 2019. Regulation of IgA production by intestinal dendritic cells and related cells, *Front. Immunol.*, **10**(AUG):1–15.

Thomas, W. E., Trintchina, E., Forero, M., Vogel, V. and Sokurenko, E. V. 2002. Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force, *Cell*, **109**(7):913–923.

Tortora, G., Funke, B. and Case, C. 2013. Microbiology: Make the Connection Between Lecture, Lab, and the Real World.



Vetter, V., Denizer, G., Friedland, L. R., Krishnan, J. and Shapiro, M. 2018.

Understanding modern-day vaccines: what you need to know, *Ann. Med.*

Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, **50(2):110–120.**

Waterborg, J. H. and Matthews, H. R. 1994. The electrophoretic elution of proteins from polyacrylamide gels., *Methods Mol. Biol.*

Waturangi, D. E., Wennars, M., Suhartono, M. X. and Wijaya, Y. F. 2017. Edible ice in Jakarta , Indonesia , is contaminated with multidrug-resistant *Vibrio cholerae* with virulence potential, (May):352–359.

Weiberg, D., Basic, M., Smoczek, M., Bode, U., Bornemann, M. and Buettner, M.

2018. Participation of the spleen in the IgA immune response in the gut,

PLoS One, **13(10):1–18.**

Weil, A. A., Becker, R. L. and Harris, J. B. 2019. *Vibrio cholerae* at the

Intersection of Immunity and the Microbiome., *mSphere*, **4(6):1–16.**

Wilson, R., Cohen, J. M., Jose, R. J., De Vogel, C., Baxendale, H. and Brown, J.

S. 2015. Protection against *Streptococcus pneumoniae* lung infection after nasopharyngeal colonization requires both humoral and cellular immune responses, *Mucosal Immunol.* Nature Publishing Group, **8(3):627–639.**

Winstead, C., Buck, E., El Adaimi, J., Moores, T., Slocum, T. and Moyle, M.

2013. Comparison of the early innate immune responses of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in human intestinal epithelial cells

(P1237), *J. Immunol.*

Wizemann, T. M., Adamou, J. E. and Langemann, S. 1999. Adhesins as targets

for vaccine development, *Emerg. Infect. Dis.* Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 395–403.



De Wolf, A. C. M. T., Van Aalst, S., Ludwig, I. S., Bodinham, C. L., Lewis, D. J.,
Van Der Zee, R., et al. 2017. Regulatory T cell frequencies and
phenotypes following anti-viral vaccination, *PLoS One*, **12**(6):1–17.

World Health Organization 2013. Vaccine Safet Basics: Learning Manual, 202.

http://vaccine-safety-training.org/tl_files/vs/pdf/vsb-manual.zip.Diakses

pada tanggal 4 Januari 2020.

Xiao, Y. and Daniell, H. 2017. Long-term evaluation of mucosal and systemic
immunity and protection conferred by different polio booster vaccines,
Vaccine. Elsevier Ltd, **35**(40):5418–5425.

Zhu, F., Wang, A., Li, Y., Liang, R., Li, D. and Li, B. 2017. Chapter 4: Adipose
Tissue-Resident Regulatory T Cells, *Immune Metab. Heal. Tumor, Adv.
Exp. Med. Biol.*, (September):153–162.



LAMPIRAN

Lampiran 1 Kelaikan Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS KEDOKTERAN

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 44 / EC / KEPK – S2 / 03 / 2018

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

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

PENELITI UTAMA :

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

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

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

DINYATAKAN LAIK ETIK.



16 MAR 2018

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

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



Lampiran 2 Data Penelitian

1. Data penelitian

Sampel	Treg	Th17
K1	0,08	0,08
K2	0,07	0,07
K3	0,04	0,06
K4	0,04	0,03
K5	0,05	0,07
K6	0,09	0,1
K7	0,06	0,05
K8	0,11	0,14
K9	0,08	0,11
V1	0,06	0,16
V2	0,17	0,27
V3	0,23	0,31
V4	0,2	0,26
V5	0,11	0,16
V6	0,03	0,07
V7	0,08	0,09
V8	0,08	0,17

1. Data penelitian setelah dilakukan transform

Sampel	Transform Treg	Transform Th17
K1	0,28	0,28
K2	0,26	0,26
K3	0,2	0,24
K4	0,2	0,17
K5	0,22	0,26
K6	0,3	0,32
K7	0,24	0,22
K8	0,33	0,37
K9	0,28	0,33
V1	0,24	0,4
V2	0,41	0,52
V3	0,48	0,56
V4	0,45	0,51
V5	0,33	0,4
V6	0,17	0,26
V7	0,28	0,3
V8	0,28	0,41



Lampiran 3 Analisis Statistik Data

a. Data deskriptif

Descriptives

		Statistic	Std. Error	
Treg	Mean	,0929	,01377	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,0638	
		Upper Bound	,1221	
	5% Trimmed Mean	,0888		
	Median	,0800		
	Variance	,003		
	Std. Deviation	,05676		
	Minimum	,03		
	Maximum	,23		
	Range	,20		
	Interquartile Range	,06		
	Skewness	1,376	,550	
Kurtosis	1,231	1,063		
Th17	Mean	,1294	,02010	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,0868	
		Upper Bound	,1720	
	5% Trimmed Mean	,1249		
	Median	,1000		
	Variance	,007		
	Std. Deviation	,08288		
	Minimum	,03		
	Maximum	,31		
	Range	,28		
	Interquartile Range	,10		
	Skewness	1,040	,550	
Kurtosis	,120	1,063		
Proporsi	Mean	1,4225	,12563	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1,1562	
		Upper Bound	1,6888	
	5% Trimmed Mean	1,3908		
	Median	1,3478		
Variance	,268			



Std. Deviation	,51800	
Minimum	,75	
Maximum	2,67	
Range	1,92	
Interquartile Range	,49	
Skewness	1,178	,550
Kurtosis	1,068	1,063

b. Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Treg	,237	17	,012	,842	17	,008
Th17	,181	17	,142	,877	17	,029
Proporsi	,205	17	,055	,889	17	,044

a. Lilliefors Significance Correction

c. Data Deskriptif setelah dilakukan transformasi

Descriptives

		Statistic	Std. Error
t_treg	Mean	,2932	,02084
	95% Confidence Interval for Lower Bound	,2491	
	Mean Upper Bound	,3374	
	5% Trimmed Mean	,2896	
	Median	,2828	
	Variance	,007	
	Std. Deviation	,08594	
	Minimum	,17	
	Maximum	,48	
	Range	,31	
	Interquartile Range	,10	
	Skewness	,891	,550
	Kurtosis	,295	1,063
t_th17	Mean	,3435	,02674
	95% Confidence Interval for Lower Bound	,2868	



	Mean	Upper Bound	,4002	
	5% Trimmed Mean		,3411	
	Median		,3162	
	Variance		,012	
	Std. Deviation		,11025	
	Minimum		,17	
	Maximum		,56	
	Range		,38	
	Interquartile Range		,14	
	Skewness		,586	,550
	Kurtosis		-,502	1,063
t_prp	Mean		1,1758	,05005
	95% Confidence Interval for Lower Bound		1,0697	
	Mean Upper Bound		1,2819	
	5% Trimmed Mean		1,1676	
	Median		1,1610	
	Variance		,043	
	Std. Deviation		,20638	
	Minimum		,87	
	Maximum		1,63	
	Range		,77	
	Interquartile Range		,22	
	Skewness		,806	,550
	Kurtosis		,444	1,063

d. Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
t_treg	,195	17	,084	,917	17	,130
t_th17	,131	17	,200*	,940	17	,314
t_prp	,171	17	,200*	,933	17	,246

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



Lampiran 4 Uji Independen T Test

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
t_treg	Equal variances assumed	6,237	,025	-1,878	15	,080	-,07288	,03881	-,15560	,00983
	Equal variances not assumed			-1,798	9,247	,105	-,07288	,04053	-,16420	,01843
t_th17	Equal variances assumed	2,425	,140	-3,573	15	,003	-,14531	,04067	-,23198	-,05863
	Equal variances not assumed			-3,462	10,915	,005	-,14531	,04197	-,23776	-,05285
t_prp	Equal variances assumed	3,881	,068	-2,999	15	,009	-,24560	,08189	-,42014	-,07107
	Equal variances not assumed			-2,913	11,275	,014	-,24560	,08430	-,43059	-,06061

**Lampiran 5 Acknowledgment of Online Submission**

1/14/2020

Mail - Aisyah Amalia - Outlook

[IJMM]:Acknowledgment of Online Submission:IJMM_19_411

Indian Journal of Medical Microbiology <editor@ijmm.org>

Mon 10/28/2019 10:38 AM

To: aisyahamalia@studentub.ac.id <aisyahamalia@studentub.ac.id>

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

Dear Miss. Amalia,

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

Dear Dr. Amalia,

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

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

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

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

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

<https://outlook.live.com/mail/0/inbox/id/AQMkADAwATM0MDAAMS1InzQ4LWNhYzYIMDACTAwCgBGAADkPEWEH%2BbUexKZ1ZgMrRqwc...> 1/2

