



PATOMEKANISME INFEKSI SHIGELLA

Sebagai Dasar Pengembangan Vaksin Shigellosis



Yulian Wiji Utami
Khoirul Anam

Penulis:

Yulian Wiji Utami
Khoirul Anam

ISBN:

978-602-432-868-9
978-602-432-869-6 (elektronik)

Editor:

Sumarno
Titin Andri Wihastuti
Tim UB Press

Penyunting:

Tim UB Press

Desain Sampul:

Tim UB Press

Tata Letak Naskah:

Tim UB Press

Penerbit:



UB Press

Jl. Veteran 10-11 Malang 65145 Indonesia
Gedung INBIS Lt.3
Telp/HP: 0341-5081255 / 08113653899
e-mail: ubpress@gmail.com
<http://www.ubpress.ub.ac.id>

Cetakan Pertama, Oktober 2019

i – xxii + 167 hlm, 15.5 cm x 23.5 cm

Hak cipta dilindungi undang-undang

Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan dengan cara apapun tanpa ijin tertulis dari penerbit

DAFTAR ISI

BAB I. PENDAHULUAN

BAB II. BAKTERI SHIGELLA

BAB III. *SHIGELLOSIS* DAN EPIDEMIOLOGI *SHIGELLOSIS*

BAB IV. FAKTOR VIRULENSI DAN PATOGENESIS SHIGELLA

BAB V. RESPON IMUN DAN PERKEMBANGAN VAKSIN SHIGELLA

BAB VI. KARAKTERISASI PROTEIN PILI BAKTERI SHIGELLA

BAB VII. PERKEMBANGAN SEL Th17 DAN PERAN SITOKIN Th17 DALAM MENGENDALIKAN PENYEBARAN PATOGEN DI MUKOSA USUS

BAB VIII. EFEK PROTEKTIF PROTEIN ADHESI SUBUNIT PILI *Shigella flexneri* 49,8 kDa DALAM MENGINDUKSI PROTEIN ANTIMIKROBA DAN ANTIBODI MUKOSA USUS

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR SINGKATAN

<i>ADCC</i>	: <i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
<i>AEE</i>	: <i>Apical early endosome</i>
<i>AID</i>	: <i>Activation-induced cytidine deaminase</i>
<i>AMPs</i>	: <i>Antimicrobial peptides</i>
<i>AHR</i>	: <i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i>
<i>APC</i>	: <i>anaphase promoting complex</i>
<i>ATP-ase</i>	: <i>adenosine triphosphatase</i>
<i>APRIL</i>	: <i>a proliferation-inducing ligand</i>
<i>ARE</i>	: <i>Apical recycling endosome</i>
<i>ASI</i>	: <i>Air susu ibu</i>
<i>BAFF</i>	: <i>B cell-activating factor</i>
<i>BCR</i>	: <i>B cell receptor</i>
<i>BEE</i>	: <i>Basolateral early endosome</i>
<i>BHI</i>	: <i>Brain heart infusion broth</i>
<i>BM</i>	: <i>berat molekul</i>
<i>CCR9</i>	: <i>CC-chemokine receptor 9;</i>
<i>CSR</i>	: <i>Class-switch recombination</i>
<i>CXC</i>	: <i>Chemokines Neutrophil Chemoattractants</i>
<i>CXCR5</i>	: <i>CXC-chemokine receptor 5;</i>
<i>CE</i>	: <i>Common endosome</i>
<i>CTB</i>	: <i>Cholera Toxin B</i>
<i>CDC</i>	: <i>Centers for Disease Control</i>
<i>CMI</i>	: <i>Cell mediated immunity</i>
<i>CTLs</i>	: <i>Cytotoxic T lymphocytes</i>
<i>DC</i>	: <i>Dendritic cell</i>
<i>DNA</i>	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
<i>DSS</i>	: <i>Dextran sodium sulfate, digunakan untuk menginduksi kolitis</i>
<i>ECM</i>	: <i>Extracellular matrix</i>
<i>ELISA</i>	: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay)</i>
<i>EC</i>	: <i>epithelial cells</i>
<i>EIEC</i>	: <i>Enteroinvasive Escherichia coli</i>
<i>EMB</i>	: <i>Eosin Metilen Blue</i>
<i>FAE</i>	: <i>follicle associated epithelium</i>
<i>FimA</i>	: <i>Fimbriae A</i>
<i>FimF</i>	: <i>Fimbriae F</i>
<i>FimG</i>	: <i>Fimbriae G</i>
<i>FimH</i>	: <i>Fimbriae H</i>
<i>f-SC</i>	: <i>Free secretory component</i>

<i>GALT</i>	: Gut Associated Lymphoreticular Tissue
<i>G-CSF</i>	: Granulocyte colony-stimulating factor
<i>GEF</i>	: GTP exchange factor
<i>GTP-ase</i>	: guanosine triphosphatase
<i>HA</i>	: Hemagglutinsi
<i>HE</i>	: Hektoen enterik
<i>HUS</i>	: Hemolytic Uremic Syndrom
<i>HLA</i>	: Human Leucocyte antigen
<i>IBD</i>	: inflamatory bowel disease
<i>IEL</i>	: Intestinal epithelial lymphocyte
<i>ICAM-1</i>	: Intercellular Adhesion Molecule-1
<i>IFR</i>	: Interfolikular region
<i>IRF4</i>	: Interferon Regulator Factor-4
<i>iTh17</i>	: innate Th17
<i>Ipa</i>	: invasion Plasmid antigen
<i>IFNγ</i>	: interferon gamma
<i>IgA</i>	: Immunoglobulin A
<i>IgD</i>	: Immunoglobulin D
<i>IgG</i>	: Immunoglobulin G
<i>IgM</i>	: Immunoglobulin M
<i>IL</i>	: interleukin
<i>IM</i>	: inner membrane
<i>kDa</i>	: kilodalton
<i>LB</i>	: Large bowel
<i>LPS</i>	: Lipopolisakarida
<i>MAC</i>	: Mac Conkey
<i>mm</i>	: milimeter
<i>MALT</i>	: Mucosa-associated Lymphoreticular Tissue
<i>M.cell</i>	: microfold cell
<i>MHC</i>	: Major Histocompatibility Complex
<i>MLIL</i>	: Mice Ligated Ileal Loop
<i>mSC</i>	: membran secretory component
<i>MS</i>	: Multiple sclerosis
<i>MT</i>	: microtubulus
<i>mxi</i>	: membran expresion of ipa
<i>NC</i>	: needle complex
<i>NE</i>	: Neutrophil elastase
<i>N-WASP</i>	: neuron- Wiskoff Aldrich syndrome protein
<i>NK</i>	: natural killer
<i>NF-kB</i>	: nuclear factor kappa B
<i>NO</i>	: Nitric oxide
<i>OD</i>	: Optical density

<i>OLIVIA</i>	: <i>Olympus Viewer for Imaging Application</i>
<i>OMP</i>	: <i>Outer membrane protein</i>
<i>PAI</i>	: <i>pattogenicity island</i>
<i>PAMP</i>	: <i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
<i>pIgA</i>	: <i>polymeric IgA</i>
<i>pIgR</i>	: <i>polymeric Ig receptor</i>
<i>PCR</i>	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>PMA</i>	: <i>Phorbol 12-myristate 13 acetate</i>
<i>PMN</i>	: <i>polymorphonuclear neutrophil</i>
<i>PP</i>	: <i>Peyer's Patch</i>
<i>PPM</i>	: <i>Pemberantasan Penyakit Menular</i>
<i>PLP</i>	: <i>Penyehatan Lingkungan Pemukiman</i>
<i>PRRs</i>	: <i>Pattern-recognition receptors</i>
<i>PRM</i>	: <i>Pattern recognition Molecules</i>
<i>RA</i>	: <i>Rheumatoid arthritis</i>
<i>RORγt</i>	: <i>Retinoic acid related orphan receptor</i>
<i>RNA</i>	: <i>Ribonucleic acid</i>
<i>RPMI</i>	: <i>Roswell Pack Medium Institute</i>
<i>RS</i>	: <i>Rumah Sakit</i>
<i>SB</i>	: <i>Small bowel</i>
<i>SC</i>	: <i>Secretory component</i>
<i>SDS-PAGE</i>	: <i>Sodium- dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<i>SEM</i>	: <i>Scanning electron microscope</i>
<i>SFB</i>	: <i>Segmented filamentous bacteria</i>
<i>SLE</i>	: <i>Systemic Lupus Erythematosus</i>
<i>STAT3</i>	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
<i>Socs3</i>	: <i>Suppressor of cytokine Signaling 3</i>
<i>SS</i>	: <i>Salmonella-Shigella</i>
<i>s-IgA</i>	: <i>secretory Immunoglobulin A</i>
<i>Spa</i>	: <i>surface presentation of ipa</i>
<i>ShET</i>	: <i>Shigella enterotoksin</i>
<i>SHI</i>	: <i>Shigella patogenicity islands</i>
<i>SsWC</i>	: <i>Shigella sonnei Whole Cell</i>
<i>T3SS</i>	: <i>type 3 secretion System</i>
<i>TCA</i>	: <i>Trichloroacetic acid</i>
<i>TCG</i>	: <i>Thiaproline carbonat Glutamate</i>
<i>TCR</i>	: <i>T cell receptor</i>
<i>Th</i>	: <i>T-helper</i>
<i>TNF-α</i>	: <i>Tumor necrosis factor-α</i>
<i>TMP-SMX</i>	: <i>Trimetoprim-Sulfametoksazol</i>
<i>TGF</i>	: <i>Transforming growth factor</i>

TGF- β : *Transforming growth factor- β*
Th : *T-helper*
TLR : *Toll like receptor*
TNFs : *Tumor necrosis factors*
Treg : *T regulator*
WHO : *World Health Organization*
XLD : *Xylose Lysine Deoxycholate*

BAB I PENDAHULUAN

Latar Belakang

Penyakit akibat bakteri merupakan penyakit yang sering dijumpai di berbagai negara terutama negara berkembang. Penyakit ini dapat menyerang hampir seluruh lapisan masyarakat. Diantara penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri, yang masih menjadi perhatian yaitu infeksi bakteri *Shigella dysenteriae* (Seidlein, 2006).

Shigella merupakan bakteri berbentuk batang dengan pengecatan gram bersifat gram negatif, tumbuh pada suasana anaerob dan fakultatif anaerob, tumbuh pada pH 6,4–7,8 dengan suhu 37°C. Genus *Shigella* terdiri dari empat spesies yaitu: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* dan *Shigella boydii* (Todar, 2012). Masing-masing spesies dibagi lagi menjadi beberapa serotipe yaitu :*S. dysenteriae* (13 serotipe), *S. flexneri* (6 serotipe), *S. boydii* (18 serotipe) dan *S. Sonnei* (1 serotipe) (Wang *et al* 2009).

Infeksi akibat bakteri *Shigella* pada manusia menyebabkan kondisi yang dikenal sebagai Shigellosis (Behrman, 2000). Shigellosis merupakan masalah kesehatan masyarakat yang utama terutama di negara-negara berkembang. Sekitar 163 juta kasus terjadi setiap tahunnya, angka kematian pada anak dibawah 5 tahun mencapai satu juta pertahun diseluruh dunia (Cakrabarti, 2010). Shigellosis penting mendapat perhatian karena penyakit ini telah menyebar ke seluruh dunia. WHO melaporkan jumlah kasus shigellosis pada tahun 1966-1997 diperkirakan 165 juta, 69% diantaranya terjadi pada anak usia dibawah 5 tahun. Dari jumlah tersebut angka kematian akibat shigellosis berkisar antara 500.000 -1,1 juta (Kasper, 2010).

Epidemi juga telah melanda Asia Selatan sekitar akhir tahun 80 an dan awal tahun 90 an. Lebih berbahaya lagi, epidemi ini dapat disebabkan oleh *Shigella dysenteriae* yang telah resisten terhadap berbagai antibiotik (Seidlein, 2006). Penyakit ini masih terdapat secara endemik di negeri tropis, termasuk Indonesia (Ditjen PPM & PLP, 2009).

Di Indonesia angka kesakitan dan kematian karena penyakit ini dari tahun ke tahun terus meningkat. Hasil survei tahun 1989-1990 pada balita di rumah sakit di Indonesia menunjukkan proporsi spesies *Shigella* sebagai etiologi diare;

Shigella dysenteriae 5,9%; *Shigella flexneri* 70,6%; *Shigella boydii* 5,9%; *Shigella sonnei* 17,6%. Dari laporan survailans terpadu tahun 1989 didapatkan 13,3% kasus shigellosis di puskesmas. Di rumah sakit didapat 0,45% pada penderita rawat inap dan 0,05% pasien rawat jalan (Ditjen PPM &PLP, 2009). Meskipun proporsi diare akibat *Shigella dysenteriae* rendah tetapi kita selalu harus waspada karena *Shigella dysenteriae* dapat muncul sebagai epidemi (Ditjen PPM &PLP, 2009). Di samping itu *Shigella dysenteriae* 1 menyebabkan infeksi yang lebih parah dan berkepanjangan serta paling banyak menyebabkan kematian terutama pada bayi dan orang tua (Venkatesan, 2002).

Pemahaman mengenai patogenesis *Shigella* sangat diperlukan untuk membantu strategi pengembangan vaksin yang lebih menjanjikan keberhasilan dan keamanannya pada manusia. Patogenesis *Shigella* merupakan mekanisme yang kompleks. *Shigella* harus menempel pada sel inang untuk memulai terjadinya infeksi. Adhesin bakteri terletak pada permukaan sel yaitu pada ujung rambut yang dikenal sebagai pili atau fimbriae. Sedangkan yang berperan pada proses infeksi bakteri *Shigella* adalah faktor-faktor virulensi berupa plasmid, kromosom dan toksin. Peran faktor virulensi *Shigella* pada proses invasi telah banyak diidentifikasi, namun peran faktor virulensi pada tahap inisiasi sangat sedikit informasinya.

Keberadaan bakteri *Shigella* di saluran pencernaan dapat mengganggu sistem pencernaan manusia. Keberadaan faktor adhesi spesifik pada permukaan sel bakteri akan menstimulasi jaringan inang untuk mengekspresikan reseptor tertentu pada permukaan selnya. Molekul atau protein pada permukaan patogen disebut sebagai adhesin atau ligan, protein tersebut akan berikatan dengan reseptor spesifik yang terdapat pada permukaan sel inang. Bakteri kemudian akan menginvasi sel epitel mukosa usus (Tortora, 2010).

Mekanisme infeksi *Shigella* pada inang diperantarai oleh pili atau *fimbriae* sebagai alat perlekatan. Pili merupakan bagian bakteri yang berbentuk bulat panjang keluar dari permukaan bakteri, terdiri atas subunit protein tunggal yang disebut pilin. Ujung pili memperantarai perlekatan bakteri dengan reseptor permukaan sel inang. Pili bakteri mempunyai komponen seluler yang digunakan oleh *Shigella* sebagai reseptor adhesi sel (Jennisom & Verma, 2004).

Pili *Shigella* merupakan salah satu organ utama yang digunakan bakteri untuk melekat pada inang. Pili atau fimbriae

mangandung molekul adhesin yang berperan sebagai faktor perlekatan ke reseptor pada sel inang. Adhesi bakteri gram negatif diperankan oleh suatu protein yang mampu mengaglutinasi eritrosit mamalia. Protein ini disebut dengan protein hemaglutinin. Pili atau fimbriae mangandung molekul adhesin yang berperan sebagai faktor perlekatan ke reseptor sel inang (Jennisom & Verma, 2004). Adhesi bakteri gram negatif diperankan oleh suatu protein yang mampu mengaglutinasi eritrosit mamalia. Protein ini disebut dengan protein hemaglutinin (Guhathakurta *et al.*, 1996). Penelitian yang dilakukan oleh Prabowo (2011) menunjukkan bahwa pada pili *Shigella dysenteriae* mangandung protein hemaglutinin dengan berat molekul (BM) 49.8 kDa. Penelitian serupa yang dilakukan oleh Anam *et al* (2016), menunjukkan bahwa pada pili *Shigella flexneri* juga mangandung protein hemaglutinin dengan berat molekul (BM) 49.8 kDa. Protein tersebut merupakan protein adhesin.

Pemberian protein adhesin peroral diharapkan mampu mengaktifkan sel dendritik untuk mensekresikan beberapa sitokin proinflamasi yaitu IL-22 dan IL-23, yang kemudian menstimulasi beberapa subset sel T (termasuk sel Th17) untuk mensekresikan IL-17 dan IL-22. Menurut Blachitz & Raffatelu (2010), ekspresi sitokin Th17 mampu menginduksi sekresi kemokin & protein antimikroba. *Interleukin 17* dan IL 22 akan menstimulasi epithelium usus untuk mensekresikan CXC *Chemokines (Neutrophil Chemoattractants)* dan *antimicrobial peptides (lipocalin-2, calprotectin, Reg III γ dan β defensins)*. Protein antimikroba tersebut merupakan bentuk pertahanan mukosa gastrointestinal terhadap patogen. Sel Th17 merupakan subset baru dari sel T helper CD4+. Sel Th17 merupakan sel T helper proinflamasi yang berbeda dari sel Th1 dan Th2 dalam perkembangan dan fungsinya (Chen Zhi & O'Shea, 2008).

Beberapa studi membuktikan bahwa pemberian protein adhesin peroral dapat menginduksi respon imun mukosa. Protein adhesin OMP 36 kDa *Salmonella typhi* yang diberikan peroral mampu menginduksi respon imun humoral mukosa dan juga respon imun humoral sistemik (Santoso, 2003). Tandia (2006) membuktikan pemberian protein adhesin 38 kDa *M.tuberculosis* peroral dapat menginduksi sekresi s-IgA ke lumen usus. Faisal (2010), menemukan bahwa pemberian protein adhesi sub unit pili BM 37,7 kDa *V.cholerae 01* dikonjugasi dengan *Cholera Toxin B (CTB)* mampu menginduksi respon imun mukosal dengan terbentuknya s-IgA secara bermakna. Setyorini *et al* (2014),

membuktikan bahwa pemberian protein sub unit pili *Shigella dysenteriae* BM 49,8 kDa yang dikonjugasi dengan ISCOM juga mampu meningkatkan respon s-IgA mukosa usus. Sebelumnya juga telah dilakukan studi bahwa Immunoglobulin A terutama IgA anti LPS telah terdeteksi pada manusia penderita shigellosis, dan merupakan respon imun yang berperan penting terhadap infeksi ulang (Jennison & Verma, 2004).

Respon imun humoral adalah komponen utama perlindungan terhadap Shigellosis. Penurunan kekebalan humoral merupakan penyebab kerentanan Shigellosis pada anak-anak (Raqib *et al.*, 2002). Membran mukosa usus memegang peranan penting dalam ekskresi dan eliminasi antigen atau mikroorganisme patogen. Imunitas mukosa usus ditandai dengan adanya sekresi IgA pada permukaan mukosa, dikenal sebagai *secretory* (s) IgA (Brandtzaeg, 2010). *Secretory* IgA berperan melindungi mukosa tubuh terhadap kuman patogen, toksin bakteri, enzim, dan sejumlah besar antigen asing termasuk antigen protein dari makanan. Selain menggumpalkan bakteri, menetralkan virus dan toksin, s-IgA mampu menghalangi perlekatan mikroorganisme pada permukaan sel epitel usus, sehingga invasi kuman ke dalam jaringan bisa dicegah. Selain itu imunitas mukosal juga penting sebagai pertahanan jangka panjang terhadap patogen (Lijima *et al.*, 2001). Perlawanan terhadap antigen berkaitan dengan kapasitas membran mukosa dalam memproduksi s-IgA, oleh karena itu salah satu indikasi terbaik bahwa vaksin telah menginduksi imunitas protektif adalah dengan mengukur kadar s-IgA pada permukaan mukosa (Griebel, 2003).

Imunisasi aktif pada mukosal bertujuan untuk menstimulasi respon IgA mukosal yang spesifik. Respon mukosal lebih memberikan keuntungan dibanding vaksinasi sistemik, perlindungan terhadap reinfeksi oleh berbagai patogen berkaitan lebih baik dengan kadar antibodi s-IgA spesifik daripada dengan antibodi serum. Hal ini berkaitan dengan berbagai respon perlindungan yang diinduksi pada organ target, dimana patogen pertamakali akan melawan sistem imun atau antibodi mukosal (Pilette, 2004).

Pengenalan s-IgA sebagai sistem pertahanan yang kuat terhadap patogen enterik, menyebabkan ketertarikan yang besar dalam pengembangan vaksin mukosal (Externest *et al.*, 2000). Molekul adhesin yang berpotensi imunogenik dapat digunakan sebagai komponen vaksin mukosal yang bertujuan mencegah terjadinya penyakit infeksi (Henahan, 1997). Adhesin bakteri yang

dikombinasikan dengan adjuvan mukosal poten merupakan pendekatan yang menjanjikan untuk vaksin mukosal (Ogra *et al.*, 2001). Sebagai alternatifnya *cholera toxin* (CT) dapat diberikan bersama-sama sebagai *mucosal adjuvants* (Externest *et al.*, 2000). *Cholera toxin* merupakan imunogen kuat yang dapat diberikan dengan berbagai rute (Anderson, 2004). Induksi respon s-IgA harus diberikan melalui rute mukosal dan antigen harus diformulasikan sehingga dapat diambil oleh sel M pada *mucosa-associated lymphoid tissue* (MALT) (Externest *et al.*, 2000).

Selain s-IgA, antibodi alami yang terdapat pada mukosa usus adalah *Antimicrobial peptides* (AMPs). Protein ini berperan penting sebagai sinyal regulasi sistem imun bawaan dan *direct killing* terhadap sejumlah bakteri dan jamur (Shin & Kyeong Jo, 2011). Blaschitz & Raffatelu (2010) menjelaskan bahwa sitokin Th17 dapat menginduksi AMPs. Sel dendritik yang diaktifkan oleh patogen akan mensekresikan beberapa sitokin proinflamasi yaitu IL 22 dan IL 23, yang kemudian menstimulasi beberapa subset sel T termasuk sel Th 17 untuk mensekresikan IL 17 dan IL 22. Interleukin 17 dan IL 22 akan menstimulasi epithelium usus untuk mensekresikan CXC (*Chemokines Neutrophil Chemoattractants*) dan AMPs.

Terdapat dua famili utama AMPs pada mamalia yaitu cathelicidins dan defensin. Induksi AMPs telah dieksplorasi pada percobaan menggunakan kelinci model Shigelosis. Pemberian *sodium butyrate* peroral pada kelinci model shigelosis dapat menginduksi cathelicidin (CAP-18) dan berkorelasi dengan penurunan pertumbuhan bakteri shigella di lumen usus (Agerbert *et al.*, 2012).

Beberapa masalah terkait shigelosis yang menjadi pusat perhatian di dunia antara lain adalah terjadinya resistensi terhadap antibiotik; dosis infeksi yang sangat rendah; komplikasi akut yang dapat menyebabkan kematian terutama pada bayi dan anak-anak; dan telah diketahui terjadinya komplikasi kronis berupa malnutrisi berkepanjangan tetapi patogenesisnya belum diketahui secara jelas (Sansonetti, 2001).

Berbagai upaya pengobatan shigelosis dapat mencegah timbulnya komplikasi. Pemberian antimikroba pada shigelosis telah terbukti memperpendek masa demam, diare, dan toxaemia (Ashkenazi, 2003). Tetapi Penelitian terbaru di Amerika Serikat menunjukkan bahwa selama 4 tahun terakhir, *Shigella* mempunyai kecenderungan dalam meningkatkan angka resistensi terhadap agen antimikroba (Kasper, 2010). Oleh karena itu penting

dilakukan upaya pencegahan dan pengendalian terhadap penyakit ini.

Pengobatan menggunakan antibiotik terbukti efisien dalam pengendalian shigellosis, namun beberapa tahun terakhir ini shigella menjadi resisten terhadap antibiotik, bahkan antibiotik yang terbaru. Pada tahun 2003 beberapa kasus ciprofloxacin dan fluoroquinolones resisten terhadap *Shigella dysenteriae* tipe 1, hal ini dilaporkan dari India, Bangladesh dan Nepal (Niyogi, 2001; Bhattacharya & Sur, 2003; Sarkar *et al.*, 2003; Sur *et al.*, 2003). Di Jakarta Utara, Indonesia, sebuah penelitian surveilans yang dilakukan antara Agustus 2001 dan Juli 2003 menemukan bahwa anak usia 1 sampai 2 tahun memiliki insiden tinggi Shigellosis (32/1000/tahun) dengan 73% sampai 95% dari isolat resisten terhadap ampicilin, trimetoprim-sulfametoksazol, kloramfenikol dan tetrasiklin (Hernawa *et al.*, 2010).

Galur *Shigella* semakin menjadi resisten terhadap sebagian besar antimikroba yang digunakan sehingga mengakibatkan kegagalan pengobatan dan peningkatan mortalitas (Levine, 1986). Resistensi multidrug merupakan masalah serius dalam pengobatan Shigellosis, terutama yang disebabkan oleh *Shigella dysenteriae*. Oleh karena itu *World Health Organization* (WHO) memprioritaskan pengembangan vaksin yang efektif dan aman untuk membantu pengendalian Shigellosis di negara-negara berkembang (Cakrabarti, 2010).

Salah satu bentuk pencegahan shigellosis adalah dengan pemberian vaksin. Saat ini beberapa kandidat vaksin sedang dikembangkan (Tu G, 1999). Jenis vaksin yang telah dikembangkan adalah *live attenuated vaccines* yaitu substansi hidup dari strain *Shigella* yang telah dilemahkan yang mengekspresikan baik *S. flexneri 2a* dan O-antigen *S. Sonnei*. Setelah diujikan di China, daya proteksinya menunjukkan 61-65% untuk *S. flexneri 2a* dan 57-72% untuk *S. sonnei* (WHO 2011). Kandidat vaksin *Shigella* berikutnya adalah: *A formalin-inactivated S sonnei vaccine* (SsWC) yang dikembangkan dalam bentuk oral, tergolong jenis *killed, whole-cell vaccine* oleh Johns Hopkins University in Baltimore, MD, USA, tetapi hasilnya belum ada laporan (WHO, 2011).

Beberapa vaksin yang telah dan sedang dikembangkan berasal dari substansi hidup strain *Shigella* yang telah dilemahkan, vaksin tersebut masih membawa faktor virulensi yang dapat menyebabkan infeksi. Untuk itu perlu dikembangkan vaksin yang aman dan efektif pada manusia, sehingga diperlukan pemahaman

tentang konsep shigellosis dan epidemiologi shigellosis di dunia maupun di Indonesia.

Sejak tahun 1940-an sejumlah kandidat vaksin untuk *Shigella flexneri* telah dikembangkan tetapi belum ada yang cukup sukses untuk dirilis. Upaya-upaya awal untuk mengembangkan vaksin *Shigella flexneri* terdiri dari bakteri yang dilemahkan diberikan parenteral, tetapi gagal untuk menginduksi respon imun protektif (Barnes *et al.*, 1951 dalam Jennison & Verma, 2004). Berikutnya adalah kandidat vaksin *Shigella flexneri* yang direayasa untuk mengekspresikan antigen-O dari *Shigella* spesies lain. *Shigella flexneri* 2a galur T 32 membawa plasmid yang berisi cluster gen coding untuk *Shigella sonnei* antigen-O, mampu memberikan 100% perlindungan kepada tikus yang dipapar dengan kedua virulen *Shigella flexneri* dan *Shigella sonnei* (Rui *et al.*, 1996 dalam Jennison & Verma, 2004). Sub unit vaksin *Shigella* menjadi alternatif terkait isu-isu keamanan dan keselamatan penggunaan vaksin hidup. Uji klinis telah menunjukkan bahwa LPS *Shigella flexneri* yang diberikan melalui parenteral kepada relawan sebagai vaksin, dapat menginduksi kuat respon antibodi serum (Passwell *et al.*, 2001). Hal ini menunjukkan bahwa protein dapat menjadi target pengembangan sub unit vaksin *Shigella*.

Banyak pendekatan yang digunakan untuk mengembangkan vaksin *Shigella*, namun sampai saat ini vaksin yang praktis dan murah belum tersedia. Vaksin *Shigella* yang ideal seharusnya dapat menginduksi respon imun yang dapat melindungi terhadap semua spesies *Shigella* (Cakrabarti, 2010). Dua komponen penting dari sistem kekebalan usus adalah enterosit dan *gut-associated lymphoid tissue* atau GALT (Volman, 2008). *Gut-associated lymphoid tissue* (GALT) terdiri dari berbagai sel-sel imun yaitu *T-cells*, *B-cells*, *dendritic cells* dan *M-cells* (Volman, 2008). Peningkatan respon imun mukosa saluran cerna terhadap bakteri *Shigella* diharapkan dapat mencegah perlekatan bakteri ke sel enterosit. Pemahaman mengenai respon imun mukosa saluran cerna dan respon imun tubuh terhadap bakteri *Shigella* sangat diperlukan untuk pengembangan vaksin yang lebih menjanjikan keberhasilan dan keamanannya pada manusia.

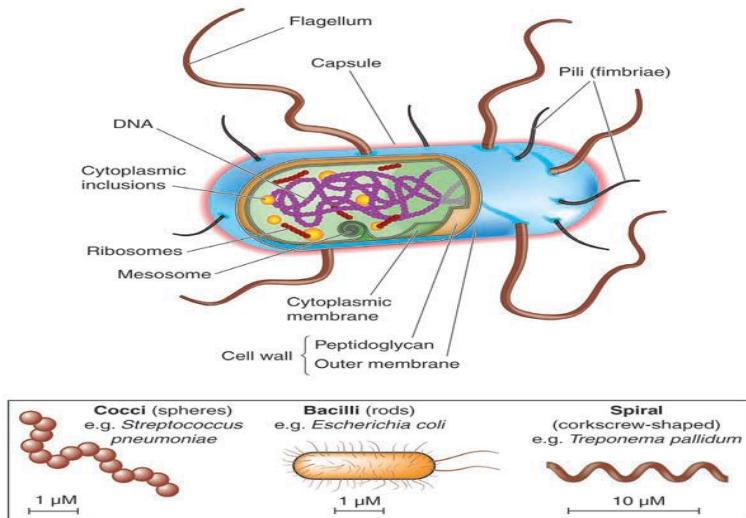
BAB II

BAKTERI SHIGELLA

2.1 Definisi dan Jenis Bakteri Shigella

Bakteri adalah sel prokariotik yang khas; uniseluler tidak mengandung struktur yang terbatas membran di dalam sitoplasma. Sel-selnya secara khas, berbentuk bola, seperti batang atau spiral. Bakteri yang khas berdiameter sekitar 0,5 sampai 1,0 μm dan panjangnya 1,5 sampai 2,5 μm (gambar 2.1). Reproduksi terutama dengan pembelahan biner sederhana yaitu suatu proses aseksual (Pelczar and Chan, 2006). Cara hidup bakteri antara lain hidup bebas, parasitik, saprofitik, patogen pada manusia, hewan dan tumbuhan. Habitatnya tersebar luas di alam, dalam tanah, atmosfer, di dalam lumpur, dan di laut (Yuliati, 2010).

Bakteri adalah uniseluler dan berbentuk bulat, batang, spiral atau melengkung. Bakteri adalah makhluk hidup terkecil, mulai dari ukuran 0,1 mikrometer (atau mikron) sampai 10 mikron. Bakteri memiliki ukuran rata-rata adalah sekitar 2 sampai 5 mikron, sedangkan sel eukariotik berkisar antara 2 sampai 100 mikron (Law, 2004)

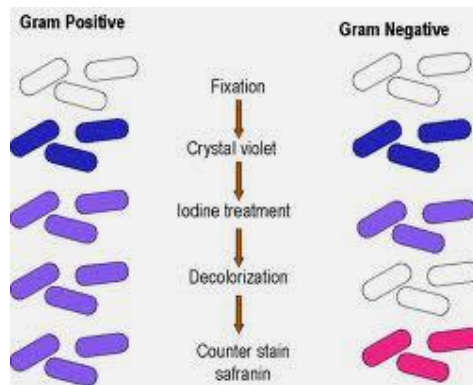


Gambar 2.1. Struktur sel bakteri dengan bentuk dan bagian-bagian yang berfungsi sebagai alat untuk melakukan infeksi pada hospes (Law, 2004)

Menurut Wilson *et al.*, (2002), bakteri dapat dibagi menjadi dua kelompok utama berdasarkan perbedaan struktur dinding sel yaitu Gram positif dan bakteri Gram negatif. Dinding sel dari kedua

Gram positif dan bakteri gram negatif mengandung komponen beracun yang faktor virulensi kuat dan memiliki peran sentral dalam patogenesis syok septik bakteri, suatu kondisi yang sering mematikan yang melibatkan runtuhnya sistem peredaran darah dan mungkin mengakibatkan kegagalan sistem organ multiple. Hal ini diyakini bahwa Gram negatif dan bakteri Gram positif dapat mengaktifkan jalur umum dari peristiwa yang mengarah ke septik shock.

Pada pemeriksaan mikroskopik dengan menggunakan pewarnaan gram, digunakan sebagai petanda untuk membedakan antara bakteri gram positif dan negatif. Pada bakteri dengan pewarnaan gram, bakteri gram positif akan terlihat berwarna ungu. Sedangkan bakteri gram negatif tampak terlihat berwarna merah/merah muda (Johnson, 2011).



Gambar 2.2. Perbedaan bakteri gram positif dan gram negatif

Menurut Campbell *et al* (2003), bakteri gram positif memiliki dinding sel yang lebih sederhana, dengan jumlah peptidoglikan yang relatif banyak. Dinding sel bakteri gram negatif memiliki peptidoglikan yang lebih sedikit dan secara struktural lebih kompleks. Di antara bakteri patogen, yang menyebabkan penyakit, spesies gram negatif umumnya lebih berbahaya dibandingkan dengan spesies gram positif.

Bakteri patogen Gram negatif terutama mengandalkan pada fimbriae untuk melakukan perlekatan. Bakteri gram negatif mengandung lipopolisakarida (LPS) yang juga dikenal sebagai endotoksin yaitu molekul amphophilic dalam membran luar bakteri Gram negatif dan biasanya dianggap sebagai komponen utama yang bertanggung jawab atas induksi syok septik yang sering menyertai infeksi berat terhadap hostnya. Reseptor utama

untuk LPS penanda adalah CD14, yang berada permukaan sel makrofag (Wilson *et al.*, 2002).

Shigella adalah Gram-negatif, non-motil, batang lurus seperti anggota keluarga Enterobacteriaceae (Schroeder and Hilbi 2008, Cabral 2010). Bakteri ini adalah patogen fakultatif intraseluler yang menunjukkan spesifisitas tinggi untuk host manusia atau primata. Laporan pertama pada isolasi dan karakterisasi bakteri penyebab disentri basiler, kemudian bernama *Shigella*, ditemukan oleh Kiyoshi Shiga di akhir abad ke-19. Deskripsi dari berbagai strain yang berbeda diikuti selama dekade berikutnya, dengan kesemuanya terkait erat dengan bakteri non-patogen *Escherichia coli*. Genus *Shigella* terdiri dari empat spesies yaitu *S. dysenteriae* (serogrup A), *S. flexneri* (Serogrup B), *S. boydii* (serogrup C), dan *S. sonnei* (Serogrup D) (Schroeder and Hilbi 2008, Lamps 2009, Ploeg *et al* 2010). Menurut variasi antigen O mereka, spesies dibagi lagi menjadi beberapa serotipe. *S. flexneri* dan *S. sonnei* adalah endemik dan menyebabkan sebagian besar infeksi. Sedangkan *S. dysenteriae* berperan untuk wabah epidemi penyakit dan disentri bentuk paling parah yang menyebabkan sebagian besar kasus Shigellosis yang fatal (Schroeder and Hilbi 2008). Dengan pengecualian *S. sonnei*, masing-masing spesies dapat dibagi lagi menjadi serotipe berdasarkan reaktivitas dengan serum hyperimmune: *S. dysenteriae* (15 serotipe), *S. flexneri* (6 serotipe dan 2 varian), & *S. boydii* (20 serotipe) (Ploeg *et al* 2010).

Klasifikasi bakteri *Shigella* adalah;

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gamma Proteobacteria

Order : Enterobacteriales

Family : Enterobacteriaceae

Genus : *Shigella*

Species : *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* dan *Shigella boydii*

(Nathania, 2008).

Shigella virulen invasif Gram-negatif basil merupakan penyebab utama diare menular di seluruh dunia. *Shigellosis* paling umum di negara-negara berkembang dimana rendah sanitasi dan sangat endemis di daerah tropis dan subtropis Afrika, Asia Selatan, dan Amerika Tengah. *Shigella dysenteriae* adalah yang paling virulen dan spesies yang paling umum terisolasi, meskipun *S.*

sonnei dan *S. flexneri* sering dilaporkan di Amerika Serikat (Todar, 2011).

Kelompok *Shigella* dapat diidentifikasi dengan aglutinasi menggunakan antiserum, baik polivalen dan monovalen antiserum *Shigella* yang tersedia. Antiserum polivalen digunakan untuk menentukan kelompok dan berisi antibodi terhadap beberapa serotipe *Shigella*. Sebagai contoh antiserum, polivalen yang paling tersedia secara komersial untuk *Shigella flexneri* akan bereaksi dengan semua serotipe *S. flexneri*. Antiserum monovalen digunakan untuk menentukan serotipe. Sebagai contoh, *S. dysenteriae* tipe 1 antiserum hanya akan bereaksi dengan isolat *S. dysenteriae* Tipe 1. (Ploeg *et al.*, 2010).

Shigella diklasifikasikan berdasarkan reaksi serologis dari antigen O mereka saja, karena mereka tidak memiliki antigen H (flagellar) dan K (Kapsul). Dengan demikian hanya antigen somatik (O) yang digunakan untuk penentuan serotipe. Sedangkan antigen flagellar (H) tidak diekspresikan. Antigen O terdiri dari pengulangan unit oligosakarida, dan merupakan bagian dari lipopolisakarida (LPS) dari membran luar bakteri Gram negative dan berkontribusi terhadap variabilitas antigenik utama pada permukaan sel (Cabral, 2010). Empat spesies diklasifikasikan atas dasar perbedaan biokimia dan serologi antigen O: *Shigella dysenteriae* (13 serotipe); *Shigella flexneri* (14 serotipe); *Shigella boydii* (18 serotipe), dan *Shigella sonnei*, yang merupakan serotipe tunggal. Ada dua bentuk antigen O yang berbeda untuk 14 serotipe *Shigella flexneri*, tipe 1 - 5 dan tipe 6. *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* dan *Shigella dysenteriae* tipe 1 adalah spesies yang paling umum terisolasi dari kasus *Shigellosis* (Li *et al.*, 2009). Identifikasi tradisional *Shigella* spp. dalam klinis laboratorium didasarkan terutama pada isolasi *Shigella* dengan media kultur selektif, diikuti dengan identifikasi fenotip dan serotipe. Proses ini mungkin memakan waktu 3-5 hari untuk mendapatkan hasil (Li *et al.*, 2009)

2.1.1 *Shigella dysenteriae*

Dari semua serotipe *Shigella*, *Shigella dysenteriae* tipe 1 menarik perhatian khusus sebagai penyebab potensi epidemi dan asosiasinya dengan sebagian besar kasus disentri yang serius, dengan serangan tingkat tinggi, fatalitas kasus tingkat tinggi, dan berbagai komplikasi (Dutta *et al* 2003, World Health Organization 2005). Selama awal 1984, berbagai daerah di India, termasuk wilayah timur, memperlihatkan sebuah epidemi luas disentri berdarah, terutama disebabkan oleh *S. dysenteriae* tipe 1, yang

melanda daerah Benggala barat dari utara ke selatan. Galur tersebut resisten terhadap streptomisin, tetrasiklin, dan kloramfenikol (Dutta *et al.*, 2003).

Shigella dysenteriae seperti kebanyakan bakteri lainnya mengekskresikan racun seperti racun Shiga (Stx's), yang menyebabkan komplikasi serius selama infeksi. Protein bakteri disekresikan dalam filtrat kultur *S. dysenteriae* telah didefinisikan sebagai *exotoxins* yang menyebabkan kematian sel, memediasi perubahan bentuk sel dan mengganggu fungsi sel normal. *S. dysenteriae* telah didefinisikan sebagai agen enterik patogenik yang menyebabkan perubahan histologis dari mukosa usus mengikuti paparan enterotoksin Shigella. *S. dysenteriae* yang tertelan secara oral, seringkali melalui terkontaminasi makanan atau air. *S. dysenteriae* pertama berkolonisasi dan kemudian menyerang epitel, mengakibatkan nekrosis mukosa (O'Loughlin and Browne, 2001).

Beberapa kultur sel sangat sensitif terhadap Shiga toksin. Hal ini menjadi jelas bahwa sejumlah jenis sel dalam tubuh dapat ditargetkan oleh penghambatan *toxin-induced* sintesis protein dan apoptosis (Meyers & Kaplan, 2000). Mekanisme apoptosis diinduksi oleh racun yang muncul menunjukkan bahwa toksin dapat menjadi sinyal apoptosis pada jenis sel yang berbeda melalui mekanisme yang berbeda (Cherla *et al.*, 2003). Toksin Shiga juga dapat mempengaruhi organ-organ lain dan tanda-tanda apoptosis dapat dianggap sebagai cedera sel beracun. Filtrat kultur dari *Shigella dysenteriae* diproduksi efek sitotoksik pada sel otot dengan cedera sel akut diduga terkait dengan kematian sel apoptosis (Alvarez *et al.*, 2007).

2.1.2 *Shigella sonnei*

Shigella sonnei adalah spesies yang paling umum terisolasi diantara 4 spesies Shigella di negara industri. Penularan *S. sonnei* di seluruh batas geografis adalah sering dikaitkan dengan perjalanan internasional dan lintas-batas perdagangan makanan. Infeksi *Shigella sonnei* yang resisten terhadap antibiotik yang umum digunakan dalam praktek pediatrik telah menjadi lebih umum selama dekade terakhir. Infeksi *Shigella sonnei* merupakan penyebab utama dari bakteri gastroenteritis dan penyebab utama bacillary disentri di Belgia. Di negara-negara industri transmisi dari orang-ke-orang melaporkan untuk kebanyakan kasus infeksi *S. Sonnei* yang terjadi umumnya pada anak usia antara enam bulan dan 10 tahun (Schrijver *et al.*, 2011).

Semua galur *Shigella sonnei* virulen tidak seperti spesies *Shigella* lainnya, spesies ini terdiri dari serotipe tunggal yang menghasilkan koloni halus mengekspresikan antigen somatik bentuk I. Bentuk ini disebut spesifisitas antigenik sesuai dengan rantai O samping dari lapisan lipopolisakarida yang terdiri dari subunit disakarida yang mengandung dua gula amino luar biasa. Koloni halus *S. sonnei* biasanya tidak stabil dan berdisosiasi untuk membentuk seperti tonjolan yang disebut koloni bentuk II yang seragam avirulent. Penelitian Yoshida *et al.*, (1991) telah mengungkapkan bahwa dalam plasmid besar *S. sonnei* ada beberapa gen yang diperlukan untuk pembentukan produksi antigen I. Hasil penelitian tersebut juga mengungkapkan bahwa gen ini diatur setidaknya empat kelompok gen (operon).

2.1.3 *Shigella flexneri*

Shigella flexneri adalah bakteri Gram-negatif yang bertanggung jawab untuk infeksi enterik serius yang terjadi terutama di terminal ileum dan kolon. Kepentingan pada *Shigella* sebagai patogen manusia, didorong oleh resistensi antibiotik dan perlunya untuk mengembangkan vaksin terhadap infeksi (Molinaro *et al.*, 2008). *Shigella flexneri* merupakan agen penyebab *Shigellosis* yang bertanggung jawab selama lebih dari 1 juta kematian setiap tahun, terutama di negara berkembang. Setelah dicerna *S. flexneri* melintasi M sel dan diteruskan ke jaringan dari usus besar, bakteri tersebut membunuh makrofag dan kemudian menginvasi sel epitel oleh. Fenotipe *S. flexneri* invasif melokalisasi genetik pada wilayah 31-kb plasmid besar dan benar-benar terikat dengan sistem sekresi tipe III (TTSS). TTSS digunakan oleh berbagai bakteri gram negatif untuk memperkenalkan protein efektor bacterialy diturunkan ke membran dan sitoplasma dari sel target, sehingga menghasilkan subversi fungsi sel normal. Berdasarkan struktur O antigen, lipopolisakarida komponen yang ada pada membran luar sel, 15 serotipe dari *S. flexneri* yang saat ini diakui. Sejak serotipe *S. flexneri* 2a ditemukan menjadi serotipe endemik utama di negara berkembang. Saat ini tersedia vaksin kandidat ditujukan terhadap *S. flexneri* 2a. Hal ini penting untuk menentukan prevalensi berbagai serotipe *S. flexneri* pada komunitas berbeda di seluruh dunia dan untuk memantau perubahan dari waktu ke waktu (Talukder *et al.*, 2001).

Secara khusus *S. flexneri* dikenal sebagai penyebab utama agen bentuk endemik *Shigellosis* atau bertanggung jawab untuk sekitar satu juta disentri basiler dengan kematian setiap tahun

terutama pada bayi di negara maju. Penyakit ini ditandai dengan masuknya bakteri ke dalam sel epitel kolon selanjutnya perbanyak pada intraseluler dan interseluler yang memungkinkan bakteri menyebar untuk menginfeksi sel tetangga (Sansone 2006, dalam Molinaro *et al.*, 2008). *Shigella flexneri* menghambat apoptosis pada sel epitel yang terinfeksi. Hal ini dalam rangka untuk memahami kelangsungan efek pro- survival yang disebabkan oleh bakteri. Infeksi sel epitel oleh *S. flexneri* menginduksi bagian pro-survival dalam sel yang mengakibatkan penghambatan apoptosis ada dan tidak adanya staurosporine (Molinaro *et al.*, 2008).

Patogenesis dari *S. flexneri* didasarkan pada kemampuan bakteri untuk menyerang dan mereplikasi dalam epitel kolon yang menghasilkan peradangan berat dan kerusakan epitel. Mekanisme molekuler yang digunakan oleh *S. flexneri* untuk melintasi penghalang epitel, menghindari respon imun host dan memasuki sel-sel epitel telah dipelajari secara ekstensif di kedua model *in vitro* dan *in vivo*. Akibatnya banyak faktor virulensi penting untuk invasi bakteri menyebar antar sel dan induksi peradangan telah diidentifikasi pada *S. flexneri*. Respon humoral host untuk *S. flexneri* juga menjadi penting dalam melindungi host, sedangkan peran dari respon imun seluler masih belum jelas. Hal ini karena *S. flexneri* adalah endemik di sebagian besar negara berkembang dan menyebabkan kematian lebih dari spesies *Shigella* lain. Serotipe *S. flexneri* yang dominan di negara-negara berkembang adalah serotipe 1b, 2a, 3a, 4a dan 6, sementara di negara-negara industri sebagian besar adalah isolat 2a. *S. flexneri* semakin berkembang resistensi terhadap antibiotik. Organisasi Kesehatan Dunia telah diprioritaskan pengembangan vaksin yang aman dan efektif terhadap *S. flexneri*. Penelitian vaksin masa depan harus meliputi uji coba vaksin campuran yang dirancang untuk memberikan perlindungan terhadap beberapa serotipe (Jennison and Verma, 2004).

S. flexneri tidak mampu menyerang sel-sel epitel usus melalui permukaan apikal, namun perlu mentranslokasi epitel usus untuk pengembangan infeksi. Translokasi patogen melalui M sel-sel epitel folikel-associated yang meliputi nodul limfoid terhubung dengan mukosa kolon. Dalam lokasi subepitel *S. flexneri* menyebabkan apoptosis kelompok makrofag, memungkinkan bakteri menghindar ke dalam jaringan dan masuk ke dalam sel epitel basolateral diikuti oleh sel-sel menyebar dan pertumbuhan intraseluler (Sperandio *et al.*, 2008).

2.1.4 *Shigella boydii*

Jumlah serotipe *S. boydii* dalam skema Shigella adalah 15 pada tahun 1958. Sejak itu sejumlah serovarian provisional *S. boydii* telah diusulkan dari referensi laboratorium. Galur yang memberikan reaksi biokimia yang khas dari spesies Shigella tetapi tidak termasuk salah satu O serogroups terkenal digambarkan sebagai serovarian sementara setelah ratifikasi oleh Pusat Kolaborasi Internasional WHO untuk Shigella di CDC, Atlanta. Namun status mereka sementara tetap sampai beberapa laboratorium telah diidentifikasi seperti serovarian dan dinilai sifat virulensi dan epidemiologi penting. WHO Internasional Pusat Kolaborasi Shigella dalam klasifikasi terakhirnya dimasukkan tiga serovarian sementara ke skema serotipe dan mereka ditetapkan sebagai *S. boydii* serovarian 16, 17 dan 18. Namun sementara serovarian lain *S. boydii* telah dilaporkan tetapi belum ditetapkan jumlah antigen O dalam skema internasional (Matsushita *et al.*, 2002).

Sejak tahun 2003 para peneliti telah pilih 17 isolat organisme ini dari kotoran pasien diare di Bangladesh dan melaporkan karakterisasi mereka berhubungan dengan biokimia, serologi dan karakter virulensi. Mengingat isolasi di berbagai geografis lokasi dari beberapa pasien dengan diare dan patogenisitas yang didukung oleh tes *in vitro*, para peneliti mengusulkan bahwa serovar ini akan diberikan status penuh sebagai serotipe *S. boydii* 19. Hal ini untuk mendorong laboratorium lain untuk mencari strain ini dan membantu mendefinisikan peran mereka sebagai agen diarrhoeagenik di seluruh dunia (Ansaruzzaman *et al.*, 2005).

2.2 Isolasi dan Identifikasi Shigella

Suatu media yang baik dan mendukung pertumbuhan suatu galur *Shigella* tertentu, tidak selalu efektif untuk jenis galur *Shigella* lainnya. Dalam suatu penelitian menunjukkan bahwa untuk isolasi *S. flexneri* dan *S. sonnei*, *xylosa-lisin-deoksikolat* (XLD) agar adalah yang paling sensitive dibandingkan Mac Conkey (MAC) agar dan *Salmonella-Shigella* (SS), sedangkan untuk *S. boydii* and *S. dysenteriae*, MAC adalah yang terbaik. Akan tetapi kesimpulan ini tidaklah pasti mengingat bahwa jumlah kedua tipe *Shigella* yang didapatkan tersebut (*S. dysenteriae* dan *S. boydii*) hanya sedikit, masing-masing dua untuk *S. dysenteriae* dan *S. boydii* (Surjawidjaja dkk. 2007).

Untuk *Shigella* spp., *Salmonella* spp., dan *I: enterocolitica*, dianjurkan menggunakan media padat (agar) serba guna dengan selektivitas rendah dan media dengan selektivitas sedang atau tinggi. Agar MacConkey dengan kristal violet dianjurkan sebagai media serba guna. Untuk *I: enterocolitica*, inkubasi agar MacConkey pada suhu 35' C selama 1 hari dan kemudian pada suhu ruang (22-29" C) satu hari lagi. Agar xylosa-lisin-deoksikolat (XLD) dianjurkan sebagai media dengan selektivitas sedang atau tinggi untuk isolasi *Shigella* dan *Salmonella* spp. Agar deoksikolat-sitrat (DCA), agar *enteric hektoen* (HEA), atau agar *Salmonella-Shigella* (SS) merupakan alternatif yang sesuai. *Shigella dysenteriae* tipe 1, *S. sonnei*, dan *E. coli* enteroinvasif tidak tumbuh dengan baik pada agar SS. Walaupun demikian, agar SS dapat digunakan untuk mengisolasi *I: enterocolitica* jika diinkubasi sebagaimana dijelaskan untuk agar MacConkey. Banyak laboratorium yang menggunakan agar bismuth sulfit untuk mengisolasi *Salmonella typhi* dan spesies *Salmonella* lain (Vandepitte and Vorhaegen, 2011)



Gambar 2.3. Beberapa media selektif dan diferensiasi yang telah dirancang memungkinkan untuk pertumbuhan bakteri enterik dari *E. coli*, *Salmonella* dan *Shigella*. Media plating utama ditampilkan di sini adalah eosin metilen biru (EMB) agar, agar MacConkey, agar ENDO, agar Hektoen enterik (HE) dan agar *Salmonella-Shigella* (SS) (Todar, 2011).

Pada dasarnya, konfirmasi diagnosis klinis shigellosis memerlukan isolasi dan identifikasi kuman patogen enterik tersebut. Umumnya digunakan kombinasi media biakan dengan selektivitas sedang dan sangat selektif untuk isolasi *Shigella* dari penderita diare. Meskipun telah banyak dilaporkan penggunaan media biakan tersebut, tetapi masih belum ada kesepakatan mengenai media atau kombinasi

media mana yang paling sensitif dan memberikan hasil paling tinggi serta relatif murah untuk isolasi *Shigella*. Beberapa studi melaporkan bahwa performa agar SS untuk isolasi spesies *Shigella* lebih inferior dibandingkan dengan MAC dan XLD, namun demikian SS agar digunakan di banyak tempat dan merupakan media yang telah mapan di dalam sistem biakan untuk isolasi *Shigella*. Agar SS ini untuk waktu lebih dari 10 tahun tidak pernah dievaluasi efektifitasnya terhadap *Shigella* meskipun dari hasil-Fhasil laboratorium frekuensi isolasi *Shigella* tetap rendah (Surjawidjaja dkk. 2007).

BAB III

SHIGELLOSIS DAN EPIDEMIOLOGI SHIGELLOSIS

3.1. Definisi Shigellosis

Shigellosis adalah penyakit menular yang disebabkan oleh sekelompok bakteri yang disebut *Shigella* (Parker, 2002; Ericson,

2003). Shigellosis atau dikenal juga sebagai disentri basiler merupakan penyakit infeksi saluran cerna atau gastroenteritis yang disebabkan oleh bakteri *Shigella*, ditandai dengan nyeri pada bagian perut, diare dan feses disertai darah dan lendir (Behrman, 2000; Ericson, 2003).

3.1.2. Etiologi Shigellosis

Shigellosis atau disentri basiler disebabkan oleh berbagai spesies dari *Shigella* (Lamps, 2009). Empat spesies *Shigella* yang menyebabkan shigellosis adalah *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* dan *Shigella sonnei* (Parker, 2002; Ericson, 2003).

Shigella tidak mempunyai reservoir alami pada hewan tetapi menyebar dari manusia ke manusia. Bakteri ini hanya ditemukan pada manusia dan beberapa jenis binatang primata (Tortora, 2010).

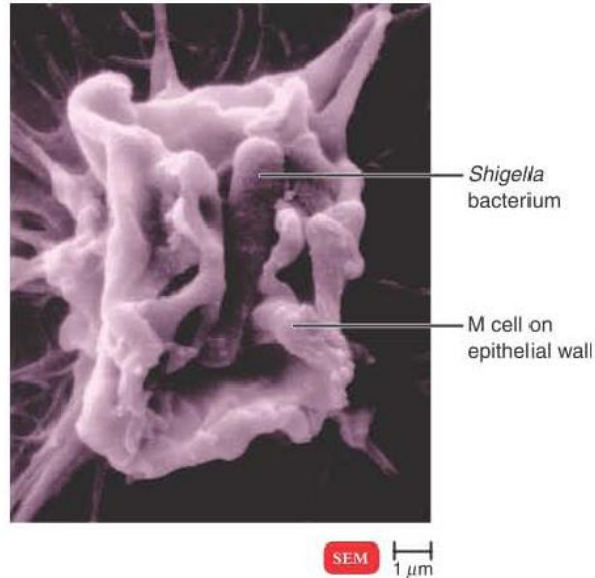
3.1.3. Patofisiologi Shigellosis

Shigellosis ditularkan secara oral melalui air, makanan, dan alat yang tercemar oleh ekskreta pasien. Semua strain *Shigella* menyebabkan shigellosis (Ericson, 2003; Tortora, 2010). Dosis efektif yang diperlukan untuk menyebabkan penyakit sangat kecil, konsumsi bakteri 10⁶-100 organisme saja sudah dapat menyebabkan sakit (Lamps, 2009; Tortora, 2010).

Shigella sebagai penyebab diare mempunyai 3 faktor virulensi yaitu dinding polisakarida sebagai antigen halus, kemampuan mengadakan invasi enterosit dan proliferasi serta kemampuan mengeluarkan toksin sesudah menembus sel. *S.dysenteriae*, *S.flexneri*, dan *S.sonei* menghasilkan eksotoksin antara lain ShET1, ShET2, dan toksin Shiga, yang mempunyai sifat enterotoksik, sitotoksik, dan neurotoksik. Enterotoksin tersebut merupakan salah satu faktor virulen sehingga kuman lebih mampu menginvasi sel epitel mukosa kolon (Ericson, 2003).

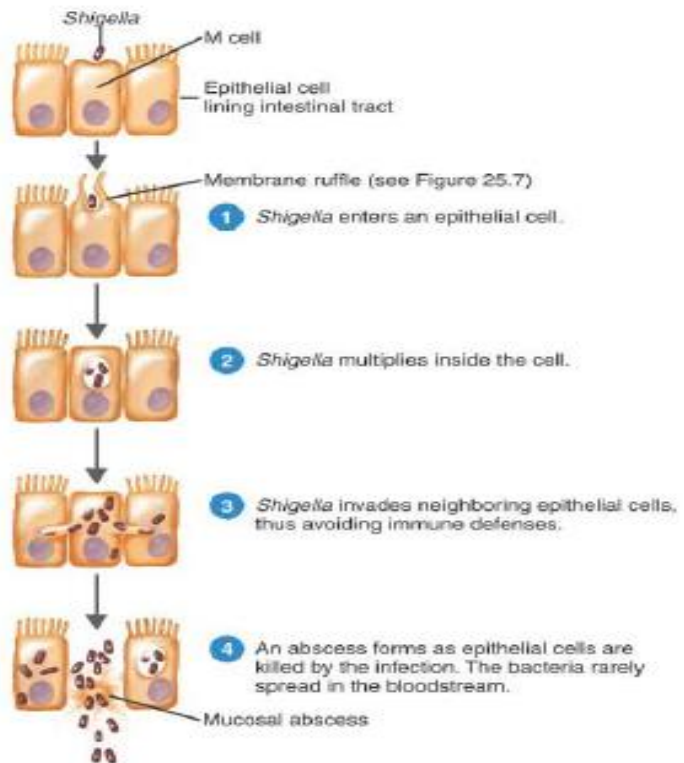
Kuman *Shigella* secara genetik bertahan terhadap pH yang rendah, sehingga dapat melewati barrier asam lambung. Setelah melewati lambung, bakteri akan berkembang biak di usus halus, tetapi kolon merupakan tempat utama yang diserang *Shigella*. Disana bakteri akan menginvasi sel epitel mukosa kolon (Tortora, 2010).

M.cell pada dinding epithelial akan menangkap bakteri dan memasukkannya ke dalam sel, seperti pada gambar berikut :



Gambar . 3.1 Invasi dinding usus oleh bakteri Shigella
(Tortora, 2010)

Bakteri akan memperbanyak diri di dalam sel, menyebar ke beberapa sel di sekitarnya dan menghasilkan shiga toksin yang dapat merusak jaringan dan menyebabkan kerusakan dinding usus.



Gambar 3.2. Proses Infeksi dinding usus oleh *Shigella*
(Tortora, 2010)

Peradangan mukosa memerlukan hasil metabolit dari bakteri dan enterosit, sehingga merangsang proses endositosis sel-sel yang bukan fagositotik untuk menarik bakteri ke dalam vakuola intrasel, yang mana bakteri akan memperbanyak diri sehingga menyebabkan sel pecah dan bakteri akan menyebar ke sekitarnya serta menimbulkan kerusakan mukosa usus. Invasi bakteri ini mengakibatkan terjadinya infiltrasi sel-sel polimorfonuklear dan menyebabkan matinya sel-sel epitel tersebut, sehingga terjadilah tukak-tukak kecil didaerah invasi yang menyebabkan sel-sel darah merah dan plasma protein keluar dari sel dan masuk ke lumen usus serta akhirnya ke luar bersama tinja. *Shigella* juga mengeluarkan toksin (toksin Shiga) yang bersifat nefrotoksik, sitotoksik (mematikan sel dalam benih sel) dan enterotoksik (merangsang sekresi usus) sehingga menyebabkan sel epithelium mukosa usus menjadi nekrosis (Tortora, 2010)

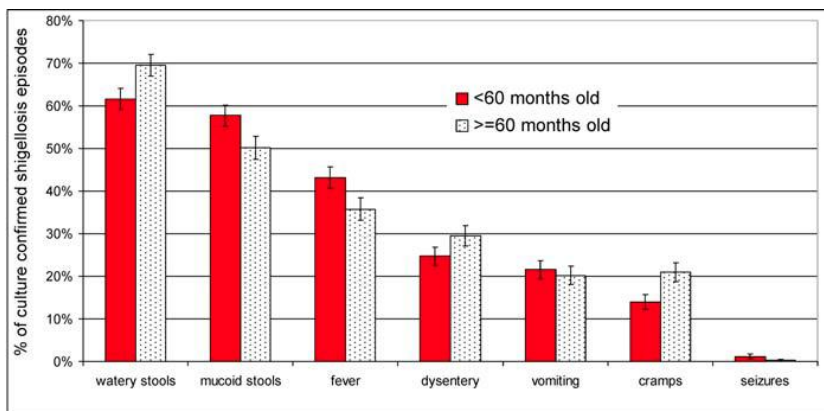
3.1.4. Manifestasi Klinik Shigellosis

Infeksi bakteri pada Shigellosis memerlukan masa inkubasi yang lebih lama yaitu berkisar antara 12 jam sampai 2 minggu (Behrman, 2000). Gejala awal biasanya terjadi 12 - 50 jam setelah mengkonsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi. Pada fase awal pasien mengeluh nyeri perut, diare disertai demam yang mencapai 40°C. Selanjutnya diare berkurang tetapi tinja masih mengandung darah dan lendir, disertai tenesmus dan nafsu makan menurun (Tortora, 2010; Kasper, 2010).

Bentuk klinis dapat bermacam-macam dari yang ringan, sedang sampai yang berat. Pada kasus yang sedang keluhan dan gejalanya bervariasi, tinja biasanya lebih berbentuk, mungkin dapat mengandung sedikit darah/ lendir, sedangkan pada kasus yang ringan, keluhan/ gejala tersebut di atas lebih ringan. Bentuk yang berat (*fulminating cases*) biasanya disebabkan oleh *S. dysenteriae* (Lung, 2003). Gejala biasanya timbul mendadak, berjangkitnya cepat, diare seperti air dengan lendir dan darah, muntah-muntah, cepat terjadi dehidrasi. Akibatnya timbul rasa haus, kulit kering dan dingin, turgor kulit berkurang karena dehidrasi. Muka menjadi berwarna kebiruan, ekstremitas dingin, viskositas darah meningkat, dan dapat meninggal bila tidak segera mendapat pertolongan (Tortora, 2010).

Kematian biasanya terjadi karena gangguan sirkulasi perifer, anuria dan koma uremik. Angka kematian bergantung pada keadaan klinis dan tindakan pengobatan. Angka ini bertambah pada keadaan malnutrisi. Perkembangan penyakit ini selanjutnya dapat membaik secara perlahan-lahan tetapi memerlukan waktu penyembuhan yang lama. Pada penyembuhan infeksi, kebanyakan orang membentuk antibodi terhadap *Shigella* dalam darahnya, tetapi antibodi ini tidak melindungi terhadap reinfeksi (Lamps, 2009).

Berikut ini adalah rata-rata gambaran manifestasi klinis shigellosis yang terjadi pada usia kurang dari 60 bulan dan usia lebih dari 60 bulan :



Gambar 3.3. Gambaran klinis Shigellosis (Seidlein, 2006)

Dalam satu episode shigellosis biasanya ditemukan lebih dari satu tanda gejala klinis (Seidlein, 2006)

3.1.5. Pemeriksaan Diagnostik Shigellosis

Dasar untuk menentukan diagnosis adalah dengan memperhatikan gejala-gejala klinik, pemeriksaan makroskopik dan mikroskopik atas tinja untuk membedakannya dengan infeksi oleh kuman lain misalnya amoeba histolytic (Kasper, 2010). Hal ini sesuai dengan penjelasan Tortora (2010), bahwa diagnostik shigellosis biasanya didasarkan atas temuan dari *rectal swab*.

Pemeriksaan darah rutin kadang didapatkan leukopenia dan apabila sudah terjadi komplikasi HUS (*Hemolytic Uremic Syndrom*) maka didapatkan gambaran anemia hemolitik dan trombositopenia (Ciesla, 2003).

Pada infeksi akut, pemeriksaan proctoscopy menunjukkan radang mukosa usus yang difus, membengkak dan sebagian besar tertutup eksudat. Ulkus –ulkus dapat pula dijumpai, dangkal, bentuk dan ukurannya tidak teratur dan tertutup oleh eksudat yang purulen. Pada infeksi kronis, terlihat jaringan parut pada kolon, proses ulserasi tidak aktif, sedangkan gejala-gejala klinik berganti-ganti antara stadium remisi dan eksaserbasi. Pada waktu kambuh, penderita mengalami demam, diare dengan darah dan lendir serta eksudat seluler dalam tinja. Penderita dengan infeksi kronis, seringkali mengalami kepekaan yang berlebih terhadap beberapa macam makanan misalnya susu, sehingga menimbulkan defisiensi nutrisi (Lung, 2003).

Polymerase Chain Reaction (PCR), pemeriksaan ini spesifik dan sensitif, tetapi belum dipakai secara luas. PCR dapat mendeteksi gen ipaH dari *Shigella* (Sethabutr, 2000). Gen ipaH adalah salah satu faktor virulensi utama yang dibawa oleh plasmid

Shigella. Gen ini berperan pada mekanisme invasi seluler dan mengendalikan penetrasi bakteri di dalam sel epitel. Gen ipaH dibawa oleh semua spesies Shigella dan Enteroinvasive Escherichia Coli (EIEC), tetapi karena EIEC sangat jarang ditemui di Asia sehingga kebanyakan organisme yang terdeteksi oleh ipaH PCR di wilayah Asia adalah spesies Shigella.

Enzim immunoassay juga dapat mendeteksi toksin di tinja pada sebagian besar penderita yang terinfeksi *S.dysenteriae* tipe 1. Sigmoidoskopi biasanya dilakukan pada stadium lanjut. Sebelum pemeriksaan sitologi ini, dilakukan pengerokan daerah sigmoid. Gambaran endoskopi memperlihatkan mukosa hemoragik yang terlepas dan ulserasi. Kadang-kadang tertutup dengan eksudat. Sebagian besar lesi berada di bagian distal kolon dan secara progresif berkurang di segmen proksimal usus besar (Ciesla, 2003).

3.1.6. Komplikasi Shigellosis

Beberapa komplikasi ekstra intestinal shigellosis terjadi pada pasien yang berada di negara yang masih berkembang dan seringkali kejadian ini dihubungkan dengan infeksi *S.dysenteriae* tipe 1 dan *S.flexneri* pada pasien dengan status gizi buruk (Behrman, 2000).

Komplikasi yang sering terjadi akibat infeksi *S.dysenteriae* tipe 1 adalah *haemolytic uremic syndrome* (HUS). HUS diduga akibat adanya penyerapan enterotoksin yang diproduksi oleh *Shigella* (Behrman, 2000). Biasanya HUS ini timbul pada akhir minggu pertama disentri basiler, yaitu pada saat disentri basiler mulai membaik. Tanda-tanda HUS dapat berupa oliguria, penurunan hematokrit (sampai 10% dalam 24 jam) dan secara progresif timbul anuria dan gagal ginjal atau anemia berat dengan gagal jantung. Dapat pula terjadi reaksi leukemoid (leukosit lebih dari 50.000/mikro liter), trombositopenia (30.000-100.000/mikro liter), hiponatremia, hipoglikemia berat bahkan gejala susunan saraf pusat seperti ensefalopati dan perubahan kesadaran (Kasper, 2010).

Komplikasi lain adalah stenosis terjadi bila ulkus sirkular pada usus menyembuh, bahkan dapat pula terjadi obstruksi usus, walaupun hal ini jarang terjadi. Neuritis perifer dapat terjadi setelah serangan *S.dysenteriae* yang toksik namun hal ini juga jarang sekali terjadi (Kasper, 2010).

Komplikasi intestinal seperti toksik megakolon, prolaps rectal dan perforasi juga dapat muncul. Akan tetapi peritonitis

karena perforasi jarang terjadi. Kalaupun terjadi biasanya pada stadium akhir atau setelah serangan berat. Peritonitis dengan perlekatan yang terbatas mungkin pula terjadi pada beberapa tempat yang mempunyai angka kematian tinggi. Komplikasi lain yang dapat timbul adalah hemoroid (Behrman, 2000).

3.1.7. Penatalaksanaan Shigellosis

Prinsip dalam melakukan tindakan pengobatan adalah istirahat, mencegah atau memperbaiki dehidrasi dan pada kasus yang berat diberikan antibiotik. Dehidrasi ringan sampai sedang dapat dikoreksi dengan cairan rehidrasi oral. Jika frekuensi buang air besar terlalu sering, dehidrasi akan terjadi dan berat badan penderita turun. Dalam keadaan ini perlu diberikan cairan melalui infus untuk menggantikan cairan yang hilang, akan tetapi jika penderita tidak muntah, cairan dapat diberikan melalui minuman peroral (Manatsathit, 2002; Ciesla, 2003).

Pengobatan spesifik Menurut pedoman WHO, bila telah terdiagnosis shigelosis pasien diobati dengan antimikroba. Pemberian antimikroba pada shigelosis sudah terbukti memperpendek masa demam, diare dan toxaemia serta dapat mengurangi resiko terjadinya komplikasi (Ashkenazi, 2003).

Di Amerika Serikat, antibiotik direkomendasikan untuk setiap kasus shigelosis. Ciprofloxacin merupakan alternatif pertama yang direkomendasikan sebagai pengobatan shigelosis. Sejumlah obat lain yang telah diuji dan terbukti efektif adalah ceftriaxone, azithromycin dan pivmecillinam (Kasper, 2010).

Tabel 3.1. Rekomendasi antimikroba untuk shigelosis (Kasper, 2010)

RECOMMENDED ANTIMICROBIAL THERAPY FOR SHIGELLOSIS			
ANTIMICROBIAL AGENT	TREATMENT SCHEDULE		LIMITATIONS
	IN CHILDREN	IN ADULTS	
First line			
Ciprofloxacin	15 mg/kg 2 times per day for 3 days, PO	500 mg	
Second line			
Pivmecillinam	20 mg/kg 4 times per day for 5 days, PO	100 mg	Cost No pediatric formulation Frequent administration Resistance emerging
Ceftriaxone	50–100 mg/kg Once a day IM for 2–5 days	—	Efficacy not validated Must be injected
Azithromycin	6–20 mg/kg Once a day for 1–5 days, PO	1–1.5 g	Cost Efficacy not validated MIC near serum concentration Resistance emerges rapidly and spreads to other bacteria

Source: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data: Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1 (www.searo.who.int/LinkFiles/CAH_Publications_shigella.pdf).

Penelitian terbaru di Amerika Serikat menunjukkan bahwa *Shigella dysenteriae*, serta spesies lain dalam genus, menjadi signifikan lebih tahan terhadap antibiotik. Hal ini membuat kasus infeksi oleh *Shigella* lebih sulit diobati, terutama pada anak-anak. *Shigella* menjadi lebih tahan terhadap antibiotik terutama ampicilin dan trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMX). Isolat *Shigella* ini telah disurvei selama empat tahun, dan ada kecenderungan umum dalam meningkatkan angka resistensi terhadap agen antimikroba (Kasper, 2010).

Penularan disentri basiler dapat dicegah dan dikurangi dengan kondisi lingkungan dan diri yang bersih seperti membersihkan tangan dengan sabun, konsumsi air yang tidak terkontaminasi dan penggunaan jamban yang bersih. Pencegahan shigellosis dengan pemberian vaksin sampai saat ini belum direkomendasikan (Seidlein, 2006).

3.2 Epidemiologi Shigellosis

3.2.1 Epidemiologi Shigellosis di Dunia

Shigellosis telah menyebabkan kematian sekitar 600.000 orang setiap tahunnya di dunia (Venkatesan, 2002). WHO melaporkan jumlah kasus shigellosis pada tahun 1966-1997 diperkirakan 165 juta, 69% diantaranya terjadi pada anak usia dibawah 5 tahun. Dari jumlah tersebut angka kematian akibat shigellosis berkisar antara 500.000 -1,1 juta (Kasper, 2010).

Di Amerika Serikat, insidensi penyakit ini rendah. *Centers for Disease Control* (CDC) memperkirakan bahwa sekitar 450.000 kasus shigellosis terjadi setiap tahunnya. Sebagian besar shigellosis disebabkan oleh *Shigella sonnei*, namun yang paling banyak menimbulkan kematian adalah *Shigella dysenteriae*. Kebanyakan kuman penyebab shigellosis ditemukan di negara berkembang dengan kesehatan lingkungan yang masih kurang (Lamps, 2009; Tortora, 2010). Lamps (2009), juga menyebutkan bahwa shigellosis sering terjadi di negara berkembang dan endemik di Afrika, Asia Selatan, dan Amerika Tengah.



Gambar 3.4. Pandemi *shiga dysenteriae* (Levine, 2007)

Menurut Levine (2007), Wabah shigellosis pertama kali ditemukan di Jepang pada 1890-an yang akhirnya teridentifikasi penyebabnya adalah genus *Shigella dysenteriae* 1, diisolasi oleh Kiyoshi Shiga selama wabah terjadi. Di Amerika Tengah pada akhir 1960-an, pandemik *S. dysenteriae* 1 menyebabkan penyakit yang parah dengan banyak komplikasi dan tingkat kematian yang tinggi di seluruh kelompok umur. Pandemi berikutnya terjadi di Asia dan Afrika.

Di negara berkembang, shigellosis menyebabkan kematian sekitar 3 juta penduduk setiap tahun. Angka kejadian shigellosis sangat bervariasi di beberapa negara berkembang. Di Afrika anak-anak terserang infeksi diare 7 kali setiap tahunnya dibanding di negara berkembang lainnya yang mengalami serangan diare 3 kali setiap tahunnya. Sebuah penelitian mengenai penyebab diare disentri pada anak usia 0 - 15 tahun di Salvador, Brazil ditemukan pada hasil kultur tinja, *Shigella* adalah penyebab tersering dan ditemukan pada 141 (54,3%) hasil kultur (Santo, 2005). Di Bangladesh dilaporkan selama 10 tahun (1974 - 1984) angka kejadian disentri berkisar antara 19,3% - 42,0%. Di Thailand dilaporkan disentri merupakan 20% dari pasien rawat jalan rumah sakit anak di Bangkok, namun yang perlu dicatat dan mendapat perhatian bahwa disentri merupakan penyakit yang telah menyebar ke seluruh dunia (Seidlein, 2006).

Proporsi penderita shigellosis di Indonesia dilaporkan dari hasil survei evaluasi tahun 1989-1990 diperoleh angka kejadian shigellosis sebesar 15%. Dari laporan surveilans terpadu tahun 1989 didapatkan 13,3% di puskesmas. Di rumah sakit didapat 0,45% pada penderita rawat inap dan 0,05% pasien rawat jalan

(Ditjen PPM & PLP, 2009). Berdasarkan data Survei Demografi dan Kesehatan Indonesia (SDKI, 1997), prevalensi diare di Jakarta 8,3% dan yang disertai darah 0,52% (Biro Pusat statistik, 1997).

3.2.2. Epidemiologi Shigellosis berdasarkan Strain Shigella

Epidemi shigellosis yang terjadi di Amerika Latin, Asia, dan Afrika sejak tahun 1960-an disebabkan oleh berbagai strain Shigella yaitu *S. flexneri 2a*, *S. dysenteriae 1*, dan *S. sonnei*. *S. dysenteriae 1* (*Shiga bacillus*). Di antara strain Shigella tersebut, *Shigella dysenteriae 1* menyebabkan infeksi yang lebih parah dan berkepanjangan serta paling banyak menyebabkan kematian terutama pada bayi dan orang tua (Venkatesan, 2002).

Di Indonesia berdasarkan hasil survei pada balita di beberapa rumah sakit, menunjukkan proporsi spesies Shigella sebagai etiologi diare; *S.dysenteriae* 5,9%; *S.flexneri* 70,6%; *S.boydii* 5,9%; *S.sonnei* 17,6% (Ditjen PPM & PLP, 2009).

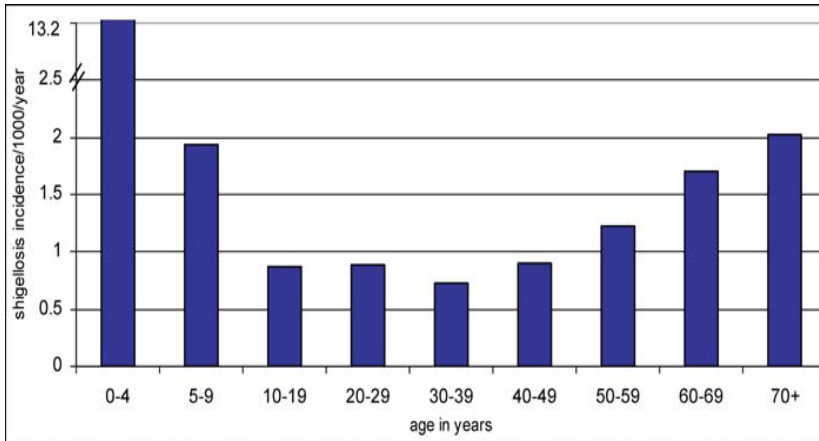
Shigella dysenteriae dan *S.flexneri* sering ditemui di daerah tropis, sedangkan *S.sonnei* lebih sering dijumpai di daerah sub tropis atau daerah industri (Amy, 2004). Hal ini sesuai dengan data dari WHO yang menyatakan bahwa umumnya *S. flexneri*, *S.boydii* dan *S.dysenteriae* paling banyak ditemukan di negara berkembang. Sebaliknya *S.sonnei* paling sering ditemukan dan *S.dysentriae* paling sedikit ditemukan di negara maju (Kotloff, 1999).

Berdasarkan isolasi penderita diare dari RS Karantina Jakarta pada tahun 1980—1985 spesies terbanyak dari *Shigella* ialah *S. flexneri* (47,1%) lalu menyusul *S. dysentriae* (27.4%). Hal ini tidak jauh berbeda dengan apa yang ditemukan di Singapura dan negara ASEAN lainnya (Simanjuntak, 1991).

3.2.3. Epidemiologi Shigellosis Berdasarkan Kelompok Umur

Golongan yang mudah terserang shigellosis terutama adalah balita (1-5 tahun), kemudian anak berumur 6-14 tahun dan urutan ketiga adalah bayi 0-1 tahun, urutan keempat usia lanjut ≥ 60 tahun. Urutan ke lima wanita dewasa 15 – 19 tahun dan laki-laki dewasa 15 – 19 tahun (Seidlein, 2006). Demikian juga menurut Ericson (2003), shigellosis lebih sering terjadi pada anak pra sekolah dari pada bayi.

Berikut adalah gambaran insiden shigellosis di 6 negara di Asia, berdasarkan kelompok usia:



Gambar 3.5. Insiden shigellosis di 6 negara Asia
(Seidlein, 2006)

Gambar di atas menunjukkan bahwa insiden shigellosis adalah 2,1 episode/1000/tahun pada semua usia dan 13.2/1000/tahun pada anak-anak di bawah usia 60 bulan. Insiden shigellosis meningkat setelah usia 40 tahun (Seidlein, 2006).

Di Indonesia berdasarkan hasil Survei Demografi dan Kesehatan 1997 dikatakan bahwa insiden diare ditemukan lebih tinggi pada anak umur 6 – 23 bulan (10%) daripada bayi di bawah umur 6 bulan. Insiden diare selanjutnya mengecil pada anak di atas 36 bulan dan mencapai 4% pada anak umur 48-59 bulan (Ditjen PPM & PLP, 2009).

Temuan di Jakarta, dimana sebuah penelitian surveilans yang dilakukan antara Agustus 2001 dan Juli 2003 menemukan bahwa anak usia 1 sampai 2 tahun memiliki insiden tinggi Shigellosis (32/1000/year) (WHO, 2011).

BAB IV FAKTOR VIRULENSI DAN PATOGENESIS SHIGELLA

4.1 Faktor Virulensi Shigella

Shigella spp. adalah bakteri gram negatif, nonsporulating, berbentuk batang termasuk dalam keluarga *Enterobacteriaceae*, genus *Escherichia* (Amy, 2004; Carneiro et al, 2009). Bakteri ini patogen fakultatif intraseluler yang hanya ditemukan pada manusia dan jenis binatang primata. *Shigella dysenteriae* pertama kali diisolasi oleh Kiyoshi Shiga pada akhir abad ke-19. Pada dekade berikutnya ditemukan spesies lain dari *Shigella*, yaitu *sonnei*, *boydii*, dan *flexneri* (Parker, 2002).

Shigella mempunyai susunan antigen yang kompleks. Sebagian besar bakteri ini mempunyai antigen O yang juga dimiliki oleh kuman enteric lainnya. Antigen somatic O dari *Shigella* adalah lipopolisakarida. Kekhususan serologiknya tergantung pada polisakarida. Terdapat lebih dari 40 serotipe, klasifikasi *Shigella* didasarkan pada sifat-sifat biokimia dan antigennya. Spesies *Shigella* dibagi menjadi 4 kelompok serologik yaitu *Shigella dysenteriae* (13 serotipe), *Shigella flexneri* (14 serotipe), *Shigella boydii* (18 serotipe) dan *Shigella sonnei* (1 serotipe) (Wang et al., 2009).

Tabel 4.1. Spesies Bakteri Shigella (Wang *et al.*, 2009)

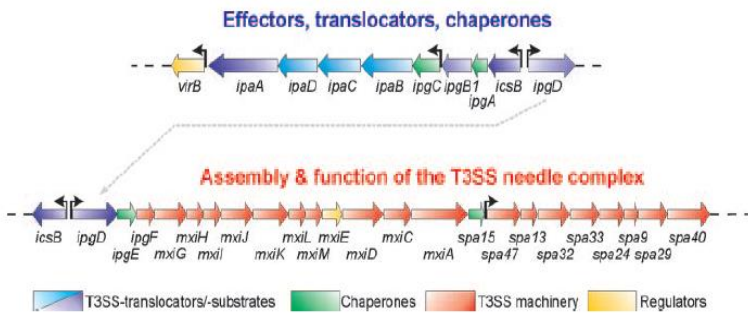
Species	Serotype	No. of strains of each source	Total no.	Microarray result
Shigella clinical isolates used to test the specificity of the probes (n=86)				
<i>Shigella sonnei</i>		1*, 2†	3	<i>S. sonnei</i>
<i>Shigella flexneri</i>	Type 1a	1†, 1‡	2	<i>S. flexneri</i> types 1–5§
	Type 1b	1†, 1‡	2	<i>S. flexneri</i> types 1–5§
	Type 2a	1†, 1‡	2	<i>S. flexneri</i> types 1–5§
	Type 2b	1†, 1‡	2	<i>S. flexneri</i> types 1–5§
	Type 3	1†	1	<i>S. flexneri</i> types 1–5§
	Type 3a	1‡	1	<i>S. flexneri</i> types 1–5§
	Type 3b	1‡	1	<i>S. flexneri</i> types 1–5§
	Type 4a	1‡	1	<i>S. flexneri</i> types 1–5§
	Type 4b	1†, 1‡	2	<i>S. flexneri</i> types 1–5§
	Type 5	1‡	1	<i>S. flexneri</i> types 1–5§
	Type 5a	1†	1	<i>S. flexneri</i> types 1–5§
	Type 5b	1†	1	<i>S. flexneri</i> types 1–5§
	Type 6	1†, 1‡	2	<i>S. flexneri</i> type 6
	Type 6a	1‡	1	<i>S. flexneri</i> type 6
<i>Shigella boydii</i>	Type 1	1†, 1‡	2	<i>S. boydii</i> type 1
	Type 2	1†, 1‡, 1ll	3	<i>S. boydii</i> type 2
	Type 3	1†, 1‡	2	<i>S. boydii</i> type 3
	Type 4	1†, 1‡	2	<i>S. boydii</i> type 4
	Type 5	1‡	1	<i>S. boydii</i> type 5
	Type 6	1†, 1‡	2	<i>S. boydii</i> type 6
	Type 7	1†, 1‡	2	<i>S. boydii</i> type 7
	Type 8	1†, 1‡	2	<i>S. boydii</i> type 8
	Type 9	1†, 1‡	2	<i>S. boydii</i> type 9
	Type 10	1†, 1‡	2	<i>S. boydii</i> type 10
	Type 11	1†, 1‡	2	<i>S. boydii</i> type 11
	Type 12	1†, 1‡	2	<i>S. boydii</i> type 12
	Type 13	1†, 1‡	2	<i>S. boydii</i> type 13
	Type 14	1†, 1‡	2	<i>S. boydii</i> type 14
	Type 15	1†, 1‡	2	<i>S. boydii</i> type 15
	Type 16	1†, 1‡	2	<i>S. boydii</i> type 16
	Type 17	1†, 1‡	2	<i>S. boydii</i> type 17
	Type 18	1†, 1‡	2	<i>S. boydii</i> type 18
<i>Shigella dysenteriae</i>	Type 1	1†, 1‡	2	<i>S. dysenteriae</i> type 1
	Type 2	1†, 1‡	2	<i>S. dysenteriae</i> type 2
	Type 3	1†, 1‡	2	<i>S. dysenteriae</i> type 3
	Type 4	1†, 1‡	2	<i>S. dysenteriae</i> type 4
	Type 5	1†, 1‡	2	<i>S. dysenteriae</i> type 5
	Type 6	1†, 1‡	2	<i>S. dysenteriae</i> type 6
	Type 7	1†, 1‡	2	<i>S. dysenteriae</i> type 7
	Type 8	1†, 1‡	2	<i>S. dysenteriae</i> type 8
	Type 9	1†, 1‡	2	<i>S. dysenteriae</i> type 9
	Type 10	1†, 1‡, 1ll	3	<i>S. dysenteriae</i> type 10
	Type 11	1†, 1‡, 1ll	3	<i>S. dysenteriae</i> type 11
	Type 12	1†, 1‡	2	<i>S. dysenteriae</i> type 12
	Type 13	1‡	1	<i>S. dysenteriae</i> type 13
Other bacterial species used to test the specificity of the probes (n=10)				
<i>Salmonella enterica</i>	O51, O54, O59, O60	4‡	4	Negative
<i>Staphylococcus aureus</i>		1ll, 1¶	2	Negative
<i>Bacillus cereus</i>		2¶	2	Negative
<i>Vibrio cholerae</i>	O48, O64	2‡	2	Negative

4.1.1 Virulensi Plasmid Shigella

Patogenesis seluler dan manifestasi klinis Shigellosis merupakan akibat dari sejumlah faktor virulensi yang dibawa oleh bakteri Shigella. Bagian penting yang diperlukan bakteri untuk invasi intraseluler dikodekan oleh virulensi plasmid (Sansone, 2001). Gen virulensi telah banyak diidentifikasi pada *Shigella flexneri*, sebagian besar gen terletak pada 220 kb plasmid yang dikenal sebagai virulensi plasmid (Amy, 2004). Penelitian terhadap galur Shigella yang berbeda menunjukkan bahwa panjang plasmid sekitar 200 kb mengandung sekitar 100 gen (Buchrieser *et al.*,

2000; Jiang *et al.*, 2005; Venkatesan *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2005). Inti plasmid ditemukan pada panjang 31 kb, diperlukan untuk invasi ke EC (*epithelial cells*) dan membunuh makrofag (Sasakawa, 1993; Schroeder, 2008).

Wilayah-wilayah pada virulensi plasmid dikenal dengan istilah *Pathogenicity Islands* (PAI). Selain PAI pada virulensi plasmid, pada kromosom telah diidentifikasi *Shigella Pathogenicity Islands* (SHI). Fungsi spesifik dari masing-masing virulensi ini ditentukan hanya untuk beberapa gen. Misalnya *Imunoglobulin A-like cytotoxic protease SigA* dan enterotoksin ShET1 dikodekan pada SHI-1, diketahui menyebabkan akumulasi cairan lumen usus pada model hewan coba shigellosis "*rabbit ileal loop*" (Schroeder, 2008). Tabel 1.2. merangkum faktor virulensi SHI yang telah diidentifikasi dari kromosom *Shigella*.



Gambar 4.1. Peta wilayah virulensi plasmid *Shigella flexneri* 31 kb. Gen tersebut menyandikan komponen struktural Mxi-Spa T3SS, sekresi protein translocator, efektor dan chaperon (Schroeder, 2008)

Wilayah-wilayah patogenitas atau *pathogenicity islands* (PAI), terdiri dari 34 gen yang tersusun dalam 2 kelompok (Gambar 4.1), sedangkan berdasarkan fungsinya, gen ini dapat dibagi menjadi 4 kelompok.

Tabel 4.2. Faktor virulensi yang dikode oleh kromosom *Shigella* (Schroeder, 2008)

PAI	Gene(s)	Biochemical activity	Virulence function(s)
SHI-1	<i>sigA</i> <i>pic</i>	Immunoglobulin A-like cytopathic protease Serine protease, mucinase	Intestinal fluid accumulation, cytopathic toxin Mucus permeabilization, serum resistance, hemagglutination
	<i>set1A</i> , <i>set1B</i>	Enterotoxin ShET1	Intestinal fluid accumulation, development of watery diarrhea
SHI-2	<i>iucA</i> to <i>iucD</i> , <i>iutA</i>	Siderophore (aerobactin) production and transport	Iron acquisition
	<i>shiD</i>	Unknown	Colicin I and colicin V immunity
	<i>shiA</i>	Unknown	Downregulation of inflammation by suppression of T-cell signaling
SHI-3	<i>iucA</i> to <i>iucD</i> , <i>iutA</i>	Aerobactin production and transport	Iron acquisition (found only in <i>S. boydii</i>)
SHI-O	<i>grA</i> , <i>grB</i> , <i>grV</i>	Modification of O antigens, serotype conversion	Evasion of host immune response
SRI	<i>fecA</i> to <i>fecE</i> , <i>fecI</i> , <i>fecR</i>	Ferric dicitrate uptake	Iron acquisition
	<i>tetA</i> to <i>tetD</i> , <i>tetR</i>	Efflux system	Tetracycline resistance
	<i>cat</i>	Acetyltransferase	Chloramphenicol resistance
	<i>oxa-1</i>	β -Lactamase	Ampicillin resistance
	<i>aadA1</i>	Adenylyltransferase	Streptomycin resistance

Kelompok pertama terdiri dari protein yang disekresikan oleh *Shigella* yaitu *Type III Secretion Systems* (T3SS) yang bertindak sebagai efektor untuk memanipulasi proses dalam sel inang. Protein ini merupakan antigen imunogenik *Shigella* yaitu *invasi antigen plasmid* (Ipa), yang terdiri dari IpaA, IpaB, IpaC dan IpaD (Schroeder, 2008). Tiga diantaranya yaitu IpaB, IpaC dan IpaD merupakan faktor virulensi *Shigella*. Selain mempunyai fungsi sebagai efektor yang penting untuk invasi bakteri, mereka juga berperan dalam kelangsungan hidup intraseluler serta mengontrol sekresi dan translokasi dari protein efektor lain ke dalam sel inang eukariotik (Menard, 1994; Blocker *et al.*, 1999).

Gen dari kelompok kedua, terdiri lebih dari setengah area plasmid, diperlukan untuk sekresi protein Ipa dan protein efektor lain. Gen ini adalah *membrane expression of ipa* (*mxi*) dan *surface presentation of ipa* (*spa*) (Hromockyj, 1989 dalam Schroeder, 2008). Locus *mxi-spa* mengkodekan komponen yang dibutuhkan untuk perakitan T3SS, yang bersama-sama IpaB, IpaC dan IpaD mengatur translokasi protein efektor dari sitoplasma bakteri ke dalam sel inang (Blocker *et al.*, 1999). Melalui sistem ini sekitar 25 protein dikodekan di lokasi yang berbeda pada virulensi plasmid (Buchrieser *et al.*, 2000).

Selain faktor virulensi dasar tadi, pada area yang lebih dalam terdapat gen kelompok ketiga yaitu dua aktivator transkripsi *VirB* & *mxiE* yang fungsinya mengatur T3SS berhubungan dengan lokasi gen (Kane *et al.*, 2002; Mavris *et al.*, 2002). *mxiE* adalah gen yang terletak dalam locus *mxi/spa* yang

telah teridentifikasi sebagai pengatur transkripsi untuk sejumlah faktor virulensi. *mxiE* hanya diaktifkan apabila bakteri berada dalam sitosol sel epitel, akan mengatur gen virulensi yang digunakan untuk memulai proses infeksi setelah invasi bakteri (Kane *et al.*, 2002).

Kelompok 4 terdiri dari 4 gen chaperon yaitu *IpgA*, *IpgC*, *IpgE* dan *spa15*. Chaperon ini berfungsi untuk menstabilkan T3SS di dalam sitoplasma bakteri. *IpgC* dan *spa15* juga berperan dalam regulasi transkripsi efektor T3SS (Mavris *et al.*, 2002; Parsot, 2003; Parsot *et al.*, 2005).

Tabel 4.3. Faktor virulensi yang dikode virulensi plasmid *S.flexneri* (Schroeder, 2008)

Effector	Biochemical activity	Host cell target(s)	Virulence function and/or phenotype
IpaA	Vinculin activation	Vinculin, β 1-integrins, Rho signaling	Efficient invasion, actin cytoskeleton rearrangements, disassembly of cell-matrix adherence
IpaB	Membrane fusion	Cholesterol, CD44, caspase-1	Control of type III secretion, translocon formation, phagosome escape, macrophage apoptosis
IpaC	Actin polymerization	Actin, β -catenin	Translocon formation, filopodium formation, phagosome escape, disruption of EC tight junctions
IpaD			Control of type III secretion, membrane insertion of translocon
IpaH7.8			Efficient phagosome escape
IpaH9.8	E3 ubiquitin ligase	Splicing factor U2AF, MAPK kinase	Host cell transcriptome modulation, reduction of inflammation
IcsAa (VirG)		N-WASP, vinculin	Recruitment of actin-nucleating complex required for actin-based motility and

			intercellular spread
IcsB			Camouflage of IcsA to prevent autophagic recognition
IcsPa	Serine protease		Cleavage of IcsA, modulation of actin-based motility
IpgB1	ELMO protein	ELMO protein	Induction of Rac1-dependent membrane ruffling
IpgB2	RhoA mimicry	RhoA ligands	Induction of actin stress fiber dependent membrane ruffling
IpgD	Phosphoinositide 4-phosphatase	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	Facilitation of entry, promotion of host cell survival
OspB			T3SS substrate, unknown function
OspC1		Nucleus and cytoplasm	Induction of PMN migration
OspD1			T3SS substrate, unknown function in host cells, antiactivator of MxiE
OspE2		Focal contacts	Maintenance of EC morphology, efficient intercellular spread
OspF	Phosphothreonine lyase	MAPKs Erk and p38	Inhibition of histone phosphorylation and NF- κ B dependent gene expression, reduction of PMN recruitment
OspG	Protein kinase, ubiquitination inhibitor	Ubiquitin-conjugating enzymes	Downregulation of NF- κ B activation, reduction of inflammation

PhoN2 ^a	Apyrase		Unipolar localization of IcsA
SepA ^a	Serine protease		Promotion of intestinal tissue invasion and destruction
VirA	Cysteine protease	α -Tubulin	Facilitation of entry and intracellular motility by degradation of microtubules

4.1.2. Toksin Shigella

Shigella sebagai penyebab diare mempunyai kemampuan mengadakan invasi erosit dan proliferasi serta kemampuan mengeluarkan toksin sesudah menembus sel. Shigella menghasilkan eksotoksin antara lain ShET1, ShET2, dan toksin Shiga, yang mempunyai sifat enterotoksik, sitotoksik, dan neurotoksik. Enterotoksin tersebut merupakan salah satu faktor virulensi sehingga kuman lebih mampu menginvasi sel epitel mukosa kolon (Ericson, 2003).

ShET1 dan ShET2 mempunyai peran dalam menginduksi sekresi cairan lumen usus. ShET1 ditemukan pada kromosom *S. flexneri 2a* dan jarang ditemukan pada serotipe lainnya. ShET2 terdeteksi pada semua spesies Shigella. Toksin Shiga hanya diproduksi oleh *S. dysenteriae 1* (Hale, 1996).

Dua tahun setelah ditemukannya *S. dysenteriae 1*, Flexner menemukan bahwa injeksi parenteral Shigella yang telah dimatikan pada tikus menyebabkan kematian. Atas dasar ini Flexner menyimpulkan bahwa kematian tikus disebabkan oleh racun bukan oleh infeksi. Tiga tahun kemudian, Conradi (1903) menemukan bahwa *S. dysenteriae 1* menyebabkan diare, kelumpuhan anggota badan, dan kematian dalam waktu 48-72 jam setelah injeksi intravena pada kelinci. Faktor tersebut kemudian dikenal sebagai *Shiga neurotoxin* atau *Shiga toxin*. Todd (1904), menemukan bahwa *S. flexneri* juga menyebabkan diare tetapi tidak menyebabkan kelumpuhan. Hal ini menunjukkan bahwa toksin Shiga hanya diproduksi oleh *S. dysenteriae 1* (Niyogi, 2005).

Toksin Shiga memiliki efek neurotoksik, sitotoksik dan enterotoksik. Toksin ini memiliki berat molekul 68.000 dalton. Struktur toksin terdiri dari dua jenis subunit, subunit alpha dan subunit beta. Subunit beta bertanggung jawab untuk mengikat sel inang, sedangkan subunit alpha bertanggung jawab atas keracunan

sel inang (Hale, 1996). Niyogi (2005) juga menjelaskan bahwa toksin Shiga dikodekan oleh kromosom gen dengan dua domain yaitu 1-A dan 5-B.

Efek enterotoksik, toksin Shiga melekat pada reseptor usus kecil dan menghambat penyerapan elektrolit, glukosa dan asam amino di lumen usus. Efek sitotoksik, subunit B dari toksin Shiga mengikat glikolipid sel inang dalam usus besar, domain A menyebabkan inaktivasi subunit ribosomal 60 sehingga menghambat sintesis protein, menyebabkan kematian sel, kerusakan mikrovaskuler usus dan perdarahan (Niyogi, 2005). Eksperimen pada kera yang dipapar *S. dysenteriae 1* menunjukkan bahwa sitotoksin ini menyebabkan kerusakan kapiler dan perdarahan fokal yang dapat memperburuk diare (Hale, 1996).

4.2 Patogenesis Shigella

Shigellosis ditularkan secara oral melalui air, makanan, dan lalat yang tercemar oleh ekskreta pasien. Semua galur *Shigella* menyebabkan shigellosis (Ericson, 2003; Tortora, 2010). Dosis efektif yang diperlukan untuk menyebabkan penyakit sangat kecil, konsumsi bakteri 10⁴-100 organisme saja sudah dapat menyebabkan penyakit (Lamps, 2009; Tortora, 2010).

Shigella secara genetik bertahan terhadap pH yang rendah, sehingga dapat melewati barrier asam lambung. Setelah melewati lambung, bakteri akan berkembang biak di usus halus, tetapi kolon merupakan tempat utama yang diserang *Shigella*. Disana bakteri akan menginvasi sel epitel mukosa usus (Tortora, 2010).

Epitel usus mempunyai beberapa lapisan sistem pertahanan yang berfungsi sebagai penghalang mikroba. Lapisan tersebut terdiri dari 4 komponen utama yaitu *commensal microbiota*, *integrity epithelium*, *rapid epithelial turnover* dan mukosal (Sasakawa, 2010). *Commensal microbiota* di lumen usus dapat bersaing dengan bakteri asing yang akan tumbuh dengan cara mengganggu kolonisasi bakteri di permukaan mukosa. *Integrity epithelium* ditopang oleh sel-sel adherence yang menjadi penghalang fisik dan biologis terhadap mikroba. *Rapid epithelial turnover* ditutupi oleh lapisan musin yang tebal sehingga dapat mencegah mikroba mencapai permukaan sel epitel. Mukosa sebagai sistem kekebalan tubuh berfungsi sebagai pertahanan biologis terhadap infeksi mikroba. Meskipun pertahanannya berlapis, patogen gastrointestinal seperti *Shigella*, *Salmonella*, dan *E. Coli* mampu melewati penghalang usus dan membentuk kolonisasi (Sasakawa, 2010).

Salah satu peristiwa penting pada patogenesis bakteri enteroinvasi adalah penetrasi ke dalam epitel usus. *Shigella* dapat memasuki sel epitel melalui Msel. Msel merupakan struktur folikel limfoid yang tersebar di seluruh permukaan usus kecil, usus besar dan rektum. Msel relatif jarang, ditemukan kurang dari 0,1% epitel pada lapisan usus. Msel memiliki aktivitas endositik yang tinggi yang berfungsi untuk mengangkut larutan dan partikulat antigen di sitoplasma, sehingga Msel menjadi target pintu masuk bagi banyak bakteri patogen. Msel juga mengekspresikan molekul pada permukaannya yang berfungsi sebagai reseptor spesifik untuk patogen (Philpoot *et al.*, 2000)

Patogenesis *Shigella* merupakan mekanisme yang kompleks, melibatkan enterotoksik dan sitotoksik yang berperan pada terjadinya diare, sitokin yang berperan dalam proses inflamasi usus serta nekrosis pada epitelium kolon. Pada tingkat selular, invasi dan penyebaran infeksi dapat dibagi menjadi empat tahap yaitu: (1) Invasi sel; (2) Multiplikasi intraseluler; (3) Penyebaran intraseluler dan interseluler; dan (4) Penghancuran sel inang (Sansone, 1992). Mekanisme ini tergantung pada kemampuan adhesi bakteri terhadap sel dan kemampuan bakteri melintasi mukosa kolon melalui Msel. Kemampuan *Shigella* untuk melintasi mukosa kolon dan berkolonisasi di epitelium usus adalah kunci penyakit ini. Sebagian besar pengetahuan terkini mengenai mekanisme patogenesis *Shigella* berasal dari penelitian *Shigella flexneri* (Sansone, 2004).

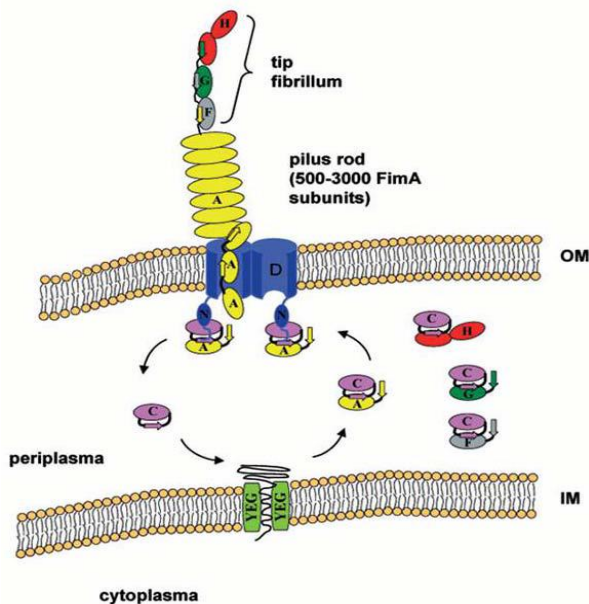
4.2.1 Inisiasi *Shigella* pada Sel Epitel

Bakteri patogen harus menempel pada sel inang untuk memulai terjadinya infeksi. Proses ini diperlukan untuk kolonisasi pada jaringan inang, dan dimediasi oleh permukaan bakteri yang mempunyai sifat adhesin, seperti lectins, mengenali oligosaccharide residu glikoprotein atau reseptor glycolipid pada sel inang (Sharon 1987). Selain itu membran basolateral dari epitel sel mempunyai komponen seluler yang digunakan oleh *Shigella* sebagai reseptor adhesi sel (Amy, 2004).

Keberadaan faktor adhesi spesifik pada permukaan sel bakteri akan menstimulasi jaringan inang untuk mengekspresikan reseptor tertentu pada permukaan selnya. Selain menstimulasi reseptor spesifik, adhesin juga dapat berikatan dengan elemen-elemen struktural membran dasar, seperti kolagen, fibronectin, dan lain-lain (Sharon 1987). Adhesin bakteri terletak pada permukaan sel yaitu pada ujung rambut seperti peritrichous, non-flagellar, dikenal sebagai pili atau fimbriae. Struktur utama

fimbriae dikenal sebagai batang fimbriae atau poros pilus, yang terdiri dari ratusan sampai ribuan pili (Sharon, 1987).

Pili tipe 1 banyak ditemukan pada galur E.coli, keluarga Enterobacteria (Jones *et al.*, 1995). Struktur pili tipe 1 pertama kali diidentifikasi pada tahun 1969 oleh Brinton, menggunakan mikroskop kristalografi, elektron dan difraksi sinar-X. Tahun 2002, Hahn melakukan identifikasi pili menggunakan mikroskop elektron, menunjukkan bahwa organel adhesi dikodekan oleh gen fim cluster (fimA-fimH), memiliki struktur tebal 6,9 nm dan panjang batang heliks 1-2 μm yang dibentuk oleh 500-3000 kopi tangan heliks dari sub unit struktur utama FimA. Batang terhubung melalui FimF ke ujung fibrillum, yang mengandung FimG dan adhesin spesifik fimH (Jones *et al.*, 1995; Hahn *et al.*, 2002).



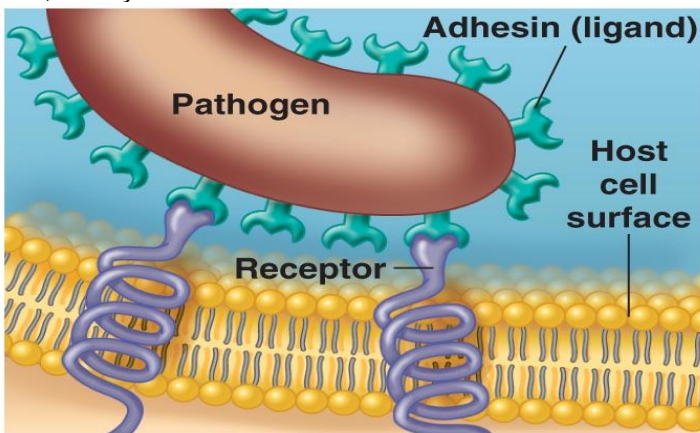
Gambar 4.2. Pili tipe 1 pada bakteri gram negatif. Sub unit pili disekresikan melalui IM (*Inner Membran*) ke dalam periplasma oleh Sec YEG transcolon. Chaperon FimC mempercepat lipatan sub unit pili dan menstabilkan protein dengan bantuan strand untuk melengkapi Ig dari lipatan subunit protein yang belum lengkap, mekanisme ini dikenal sebagai *donor "strand complementation"*. Sub unit Chaperon kemudian dikirim ke FimD transmembran oleh domain N-terminal. Chaperon FimC dikeluarkan kembali ke dalam periplasma setelah donor strand digantikan oleh N.terminal sub unit pili lainnya, mekanisme ini dikenal sebagai *"donor strand*

exchange". Meskipun FimD membentuk pori kembar, hanya satu pori yang digunakan untuk sekresi, sedangkan pori kedua digunakan untuk rekrutmen chaperon pilin. Pilus yang terbentuk terdiri dari tongkat pilus sub unit FimA yang terpolarisasi (kuning) dan tib fibrillum dengan FimF (abu-abu), FimG (hijau) dan ujung adhesin FimH (merah) (Proft, 2009).

Bakteri dengan pili tipe 1 dapat menempel pada jamur, tanaman dan sel hewan termasuk eritrosit (Duguid *et al.*, 1955).

Hemagglutinin merupakan protein adhesi, memainkan peran penting dalam inisiasi dan perkembangan gejala klinis serta komplikasi pada shigellosis (Gbarah *et al.*, 1993; Snellings *et al.*, 1997). Hemagglutinin atau adhesin dapat dideteksi dengan melihat adanya penggumpalan eritrosit oleh fimbriae bakteri, dan bakteri *Shigella dysenteriae* dilaporkan mempunyai sifat hemagglutinin (Guhathakurta *et al.*, 1996).

Adhesi merupakan suatu proses dimana patogen mencapai dan menempel pada sel inang. Adhesi bakteri terjadi melalui beberapa struktur atau reseptor kimia yang disebut faktor adhesin. Pada permukaan sel inang terdapat protein spesifik yang disebut sebagai reseptor. Adhesin bakteri dapat berupa glycoprotein atau lipoprotein yang terdapat pada fimbriae atau pili (Gambar 4.3) (Tortora, 2010).



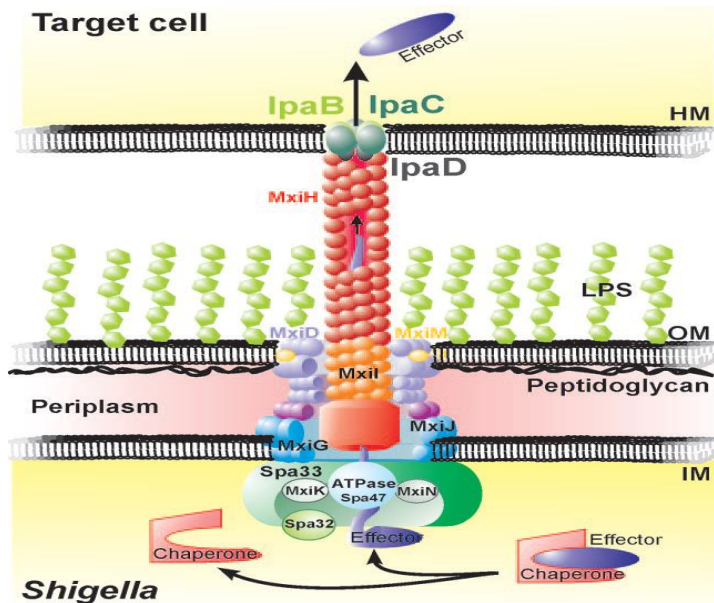
Gambar 4.3. Interaksi antara ligan dan reseptor pada proses adhesi bakteri. Molekul atau protein pada permukaan patogen disebut sebagai adhesin atau ligan, akan berikatan dengan reseptor spesifik yang terdapat pada permukaan sel inang (Tortora, 2010).

4.2.2 Invasi Sel

Shigella mempunyai faktor virulensi yang berperan pada invasi sel, berupa plasmid yang mengkodekan dua lokus yaitu lokus *Invasion plasmid antigens* (Ipa) dan lokus *mxi-spa*. Operon

Ipa mengkodekan IpaA, IpaB, IpaC dan IpaD yang merupakan efektor masuknya bakteri ke dalam sel inang. Operon *mxi-spa* mengkodekan komponen T3SS, merupakan struktur seperti flagella yang digunakan untuk mengirimkan protein, contohnya protein Ipa dari sitoplasma bakteri ke membran sitoplasma atau ke sitosol sel inang (Hueck, 1998 dalam Amy, 2004).

Type 3 secretory system merupakan protein *apendage* yang ditemukan di beberapa bakteri gram negatif. Struktur T3SS menyerupai jarum yang berguna sebagai *probe sensor* untuk mendeteksi keberadaan organisme eukariotik dan mensekresi protein untuk invasi bakteri. Struktur T3SS dapat dilihat pada gambar berikut :



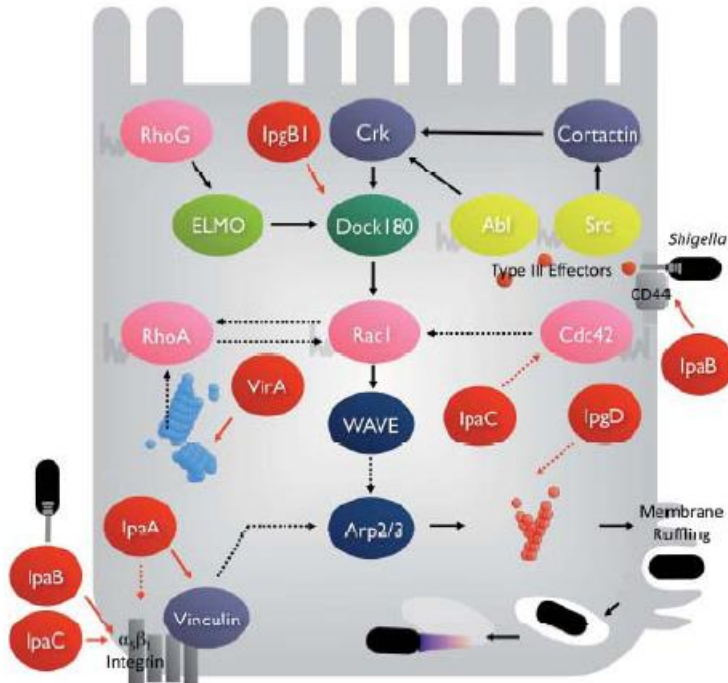
Gambar 4.4. Struktur T3SS *Shigella flexneri*. T3SS terdiri dari empat bagian utama. Basal body atau basis tersusun atas tujuh cincin yang melingkari, IM, periplasma, dan OM. Jarum berongga menonjol dari basis ke permukaan bakteri. Kontak dengan membran sel inang, menginduksi penyisipan IpaD-dibantu oleh membran IpaB-IpaC translocon di ujung jarum. T3SS dilengkapi oleh cincin C sitoplasma, yang terdiri dari protein yang memberi energi untuk proses transportasi, pengaturan pengeluaran substrat dan pengeluaran chaperon (Schroeder, 2008)

Shigella memasuki epitel pada daerah tertentu, yaitu sel M dari *Folikel-Associated Epitel* (FAE), menggunakan T3SS yang dikodekan oleh *mxi-Spa* operon. *Shigella* harus menempel pada sel target untuk mengaktifkan T3SS dan melepaskan efektor di sekitar

permukaan bakteri dan masuk ke dalam sel inang (Sansone, 1998; Boquet, 1998; Boquet, 1999; Nhieu, 1999). Sasakawa, 2010 juga menjelaskan bahwa *Shigella* dapat memprovokasi pembentukan membran ruf yang menonjol dari tempat masuknya bakteri, bakteri akan terjebak dan secara endositosis masuk ke dalam sitoplasma sel.

Operon *mxi-spa* dan *IpaB*, *IpaC* dan *IpaD* sangat penting pada proses invasi bakteri ke dalam epitel sel inang. Protein *Ipa* disintesis dan disimpan dalam bakteri, protein tersebut akan diaktifkan sekresinya pada saat bakteri kontak dengan sel inang (Menard, 1994; Page, 2002). Setelah sekresi diaktifkan maka N-terminus *IpaC* akan mengikat *IpaB* (Harrington, 2003). Kedua protein hidrofobik ini masuk ke dalam membran sel inang dengan membentuk suatu pori (Blocker *et al.*, 1999; Amy, 2004). Hal ini menyebabkan molekul efektor (protein) lain dikirim oleh T3SS ke sitoplasma inang melalui pori ini.

Dua protein penting dalam proses ini adalah efektor *IpaB* dan *IpaC* yang disekresikan di sekitar tempat bakteri menempel. Efektor *IpaB* berinteraksi dengan CD44 dan β 1-integrin, sedangkan efektor *IpaC* berinteraksi dengan β 1-integrin. Kedua efektor tersebut menginduksi kaskade sinyal seluler yang mengakibatkan polimerisasi dan internalisasi aktin *Shigella* (Sasakawa, 2010). Selain itu *IpgD* juga disekresikan melalui T3SS ke dalam sitoplasma sel inang yang berkontribusi pada polimerisasi aktin lokal (Trofa, 1999). *IpaA* dan *IpgD* juga diperlukan untuk pembentukan struktur adhesi seperti titik fokus kontak pada membran sel bakteri. Efektor *IpgB1* yang telah dikirim ke dalam sitoplasma epitel berperan dalam invasi *Shigella*. Ini akan mengaktifkan jalur *Rac1*-*WAVE*-*Arp2/3* dan menginduksi polimerisasi aktin (Sasakawa, 2010). Dengan demikian, interaksi antara efektor bakteri dan protein target inang, yang diatur oleh *Rho*-GTPases, memainkan peran yang sangat penting dalam proses internalisasi *Shigella* ke dalam sel epitel (Mounier, 1999; Torres, 2004). *IpgB1* adalah keluarga *IpgB* yang bertindak sebagai GEF (*GTP exchange factor*) untuk *Rac1* (Sasakawa, 2010). Serangkaian studi menunjukkan bahwa interaksi antara efektor bakteri dan protein target inang diatur oleh GTPases, interaksi memainkan peran penting dalam proses internalisasi ke dalam sel epitel.



Gambar 4.5. Mekanisme Invasi Shigella. Ketika Shigella melekat pada sel epitel, bakteri mengeluarkan beberapa efektor (lingkaran merah) melalui T3SS ke dalam sitoplasma sel inang. Efektor bakteri berinteraksi dengan target molekul inang dan menginduksi beberapa sinyal transduksi yang mampu mengaktifkan rac1-wave-arp2/3, menginduksi polimerisasi aktin serta membentuk tonjolan membran ruffles (Sasakawa 2010).

4.2.3 Multiplikasi Intraseluler

Ketika Shigella masuk ke dalam tubuh melalui rute oral fekal, bakteri langsung bergerak menuju usus besar, bakteri akan memasuki membran apikal sel M dengan cara endositosis. Makrofag dan sel dendritik yang berada dalam kantong sel M akan menerima bakteri dan antigen-antigen dari sel M, kemudian mencernanya dan menghasilkan informasi imunogenik yang diperlukan untuk mengaktifkan sistem kekebalan, namun Shigella dapat menginvasi makrofag. Lepas dari makrofag Shigella dikelilingi oleh membran fagositosis, tetapi Shigella juga dapat merusak membran tersebut sehingga menyebar ke sitoplasma dan berkembang biak di dalamnya (Sasakawa, 2010).

Perbanyakan bakteri dalam sel makrofag menginduksi respon inflamasi dan kemudian sel makrofag mati. Setelah lepas

dari makrofag, *Shigella* menginvasi sel enterosit sekitarnya dari permukaan basolateral sel epitel dengan menginduksi makropinocytosis. *Shigella* terjebak oleh membran vakuola dalam sel epitel tetapi mereka dapat menghancurkan membran vakuola dan menyebar ke dalam sitoplasma sel epitelial, berkembang biak dan menyebar di dalamnya serta menyebar ke dalam sel epitel lainnya. Mereka akan terus menyebar dan memperbanyak diri di enterosit (Ogawa et al., 2008; Ashida, 2009).

Shigella flexneri dapat mengadakan replikasi *in vitro* di dalam sitoplasma sel epithelial dengan waktu 2 X 40 menit. Sel epitel yang diamati mengalami nekrotik seperti kematian selama shigellosis. Awalnya *shigella* akan menyebabkan kerusakan sel epitel akibat respon inflamasi dari inang. *Shigella* akan mendapat keuntungan dari kematian sel epitel karena bakteri yang berada dalam epithelial sel akan terlindung dari sel-sel imun dan ini merupakan lingkungan yang menguntungkan bagi bakteri untuk mengadakan replikasi (Mantis, 1996 dalam Amy, 2004).

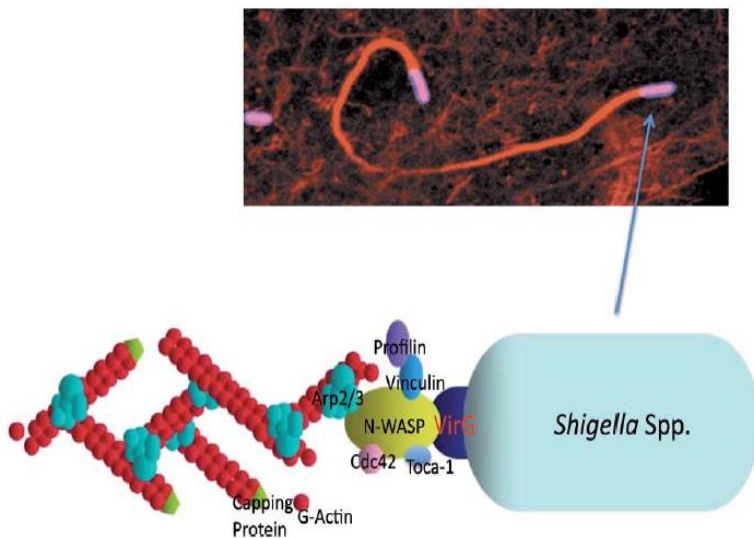
Keuntungan lain bakteri patogen seperti *Shigella* adalah mereka mempunyai kemampuan meredam kecepatan pergantian sel-sel epitel dengan cara memperlambat siklus sel pignitor epitel. Dengan demikian *Shigella* dapat berkolonisasi lebih lama di dalam sel epitel usus. Aktivitas ini diperankan oleh IpaB, salah satu efektor yang disekresikan melalui T3SS dari intraseluler bakteri ke sel pignitor usus di kriptus. Sebuah model hewan coba "*rabbit ileal loop*" yang diinfeksi dengan *Shigella* menunjukkan bahwa selama proses infeksi berlangsung, bakteri mempunyai akses langsung ke kriptus usus, dimana bakteri akan menyerang sel pignitor (Iwai, 2007).

Studi *in vitro* juga menjelaskan bahwa IpaB yang disekresikan dari intraseluler bakteri ke epitel sel menyebabkan siklus sel tertahan oleh Mad2L2. Mad2L2 adalah sebuah kompleks yang menghambat *anaphase promoting complex* (APC) (Iwai, 2007).

4.2.4 Penyebaran Organisme Intraseluler dan Interseluler

Pada tahun 1968, Ogawa dkk melaporkan untuk pertama kalinya bahwa *shigella* interseluler adalah motil dengan pergerakan yang sangat dinamis, dimana kecepatan gerakannya terikat pada lokasi seluler dan tahap pertumbuhan bakteri. Mereka juga menunjukkan bahwa gerakan bakteri berhenti ketika sel hela diberi perlakuan tetrasiklin (Sasakawa, 2010). Dua puluh tahun kemudian, Makino menemukan bahwa outer membran

protein Shigella, Virg, memainkan peran utama dalam penyebaran intra dan antar sel (Makino, 1986 dalam Sasakawa, 2010).



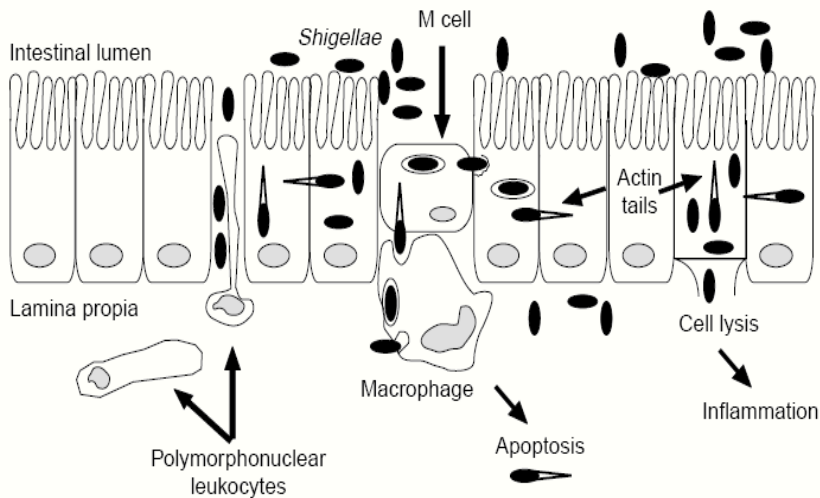
Gambar 4.6. Pergerakan Shigella dengan bantuan ekor aktin.

(a) gambar ekor aktin dari satu kutub bakteri menggunakan *confocal immunofluorescence*. (b) Mesin yang dipergunakan untuk pergerakan bakteri terdiri dari VirG (protein *outer-membrane* bakteri), N-WASP, Arp2/3 complex, Profilin, and Toca-1, terakumulasi pada satu kutub bakteri untuk polimerisasi aktin (Sasakawa, 2010).

Penelitian lain menjelaskan bahwa Virg sebagai protein mampu menginduksi polimerisasi aktin dengan bantuan beberapa protein inang (Lett, 1989 dalam Sasakawa 2010). Studi yang luas juga dilakukan dengan bakteri patogen lain yang mengungkap bahwa beberapa mikroba seperti *Listeria*, *Riketsia* dan *Mycobacterium* juga mampu menginduksi polimerisasi aktin untuk bergerak di dalam maupun ke dalam sel yang berdekatan. Gerakan intraseluler bakteri ini selanjutnya disebut “*actin-based motility*”. Untuk mendapatkan kekuatan daya dorong, patogen memanfaatkan komplek Arp2/3 dari sel inang (Cossart, 2004; Gouin, 2005).

Shigella mampu memanfaatkan perakitan aktin sel inang untuk bergerak melalui sitoplasma sel inang dan masuk ke dalam sel epitel yang berdekatan. Penyebaran intra dan interseluler adalah langkah penting dalam virulensi *Shigella* (Amy, 2004).

Setelah diinternalisasikan ke dalam sel inang, *Shigella* yang dikelilingi oleh membran vakuola yang membungkusnya, akan dilepaskan ke dalam sitosol. Setelah mikroorganisme lepas dari vakuola, *Shigella* terakumulasi protein Virg pada satu kutub bakteri membentuk ekor aktin. Virg (ICSA) menarik saraf *Wiskoff-Aldrich syndrome protein* (N-WASP), yang kemudian diaktifkan melalui interaksi dengan Cdc42 dan Toca-1. N-WASP bertindak sebagai adaptor serta stimulator untuk berinteraksi dengan dan mengaktifkan Arp2 / 3 kompleks.

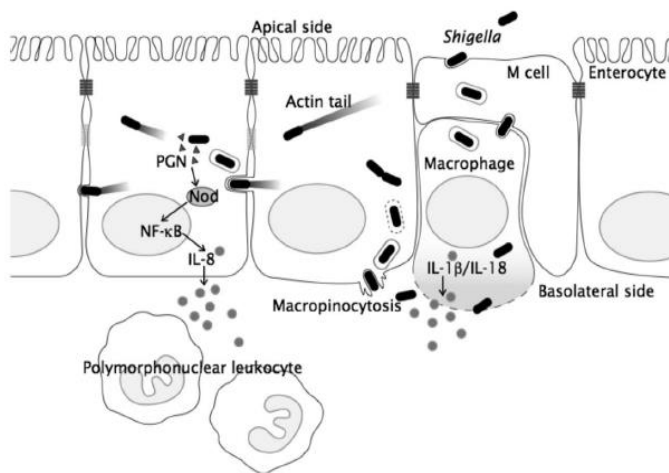


Gambar 4.7. *Shigella* masuk dan menyebar di dalam sel epitel. Bakteri tidak langsung menyerang epitel usus. Bakteri masuk ke dalam sel M dengan menginduksi endositosis. *Shigella* menerobos endocytic vakuola dan menggunakan aktin sitoskeleton sel untuk menyebar dari sel ke sel lainnya. Kemudian mereka menyerang sel-sel epitel dan makrofag. Tahap pertama dari inflamasi disebabkan oleh apoptosis makrofag. Dalam sitoplasma *Shigella* berkembang biak dan menyebabkan kematian sel berikutnya hingga epitelial terinfeksi. Hal ini menyebabkan respon inflamasi (leukosit polimorfonuklear), perdarahan dan pembentukan abses (Torres, 2004).

Dengan beberapa protein inang lain cytoskeletal dan vinculin, Arp2/3 kompleks langsung diaktifkan dengan tindakan polimerisasi pada satu kutub bakteri, membentuk ekor aktin (Egile,

1999; Nhieu, 1999). Ekor aktin mendorong bakteri melalui sitoplasma. Setelah bakteri bergerak mencapai plasma membran sel, menyebabkan membran menonjol. Membran yang menonjol tersebut membentuk jari seperti proyeksi dari permukaan sel yang terinfeksi ke permukaan sel yang tidak terinfeksi. Tonjolan ini kemudian ditelan oleh sel disebelahnya yang belum terinfeksi, dan memulai kembali siklus infeksi pada sel inang (Sansonetti *et al.*, 1999).

Sasakawa (2010) juga menjelaskan bahwa pada kasus *Shigella* selama multiplikasi, bakteri terakumulasi protein Virg di salah satu kutub bakteri dan protein tersebut akan menarik N-WASP. Selanjutnya N-WASP akan berinteraksi dengan Cdc42 dan Toca-1 untuk mengaktifkan kompleks Arp 2/3. Dengan beberapa protein tambahan dari inang seperti aktin dan prolin, kompleks Arp2/3 diaktifkan dan terjadilah polimerisasi aktin pada salah satu tiang bakteri sehingga menyebabkan bakteri terdorong ke dalam sitoplasma. Bakteri selanjutnya akan bergerak menuju membran plasma, menyebabkan membran menonjol. Tonjolan tersebut digunakan sebagai endositosis oleh sel sebelah lainnya. Bakteri akan memperbanyak diri kembali di sitoplasma baru.



Gambar 4.8. Model infeksi *Shigella* di epitelial usus (Sasakawa, 2010)

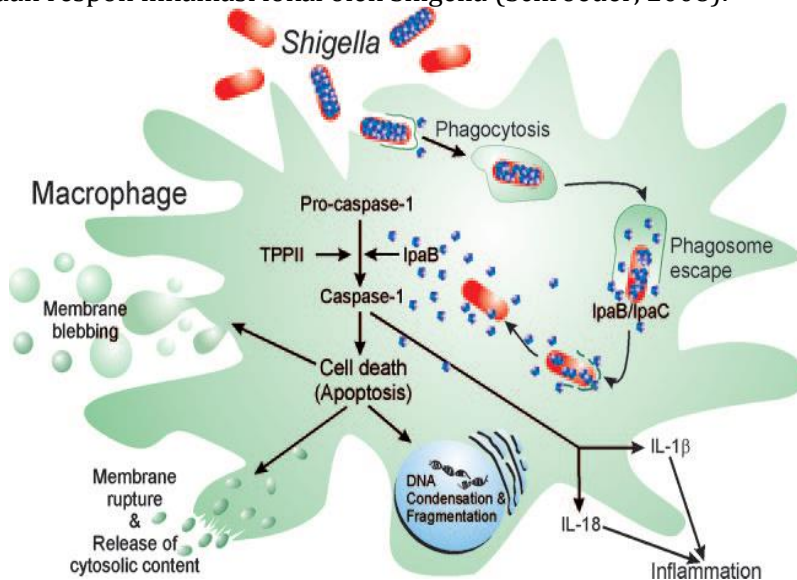
Jaringan mikrotubulus (MT) menjadi kendala bagi pergerakan bakteri. Oleh karena itu selain aktivitas bakteri dalam menginduksi polimerisasi aktin, *Shigella* membutuhkan aktivitas aktin untuk menghancurkan MT (Yoshida *et al.*, 2002). Proses penghancuran MT dilakukan oleh efektor virA yang disekresikan

ke permukaan bakteri melalui T3SS. Hal ini dibuktikan oleh Yoshida *et al* (2006) dalam suatu penelitiannya yang menyatakan bahwa gerakan bakteri dalam sel inang terhenti ketika gen virA dihilangkan dari *Shigella*.

4.2.5 Penghancuran Sel Hospes

Shigella awalnya melintasi lapisan epitel melalui M sel, dimana folikel limfoid akan berhubungan dengan mukosa kolorektal, dan dari sinilah pintunya, kemudian berinteraksi dengan (1) makrofag dan sel dendritik (2) sel-sel epitel usus melalui kutub basolateral (Phalipon dan Sansonetti, 2007). Penggunaan Msel sebagai pintu masuk bakteri sesuai dengan pengamatan invitro bahwa *Shigella flexneri* hampir tidak pernah berinteraksi dengan permukaan apikal EC tetapi masuk melalui kutub basolateral (Schroeder, 2008).

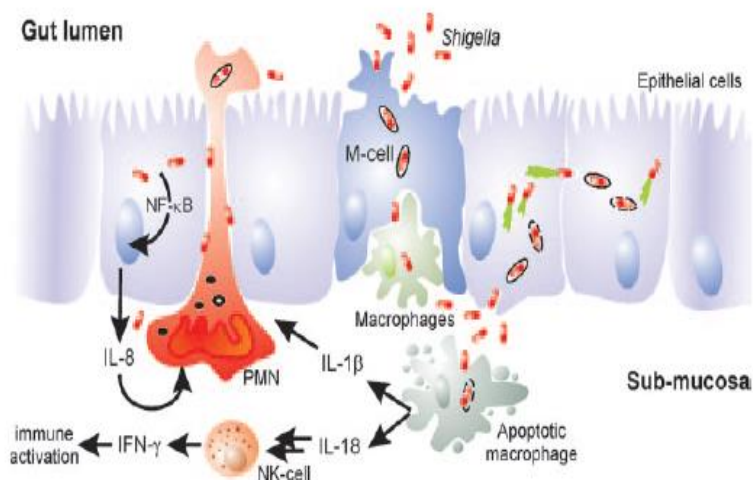
Setelah transcytosis, *Shigella* dilepaskan ke intra epithelial, dimana bakteri akan menghadapi makrofag. Makrofag akan menelan bakteri dan menyediakan bahan-bahan untuk kelangsungan hidup bakteri, kemudian bakteri akan melawan makrofag dengan menginduksi *apoptosis-like cell death*. Kematian sel makrofag disertai dengan pelepasan sitokin pro inflamasi interleukin 1 (IL1) dan IL18 (Sansonetti, 2000). Kedua sitokin tersebut merupakan mediator penting dari respon inflamasi akut dan respon inflamasi lokal oleh *Shigella* (Schroeder, 2008).



Gambar 4.9. *Shigella flexneri* menginduksi kematian makrofag. Tergantung pada Mxi-Spa T3SS, *S. flexneri* mengeluarkan translocators/efektor IpaB dan IpaC untuk melarikan diri dari phagosome. Di sitoplasma, sisa IpaB secara bertahap dikeluarkan. Sekresi IpaB memicu pengaktifan proteolitik procaspase-1. Aktifnya caspase-1 menyebabkan kematian sel dan menginduksi sitokin proinflammatory IL-1 dan IL-18 (Schroeder, 2008).

Interleukin 1 memberikan sinyal yang kuat untuk memicu proses peradangan usus. IL18 merupakan respon antibakteri yang efektif (Li *et al.*, 2007). Interleukin 18 mengaktifkan NK (*Natural Killer*) sel dan meningkatkan produksi IFN γ , dengan demikian akan meningkatkan respon imun bawaan (Le-Barillec *et al.*, 2005).

Setelah lepas dari makrofag, *Shigella* mampu menyerang EC dari sisi basolateral. Kemudian setelah lolos dari phagosome, bakteri akan mengadakan replikasi di sitoplasma (Schroeder, 2008). Di dalam sitoplasma bakteri akan bergerak dengan arah ekor aktin yang memungkinkan bakteri menyebar ke EC yang berdekatan. Bakteri harus menghindari paparan komponen ekstraseluler yaitu pertahanan imun dari inang. *Shigella* kemudian mengaktifkan NF-B (*Nuclear Factor B*) yang memicu kembali regulasi dan sekresi IL8 (Philpoot *et al.*, 2000; Girardin *et al.*, 2003; Pedron, 2003). IL8 memediasi rekrutmen leukosit *polymorphonuclear neutrophil* (PMN) ke tempat terjadinya infeksi (Sansonetti *et al.*, 1999). *Shigella* mengeluarkan protein efektor yang secara aktif membentuk respon transkripsi EC yang terinfeksi untuk memicu perpindahan PMN (Zurawski *et al.*, 2006). Infiltrasi PMN akan merusak lapisan epitel sehingga memungkinkan bakteri mencapai submukosa tanpa melalui Msel (Schroeder, 2008).



Gambar 4.10. Patogenesis seluler *Shigella flexneri*. Bakteri melewati penghalang EC dengan cara transcytosis melalui sel M dan bertemu dengan makrofag. Bakteri menghindari degradasi dalam makrofag dengan menginduksi "apoptosis-like cell death", yang disertai sinyal proinflammatory. Bakteri menyerang EC dari sisi basolateral, pindah ke sitoplasma dengan bantuan ekor aktin, dan menyebar ke sel-sel yang berdekatan. Sinyal proinflammatory selanjutnya akan mengaktifkan respon imun yaitu sel NK dan menarik PMN. Masuknya PMN akan merusak lapisan EC dan memperparah infeksi (Schroeder, 2008).

Shigella melemahkan pertahanan EC dengan merubah komposisi protein *tight junctions* (Sakaguchi *et al.*, 2002). Makrofag akan mati, terjadi kerusakan lapisan epitel, dan masuknya PMN akan memperburuk infeksi bakteri sampai terjadi lesi jaringan. Inilah yang akan berkembang menjadi diare dan karakteristik patologi shigelosis lainnya. Invasi bakteri mengakibatkan terjadinya infiltrasi sel-sel polimorfonuklear dan menyebabkan matinya sel-sel epitel tersebut, sehingga terjadilah tukak-tukak kecil di daerah invasi yang menyebabkan sel-sel darah merah dan plasma protein keluar dari sel dan masuk ke lumen usus serta akhirnya ke luar bersama tinja.

BAB V

RESPON IMUN DAN PERKEMBANGAN VAKSIN SHIGELLA

5.1. sistem imun saluran cerna

5.1.1. Gambaran Umum sistem imun

Lingkungan di sekitar manusia mengandung berbagai jenis unsur patogen, misalnya bakteri, virus, fungus, protozoa dan

parasit yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia. Infeksi yang terjadi pada orang normal umumnya singkat dan jarang meninggalkan kerusakan permanen. Hal ini disebabkan karena tubuh manusia memiliki suatu sistem yang disebut sistem imun (Kresno, 2010). Sistem imun adalah sistem yang melaksanakan semua mekanisme yang digunakan tubuh untuk mempertahankan keutuhan tubuh dan merupakan perlindungan terhadap berbagai patogen di lingkungan hidup, baik intraseluler maupun ekstraseluler. Fungsi utama sistem imun adalah menyingkirkan patogen dan meminimalkan kerusakan yang ditimbulkan (Male, 2001). Sistem imun akan memberikan respon dan melindungi tubuh dari unsur-unsur patogen tersebut (Kresno, 2010).

Respon imun adalah respon tubuh yang berupa urutan kejadian yang kompleks terhadap antigen, untuk mengeliminasi antigen tersebut (Goldsby *et al.*, 2000; Male 2001; Matondang 2007). Respon imun sangat bergantung pada kemampuan sistem imun untuk mengenali molekul asing (antigen) yang terdapat pada patogen potensial dan kemudian membangkitkan reaksi yang tepat untuk menyingkirkan sumber antigen bersangkutan (Kresno, 2010). Fungsi respon imun dibagi dalam dua aktivitas yaitu tahap pengenalan dan tahap merespon. Respon imun ini dapat melibatkan berbagai macam sel dan protein, terutama makrofag, sel limfosit, komplemen dan sitokin yang bereaksi secara kompleks (Goldsby *et al.*, 2000; Male 2001; Matondang 2007).

Respon imun terdiri dari mekanisme pertahanan non-spesifik dan spesifik (Gambar 2.1). Mekanisme pertahanan non-spesifik disebut juga komponen nonadaptif atau *innate* atau imunitas alamiah, artinya mekanisme pertahanan yang tidak hanya ditujukan untuk satu jenis antigen, tetapi untuk berbagai macam antigen. Selain berfungsi dalam pengenalan antigen sebagai benda asing dan mempunyai kemampuan dalam melemahkan patogen, imunitas *innate* juga berperan sebagai jembatan penghubung dengan imunitas adaptif dalam mengaktifkan sel-sel imun dari sistem imun adaptif seperti limfosit T. Berbagai fagosit yang berperan dalam imunitas alami antara lain makrofag monosit dan *polimorfonuklear* atau PMN (Matondang, 2007).

Mekanisme pertahanan tubuh spesifik atau komponen adaptif atau didapat adalah mekanisme pertahanan yang ditujukan khusus terhadap satu jenis antigen, karena itu tidak dapat berperan terhadap antigen jenis lain. Bedanya dengan pertahanan tubuh nonspesifik adalah bahwa pertahanan tubuh spesifik harus kontak atau ditimbulkan terlebih dahulu oleh antigen tertentu, baru ia

akan terbentuk (Matondang, 2007). Dibanding dengan imunitas alami maka imunitas adaptif mempunyai keistimewaan yaitu spesifitas dan memori. Imunitas adaptif mempunyai kemampuan dalam mengenali benda asing sehingga terjadi proses sensitisasi sel imunokompeten tersebut (tabel 2.1). Sistem imun akan memberikan respon lebih cepat dan kuat pada paparan kedua dan demikian seterusnya (Male, 2001; Matondang, 2007).

Tabel 5.1. Perbedaan utama sistem imun bawaan dan sistem imun adaptif (Kresno, 2010)

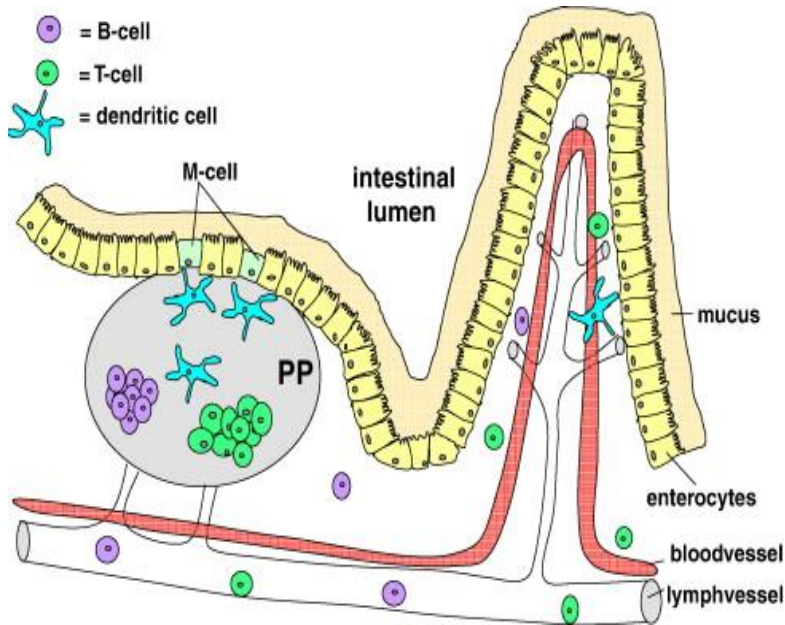
	Sistem Imun bawaan	Sistem Imun adaptif
Spesifitas	Untuk struktur yang dimiliki bersama oleh mikroba sejenis	Untuk antigen mikroba dan nonmikroba
Diversitas	Terbatas (ditentukan secara genetik (<i>germline encode</i>))	Sangat luas, reseptor dibuat melalui rekombinasi segmen-segmen gen
Memori	Tidak ada	Ada
Tidak bereaksi dengan self	Ya	Ya
Protein darah	Komplemen dan lain-lain	Antibodi
Jenis sel	Fagosit (makrofag, neutrofil), sel NK	Limfosit
Jenis pertahanan seluler dan kimiawi	Kulit, epitel, mukosa	Limfosit dalam epitel, antibodi yang disekresi pada permukaan epitel

Perbedaan utama antara kedua jenis respon imun itu adalah respon imun spesifik menunjukkan diversitas yang sangat besar, sistem imun spesifik menunjukkan tingkat spesialisasi yang cukup tinggi, ini berarti bahwa mekanisme respon imun terhadap berbagai jenis antigen tidak sama, sistem imun spesifik mampu mengenal kembali antigen yang pernah dijumpainya (memiliki memori), sehingga paparan berikutnya akan meningkatkan efektifitas mekanisme pertahanan tubuh. Sifat-sifat demikian tidak dimiliki oleh sistem imun bawaan (Kresno, 2010).

5.1.2. Sistem imun mukosa saluran cerna

5.1.2.1. Komponen dalam sistem imun mukosa saluran cerna

Dua komponen penting dari sistem kekebalan usus adalah enterosit dan *gut-associated lymphoid tissue* atau GALT (Volman, 2008).



Gambar 5.1. Skema sistem kekebalan usus. Komponen-komponen penting dari sistem kekebalan usus yaitu enterosit dan *gut-associated lymphoid tissue* atau GALT (Volman, 2008)

Gambar di atas menunjukkan komponen-komponen penting dari sistem kekebalan usus yaitu enterosit dan *gut-associated lymphoid tissue* (GALT) yang terdiri dari berbagai sel-sel imun (*T-cells*, *B-cells*, *dendritic cells* dan *M-cells*) di usus halus membentuk cluster dalam folikel yang dikenal sebagai *Peyer's Patch* atau PP (Volman, 2008)

Berikut ini berapa komponen penyusun mukosa saluran cerna yang berperan dalam sistem imun :

5.1.2.1.1. Enterosit

Enterosit berada di puncak vili dengan fungsi digestif, absorptif dan protektif. Enterosit juga merupakan tempat melekatnya 500 spesies kuman. Setiap sel saling berhubungan melalui desmosome dan protein penyusun dalam ikatan yang erat

(Walker, 2000; Kraehenbuhl & Neutra, 2004; Yuan & Walker, 2004).

Enterosit pada usus halus dibentuk dari sel-sel yang tidak berdiferensiasi yang membelah secara aktif di kriptus lieberkuhn. Sel-sel ini bermigrasi ke ujung vilus, mengalami apoptosis dan dilepaskan ke lumen usus dalam jumlah besar. Lama hidup rata-rata sel ini adalah 2-5 hari, bergantung pada spesies. Pada manusia, jumlah sel yang dilepaskan perhari sekitar 17 miliar, dan jumlah protein yang disekresikan dengan cara ini adalah sekitar 30 g/hari (Ganong, 2001).

5.1.2.1.2. Jaringan Limfoid

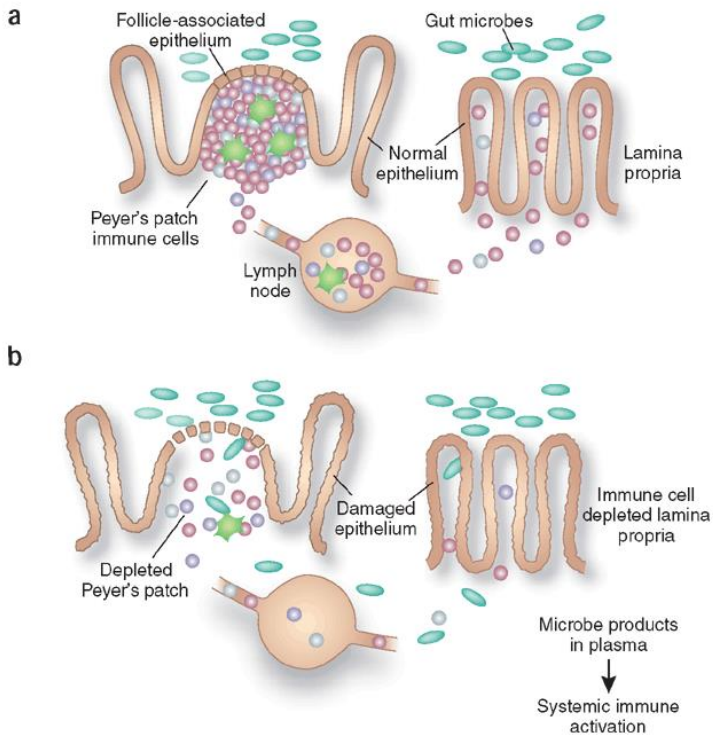
Jaringan limfoid mukosa terletak pada lamina propria. Di dalam lamina propria terdapat beberapa serat saraf tanpa selubung mielin kecil, eosinofil, sel mast, fibroblas, makrofag dan sel otot polos (MacDonald, 2003). Pada ileum terdapat agregasi besar yang terorganisasi dari jaringan limfoid yang disebut dengan *Peyer's patch*. Pada umumnya terdiri dari susunan folikel di bagian tengah (*follicle center*) dan permukaannya diliputi oleh lapisan limfosit kecil, yang disebut *follicle-associated epithelium* (FAE), yang tidak mempunyai fungsi sekretori namun memiliki sel yang disebut *microfold* (M). Sel M merupakan tempat masuknya virus atau bakteri enteropatogen di usus. Sel M mempunyai peranan penting dalam antigen-sampling dimana *antigen presenting cell* (APC) hanya akan memberikan respon terhadap antigen yang masuk dan mengalami translokasi oleh sel M (Bauer *et al.*, 2004; Bland *et al.*, 2006).

Respon imun adaptif membutuhkan organ limfoid untuk memulai respon antigen spesifik terhadap patogen tertentu. Organ limfoid dari sistem imun mukosa secara struktur dan fungsi dibagi menjadi *induction site* yaitu tempat dimana antigen diambil dan diproses pada saat induksi, dan *effector site* yaitu tempat didapatkannya sel-sel imun yang telah mengalami maturasi (limfosit, granulosit dan sel mast). *Induction site* dari imunitas mukosa ini disebut sebagai *Mucosa-associated lymphoreticular tissue* (MALT). MALT yang terletak di usus disebut sebagai *gut-associated lymphoreticular tissue* (GALT). *Gut-associated lymphoid tissue* yang sejati pada manusia adalah *peyer's patches*, *small intestinal isolated lymphoid follicles*, *appendix*, dan *colonis lymphoid follicles*, sedangkan mukosa lamina propria dan epitel usus merupakan *effector site* (Neurath *et al.*, 2002; Bland *et al.*, 2006).

Pada *Peyer's patch* terdapat bagian penting yang disebut

sebagai *follicle center* yang terdiri atas *centrocytes* dan *centroblast*. Sel-sel yang banyak terdapat di *follicle center* adalah sel plasma, sel dendritik, makrofag, sel B, dan beberapa sel T. *Peyer's patch* dianggap pencetus imunitas mukosal, karena mengandung pendahulu limfosit B yang melakukan migrasi dan menghuni lamina propria. Sel ini pada akhirnya akan mensintesis dan mensekresi imunoglobulin terutama IgA (MacDonald & Monteleone, 2005; Bland *et al.*, 2006).

Mayoritas sel T yang terdapat di *Peyer's patches* adalah sel T CD4+ (*helper* atau *inducer*) dan secara fenotip merupakan sel yang matur. Kurang lebih 2/3 dari sel T ini akan mengekspresikan $\alpha\beta$ T-cell receptor (TCRs) yang merupakan reseptor dari sel T CD4+, sedang sepertiga sisanya adalah sel T CD8+ yang terdiri dari prekursor limfosit T *cytotoxic* (Neurath *et al.*, 2002; Bland *et al.*, 2006). Sel T CD4+ yang terdapat di area subepitelial (*Lymphoepithelium*) pada *follicle center* dari *Peyer's patches* terutama terdiri dari sel tipe myeloid yang akan menginduksi sel CD4+ Th2, sedang pada area *parafollicular* terutama terdiri dari sel tipe lymphoid, yang lebih menginduksi pembentukan sel CD4+Th1. Sel-sel limfoid di *Peyer's patches* secara terus menerus akan menghasilkan sitokin yang diproduksi oleh *interferon- γ secreting cells*, *IL-4 secreting cells*, *IL-5 secreting cells* atau *IL-10 secreting cells*. Sel dendritik di *Peyer's patches* juga menghasilkan lebih banyak IL-10 dan lebih sedikit IL-12. Dengan keberadaan sitokin-sitokin ini menyebabkan secara normal *Peyer's patches* adalah *strong Th2 environment* (Fujihashi *et al.*, 2005; Bland *et al.*, 2006).



Gambar 5.2. Translokasi mikroba dapat mengaktifkan kekebalan pada infeksi HIV kronis. (a) epitel usus halus normal mengandung *follicle-associated epithelium* (FAE) yang mengkhususkan diri dalam transportasi antigen ke sel limfoid di *Peyer's patches*. Sel imun berjalan dari *Peyer's patches* melalui getah bening dan sirkulasi sistemik ke situs efektor dalam lamina propria usus halus. (b) Pada infeksi HIV kronis terjadi penurunan sel-sel imun di lamina propria, terjadi kerusakan pada epitelium yang mengakibatkan produk mikroba dalam plasma. Produk-produk mikroba tersebut akan mengaktifkan sistem kekebalan sistemik (Haynes, 2006).

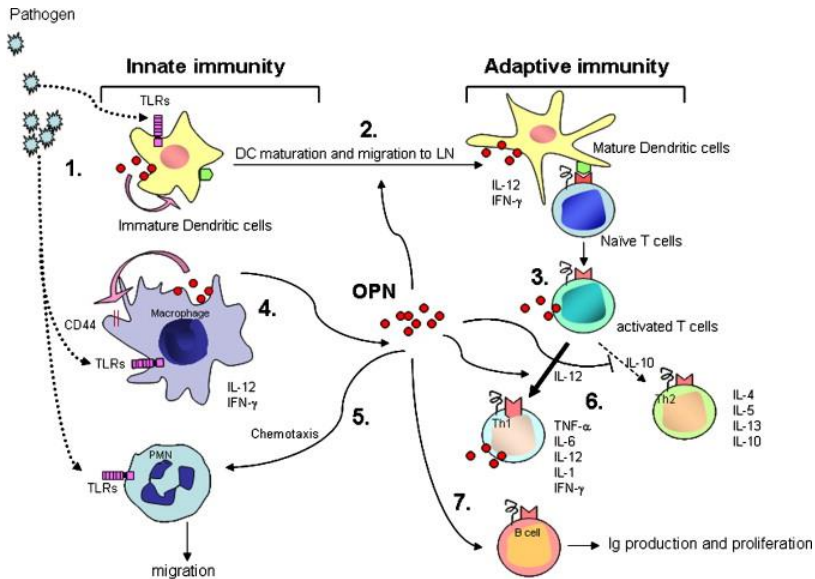
Sel limfoid, nodul limfoid dan *Peyer's patch*, bersama dengan limfosit intra epithelial dinamakan GALT (*Gut associated Lymphoid Tissue*). GALT merupakan garis depan pertahanan tubuh terhadap mikroba enterik dan bahan antigen (MacDonald & Monteleone, 2005; Bland *et al.*, 2006).

Gut associated Lymphoid Tissue bertanggung jawab dalam mengenali dan mencegah patogen yang masuk, serta sebagai barier mencegah berpindahnya komponen imunogenik dan infeksius dari mukosa ke sirkulasi (*antigen exclusion*). Bakteri pada usus akan berinteraksi dengan GALT untuk memodulasi sistem imun. Di sisi lain sistem imun mukosa juga harus dapat membedakan patogen dengan kuman komensal dan antigen yang berasal dari makanan sehingga mencegah reaksi hipersensitifitas pada permukaan mukosa (*mucosal tolerance*) dan menjaga homeostatis mukosa usus (Neurath *et al.*, 2002; MacDonald & Monteleone, 2005).

Ada dua produk penting yang dihasilkan oleh GALT yaitu (1). Pembentukan sel B, yang dapat memproduksi *antigen-specific immunoglobulin*, dan akan mengikuti peredaran limfe serta jaringan mukosa lainnya untuk berdiferensiasi menjadi sel plasma, dan (2). Aktivasi dan diferensiasi dari sel T yang sesudah itu juga akan meninggalkan GALT, mencapai mukosa dan jaringan perifer non mukosa (Neurath *et al.*, 2002).

Migrasi sel B dan sel T dari *induction site* dari mukosa *Peyer's patches* ke mukosa *effector site*, melalui kelenjar limfe mesenterik, duktus thoraksikus dan aliran darah disebut dengan mekanisme "*homing*". Selanjutnya akan terjadi diferensiasi, sintesis dan transport s-IgA akhir (Honda & Takeda, 2009).

Sistem imun saluran cerna sebagaimana halnya dengan sistem imun secara umum, terdiri dari sistem pertahanan *innate* (non-spesifik) dan adaptif (spesifik) (gambar 5.3).

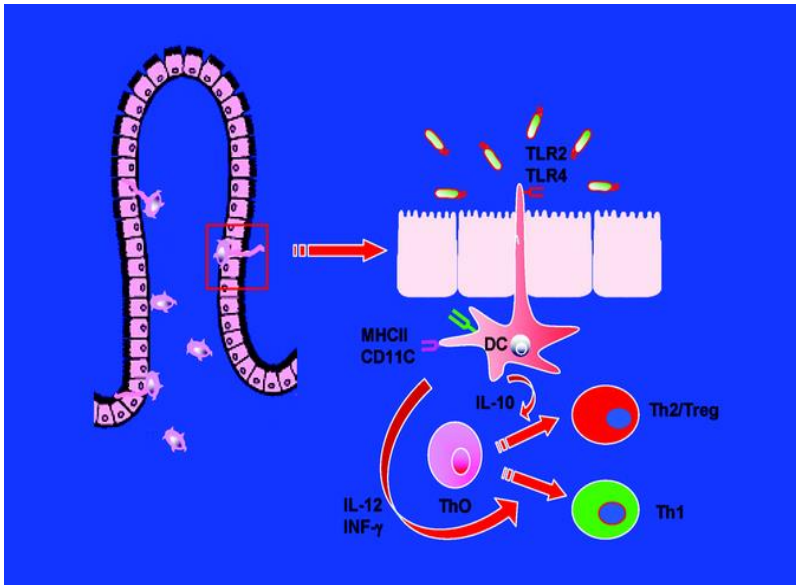


Gambar 5.3. Bagan sistem imun adaptif dan *innate*. OPN merupakan chemotactic untuk beberapa jenis sel (sel makrofag, sel dendritik, dan sel T). OPN berperan dalam regulasi imunitas bawaan dan adaptif. (1) patogen eksogen mengaktifkan TLRs pada permukaan sel, termasuk makrofag, neutrofil dan sel dendritik yang belum matang (immatur). OPN disekresikan oleh makrofag dan sel dendritik ketika terpapar oleh antigen asing dan mengaktifasi fungsi dari sel-sel ini. OPN mempromosikan migrasi neutrofil menuju lokasi cedera. (2) OPN mempromosikan sel dendritik yang immatur menjadi matur dan bermigrasi ke kelenjar getah bening, di mana mereka menyajikan antigen yang diproses melalui MHC ke sel T naive dan memulai respon kekebalan yang dimediasi sel. (3) Sinyal dari DC mengaktifkan sel-sel T naive dan menentukan polarisasi sel T untuk tipe respon sitokin Th1 atau Th2. (4) Makrofag menghasilkan sejumlah OPN, yang secara autokrin/ parakrin berkontribusi terhadap migrasi makrofag dan ekspresi dari sitokin pro-inflamasi IL-12. (5) OPN diproduksi oleh sel-sel imun di tempat terjadinya inflamasi yang akan mempromosikan infiltrasi neutrofil. (6) Aktivasi sel T yang dipromosikan oleh IL-12 untuk membedakan arah tipe Th1, memproduksi sitokin Th1 (IL-12, IFN γ). OPN menghambat produksi sitokin Th2 IL-10, sehingga respon Th1 ditingkatkan. (7) OPN mempromosikan proliferasi limfosit B dan produksi imunoglobulin (Wang, 2008).

5.1.2.2. Respon imun *innate* mukosa saluran cerna

Respon imun *innate* berfungsi mengenali antigen dan mempunyai kemampuan dalam melemahkan patogen. Respon imun ini bekerja dengan cepat dalam merespon adanya patogen akan tetapi tidak memiliki memori imunologis. Respon imun *innate* ini selain memiliki kemampuan bertindak langsung menghadapi antigen juga menjadi penghubung dengan imunitas adaptif dalam mengaktifkan sel-sel imun dari sistem imun adaptif seperti limfosit T. Yang termasuk komponen sistem imun *innate* antara lain membran epitel, defensins, *intraepithelial lymphocytes*, *circulating effector cells* (komplemen, *C-reactive protein*, faktor koagulasi), neutrofil, makrofag, dan *NK-cell* (Yuan & Walker, 2004; Azuma, 2006).

Secara singkat antigen yang dikenali sebagai patogen akan ditangkap melalui *enterocyte tight junction* dari lumen oleh APC (makrofag dan sel dendritik) dengan bantuan *Toll Like Receptor* (TLR) yang merupakan komponen dari imunitas *innate*. TLR berfungsi sebagai *pattern-recognition receptors* (PRRs) pada mamalia dan memainkan peranan penting dalam pengenalan komponen patogen *non-self* (seperti bakteri, virus, jamur, parasit) serta mengenali *ligands endogen* yang timbul selama didapatkannya respons inflamasi (gambar 2.4). Signal yang disampaikan TLR kepada APC karena adanya antigen merupakan salah satu komponen penting dalam aktivasi dari limfosit T baik sel CD4 maupun sel CD8 (Bauer et al., 2004; Yuan & Walker, 2004)



Gambar 5.4. Diagram penetrasi sel dendritik dari enterocytes untuk mengenali patogen di lumen usus melalui TLR. Hal ini akan menyebabkan maturasi. Sel dendritik matur akan menghasilkan sitokin yang akan mengaktifkan sel T naive (Th0) dan merangsang respons Th1 dan Th2. Sel dendritik yang telah menelan antigen akan mencerna dan memproses antigen itu serta mempresentasikan pada permukaan sel dalam bentuk kompleks MHC:antigen. Kompleks MHC:antigen inilah yang dapat dideteksi oleh sel T. Karena mempunyai kemampuan mempresentasikan antigen, sel dendritik disebut *Antigen Presenting Cell* (APC) (Hattaka , 2001).

Selanjutnya patogen ini akan dipresentasikan baik terhadap sel B yang imatur dan sel T yang imatur. Patogen yang dipresentasikan pada limfosit B akan memicu pembentukan sel B yang matur sampai terbentuknya sel plasma yang mampu menghasilkan immunoglobulin (imunitas humoral). Sedang untuk dikenali oleh reseptor limfosit T (TCR), patogen akan diperlihatkan oleh molekul HLA *class* I atau HLA *class* II. Molekul HLA *class* I pada umumnya akan mempresentasikan sitoplasma dari antigen (endogen) dan terutama disintesis oleh sel yang terinfeksi misalnya protein virus. Sedangkan molekul HLA *class* II terutama akan mempresentasikan peptide yang berasal dari antigen eksogen. Sebagian kecil lain antigen yang tidak diekspresikan oleh molekul MHC ataupun dikenali sel limfosit, akan ditangkap dan

fagositosis oleh *Natural Killer Cell* melalui *NK receptor* (CD2, CD69, CD16) (Perdigon *et al.*, 1999; Roitt *et al.*, 2001).

5.1.2.3. Respon imun adaptif mukosa saluran cerna

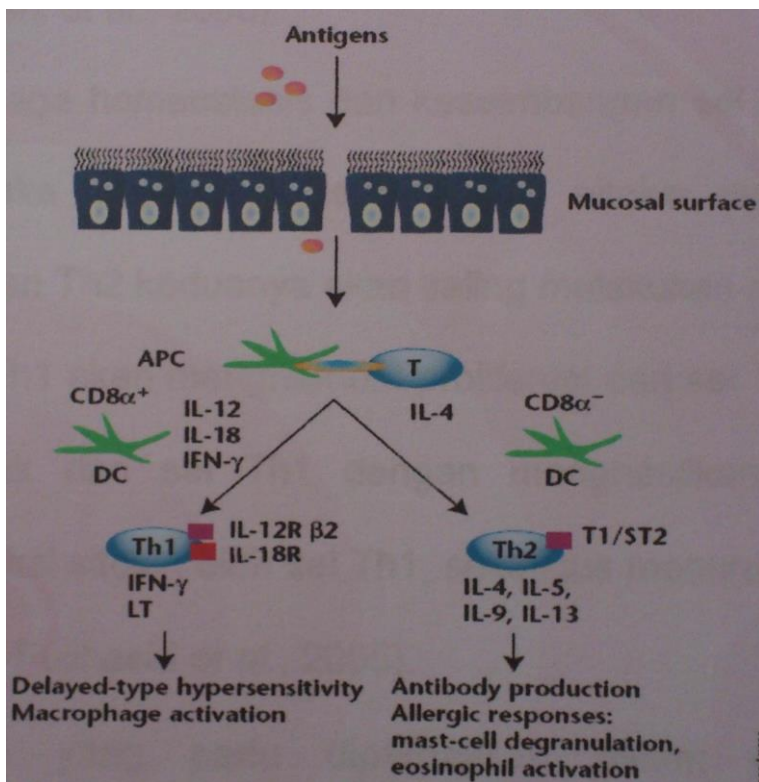
Respon imun adaptif diaktivasi melalui proses induksi oleh imun *innate*. Setelah melalui serangkaian respon imun *innate* seperti telah dijelaskan di atas, selanjutnya terjadi aktivasi respons imun adaptif yang diperankan oleh sel limfosit T CD4⁺ (*T helper*), antigen yang berhubungan dengan HLA *class I*, akan memicu respon seluler sitotoksik yang sebagian besar diperankan oleh limfosit T CD8⁺ (*T cytotoxic*). Bila antigen dipresentasikan oleh HLA *class II*, maka akan terjadi respon imun yang diperankan oleh sel limfosit T CD4⁺ (*T helper*). Limfosit T CD4⁺ ini memicu respon imun humoral melalui pembentukan antibodi dan juga memicu sebagian respon seluler sitotoksik yang gagal dikenali oleh sel CD8⁺ (Fujihashi *et al.*, 2005).

Sel limfosit CD4⁺ T secara normal terdiri dari 1) sel T *naive* (belum pernah kontak dengan antigen); 2) sel T efektor (*activated*) atau Th0 dan 3) sel T memori yang dikenal sebagai sel Th1 dan sel Th2. Setelah terjadi diferensiasi dan migrasi ke organ imun perifer, sel CD4⁺ disebut sebagai sel T *naive precursor* dan secara fungsional imatur. Untuk aktivasi dan diferensiasi sel-sel ini dibutuhkan signal dari reseptor sel T (kompleks CD3) setelah interaksinya dengan antigen dan signal dari sejumlah *costimulatory* atau *accessory molecule* (Fujihashi *et al.*, 2005).

Prekursor dari sel T *naive* (pTh) ini akan mengenali peptide asing yang dipresentasikan oleh MHC *class II* dari APC (sel dendritik) dan mengekspresikan fenotipe dari $\alpha\beta$ TCR⁺ CD4⁺. Sel T *naive* ini mula-mula akan menghasilkan IL-2 sebagai respon awal terhadap stimulus sebelum berubah menjadi sel T effector (TH0) yang dapat memproduksi berbagai macam sitokin (termasuk IFN- γ dan IL-4). Perubahan sel Th0 selanjutnya akan dipengaruhi oleh lingkungan. Beberapa subpopulasi dari sel limfosit CD4⁺Th ini dapat dibedakan berdasarkan produk sitokin yang dihasilkan. Adanya patogen intraseluler akan menyebabkan makrofag atau sel dendritik menghasilkan IL-12 (dan IFN γ) yang akan mendiferensiasi sel Th0 menjadi sel CD4⁺ Th1. Sedangkan adanya antigen luar (ekstraseluler) akan menyebabkan *Natural Killer cell* mengeluarkan IL-4 (dan IL-10) dan akan menyebabkan diferensiasi sel Th0 menjadi sel CD4⁺ Th2 (Gambar 2.5) (Roitt *et al.*, 2001; Neurath *et al.*, 2002; Fujihashi *et al.*, 2005).

Faktor lain yang dapat mempengaruhi sel Th adalah jenis

antigen, molekul yang menjadi ko-stimulator, faktor genetik pejamu, densitas peptida dan kemampuannya dalam berikatan. Peptida dengan densitas tinggi yang berikatan dengan MHC class II lebih sering berikatan dengan sel Th1, sedangkan peptida dengan densitas rendah lebih sering berikatan dengan sel Th2 (Roitt *et al.*, 2001). Lingkungan sitokin yang terbentuk juga akan mempengaruhi diferensiasi dari sel Th ini. IL-12 akan mendorong diferensiasi ke arah Th1, sedangkan IL-4 akan mendorong diferensiasi ke arah sel Th2 (Perdigon *et al.*, 1999). Sitokin IL-18 juga mempunyai peranan dalam memodulasi pembentukan sel Th1. Walaupun IL-18 sendiri tidak secara langsung memodulasi pembentukan Th1, namun sitokin ini dapat menginduksi upregulation dari ekspresi rantai IL-12 pada sel T. Sedangkan IL-13 mempunyai peranan penting dalam pembentukan sel Th2, walaupun fungsinya sebagian mirip dengan IL-4, namun IL-13 sendiri dapat memicu pembentukan sel Th2 serta sintesis dari IgE (Neurath *et al.*, 2002).



Gambar 5.5. Produksi sitokin sebagai respon adanya antigen dalam diferensiasi sel Th. Sitokin diproduksi oleh sel Thelper sebagai respon terhadap antigen. Antigen juga dapat dipresentasikan oleh APC seperti DC ke sel T. Dalam sistem imun mukosa usus yang normal, DC immatur akan menginduksi respon sel T. Adanya sitokin seperti IL-12 dan IFN γ yang diproduksi oleh CD8 α^+ dari DC, akan menyebabkan sel T berdiferensiasi menjadi sel efektor Th1, sedangkan IL-4 dapat menginduksi diferensiasi sel T menjadi Th2. Sel Th1 akan mengekspresikan reseptor IL-12 rantai $\beta 2$ dan reseptor IL-18, sel Th2 mengekspresikan molekul IL-1 (dilambangkan T1/ST2), untuk mengatur fungsi efektor Th2 baik di perifer maupun di mukosa. Sel Th2 menghasilkan sejumlah besar sitokin seperti IL-4, IL-5, IL-9 dan IL-13 yang mengatur produksi antibodi dan respon alergi. Sebaliknya sel Th1 menghasilkan IFN γ dan menginduksi hipersensitivitas tipe lambat dan aktivasi makrofag (Neurath et al., 2002).

Sel CD4 $^+$ Th1 akan menghasilkan IFN- γ , IL-2, dan *tumor necrosis factors* (TNFs) dan akan berperan sebagai *cell-mediated immunity* (CMI) yang berhubungan dengan hipersensitivitas tipe

lambat (*delayed type hypersensitivity*) dengan mencetuskan fungsi efektor sitotoksik dari *Natural Killer cell*, sel CD8⁺ dan makrofag. Fungsi lainnya adalah merangsang pembentukan *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC) dengan membantu produksi IgG1 pada manusia dari sel B (Neurath *et al.*, 2002; Fujihashi *et al.*, 2005).

Sel CD4⁺ Th2 akan menghasilkan sitokin-sitokin IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 dan IL-13 yang berperan dalam memcetuskan imunitas humoral dengan membantu proliferasi dari sel B, diferensiasi sel plasma atau sel memori serta merangsang pembentukan IgG1 dan IgE pada tikus percobaan serta IgG4 dan IgE pada manusia dari sel B. Peran sel Th2 ini tidak hanya dalam respon antibodi sistemik namun juga di mukosa dan sistemik (Roitt *et al.*, 2001; Neurath *et al.*, 2002, Fujihashi *et al.*, 2005).

Untuk menjaga homeostatis dan keseimbangan sel Th1 dan Th2 pada mukosa usus, maka disamping menghasilkan sitokin dengan fungsi yang berbeda, sel Th1 dan Th2 keduanya akan saling melakukan regulasi silang. IFN- γ yang dihasilkan Th1 akan menghambat proliferasi sel Th2, sedangkan sel Th2 mengatur efek sel Th1 dengan menghasilkan IL-4, yang akan menghambat produksi sitokin oleh sel Th1, sekaligus menurunkan produksi IFN- γ (Roitt *et al.*, 2001; Fujihashi *et al.*, 2005).

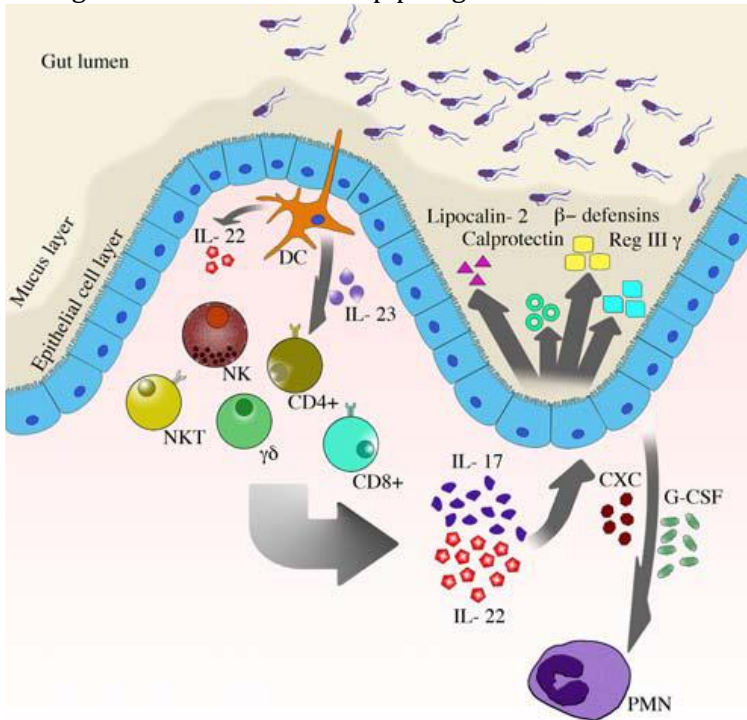
Sitokin lain yang perlu diperhatikan dalam peranannya untuk keseimbangan dan polarisasi sel Th1/Th2 adalah TGF β dan IL-10 yang dihasilkan oleh sel T regulator (Tregulator) yang juga berasal dari sel limfosit T CD4⁺. Sitokin TGF β akan menghambat proliferasi yang dirangsang oleh IL-2 serta sitokin IFN γ , IL-4 dan IL-12 sehingga akan mengontrol pembentukan sel Th1 dan sel Th 2. Sitokin IL-10 juga diketahui mempunyai mekanisme yang dapat menyebabkan *down-regulation* dari sel Th1, sehingga menghambat ekspresi sitokin dari sel Th1 (Roitt *et al.*, 2001; Fujihashi *et al.*, 2005).

Sel Tregulator juga mengatur keseimbangan CD8⁺ *cytotoxic T lymphocytes* (CTLs) dan subpopulasi sel T lainnya. Jaringan mukosa limfoid usus yang kaya dengan sel CD4⁺Tregulator berguna dalam menekan respon sel CD4⁺Th1 atau Th2 sehingga beberapa ahli berpendapat bahwa sel Tregulator berperan dalam mengontrol imunitas mukosa, mekanisme toleran dan inflamasi (Fujihashi *et al.*, 2005).

TGF- β dari Tregulator juga dapat menekan (*down-regulation*) sitokin pro-inflamasi yang dihasilkan oleh sel Th1 dan Th2 dan menstimulasi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 (Neurath

et al., 2002, Fujihashi et al., 2005).

Blachitz & Raffatelu (2010) menjelaskan bahwa respon imun lokal berperan dalam mencegah infeksi oleh bakteri patogen dan mencegah penyebaran patogen secara sistemik. Beberapa subset sel T dalam usus (sel Th 17, sel $T\gamma\delta$, NK cell, NK cell T) berkontribusi pada respon imun mukosa terhadap patogen dengan mengeluarkan subset sitokin IL 17A, IL 17F, IL 22 dan IL 26). Sitokin menginduksi sekresi kemokin & protein antimikroba. Protein antimikroba tersebut merupakan bentuk pertahanan mukosa gastrointestinal terhadap patogen.



Gambar 5.6. Peran sitokin Th 17 pada mukosa usus. Sel dendritik diaktifkan oleh patogen dan mensekresikan beberapa sitokin proinflamasi yaitu IL 22 dan IL 23, yang kemudian menstimulasi beberapa subset sel T (sel Th 17, sel $T\gamma\delta$, sel NK dan sel NK-T) untuk mensekresikan IL 17 dan IL 22. IL 17 dan IL 22 akan menstimulasi epithelium usus untuk mensekresikan CXC Chemokines (Neutrophil Chemoattractants) dan antimicrobial peptides (lipocalin-2, calprotectin, Reg III γ dan β defensins) (Blaschitz & Raffatelu, 2010).

5.2. Respon Imun Terhadap Bakteri Shigella

5.2.1. Respon Imun Bawaan (*Innate Immunity*)

Respon imun bawaan merupakan pertahanan awal terhadap infeksi bakteri yang berperan menghambat proliferasi bakteri, melokalisasi infeksi dan juga dapat mengaktifkan dan mengatur respon imun adaptif berikutnya. Banyak tipe sel dan protein terlarut (soluble protein), termasuk sel fagositosis (neutrophil, makrofag, dan sel dendritik), limfosit (NK-sel, sel T), sitokin (terutama IL-1, IL-6, IL-12, TNF α dan IFN- γ) dan dari liver dikeluarkan protein serum seperti faktor komplement yang berkontribusi terhadap respon imun bawaan. Komponen kekebalan tubuh, sel non-imun seperti sel epitel, mengenali dan merespon invasi bakteri dengan memproduksi kemokin yang dapat menarik dan mengaktifkan respon sel imun (Jung *et al.*, 1995). Hasil interaksi yang kompleks antara faktor tersebut berupa manifestasi inflamasi akut (Philpott *et al.*, 2000).

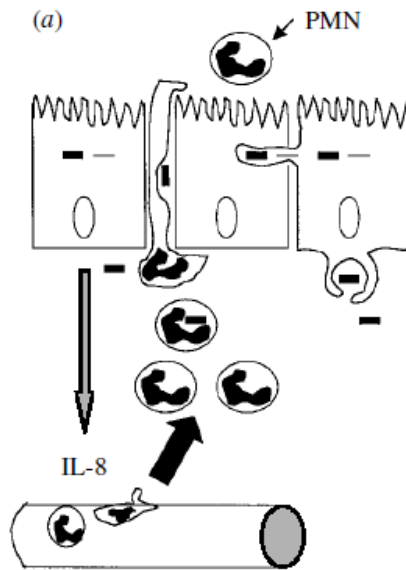
Studi tentang respon imun bawaan pada Shigellosis sebagian besar difokuskan pada mekanisme yang terlibat dalam pengaturan influx neutrofil ke tempat terjadinya infeksi. Respon neutrofil dapat dipisahkan menjadi 2 tahap, influx awal difokuskan di daerah folikel limfoid, dan fase berikutnya neutrofil masuk ke dalam usus, vili dan kriptus, hal ini akan menyebabkan kerusakan epitel pada mukosa (Mathan & Mathan, 1991).

Selama proses kedua tahap, pada infeksi *Shigella*, IL-1 dilepaskan akibat apoptosis makrofag. Tahap pertama dibuktikan dengan percobaan menggunakan model infeksi "*rabbit ileal loop*", pemberian antagonis reseptor IL-1 sebelum dipapar dengan *Shigella flexneri*, menunjukkan terjadinya penurunan yang signifikan pada inflamasi dan kerusakan jaringan limfoid (Sansonetti *et al.*, 1995). Observasi kedua pada tahap inflamasi, pada folikel yang terinfeksi, sel epitel mensekresikan sitokin pro inflamatory. Hal ini mendorong penelitian tentang peran IL-8 sebagai mediator pada fase kedua inflamasi (Sansonetti *et al.*, 1999).

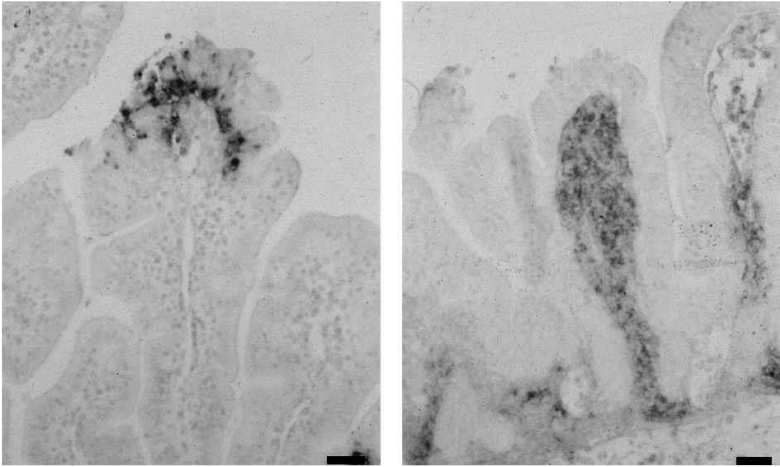
Percobaan *in vivo* menggunakan model *rabbit ileal loop*, antibodi monoklonal anti IL-8 dapat menghambat influx neutrofil dari lamina propria ke pili sehingga dapat mencegah kerusakan usus. Sebuah penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa produksi IL-8 oleh sel epitel menginduksi migrasi neutrofil terpolarisasi di epitel monolayer dan hal ini dapat terjadi dengan atau tanpa invasi *Shigella* ke sel-sel epitel. Dengan demikian interaksi bakteri dengan sel epitel tampaknya menjadi syarat untuk tahap kedua. Penyebaran inflamasi ke tempat yang lebih jauh dari folikel

menunjukkan bahwa *Shigella* telah menyebar ke sel-sel tersebut (Philpott *et al.*, 2000).

Hal ini didukung oleh penelitian lain yaitu percobaan pada kera Shigellosis dengan mutan ICSA, *Shigella* mampu menginvasi sel epitel tetapi tidak mampu menyebar dari satu sel ke sel lainnya (Sansone *et al.*, 1991). Ketidakmampuan mutan ICSA untuk menyebar melalui lapisan epitel, akan menghambat pelepasan kemokin epitel dan akibatnya dapat membatasi inflamasi pada binatang yang terinfeksi.



Gambar 5.7. *Shigella flexneri* menginfeksi sel epitel, menginduksi IL-8, sebuah chemotactic yang poten, kemokin yang bertanggung jawab untuk perekrutan PNM ke lokasi infeksi. PNM bermigrasi ke sel epitel yang berdekatan, melintasi *intercellular junction* dan menyebabkan kerusakan permukaan mukosa, selanjutnya invasi lebih dalam ke lumen usus. Sebaliknya influx neutrofil diperlukan untuk mengontrol proliferasi organisme lokal dan mencegah penyebaran sistemik (Sansone *et al.*, 1999 dalam Philpott, 2000).



Gambar 5.8. Foto sebagian usus, LPS *Shigella flexneri* model *rabbit ileal loop*, terinfeksi *Shigella flexneri*. Kelinci yang diberi antibodi kontrol dan dipapar dengan *Shigella flexneri* menunjukkan pembentukan abses dan kerusakan jaringan lokal. Bagian kanan menunjukkan bagian jaringan kelinci, dimana IL-8 dinetralkan menggunakan antibodi spesifik sebelum infeksi. Meskipun epitel terhindar, bakteri (dilution) tampak di lamina propria. Hal ini menunjukkan peran penting IL-8 dalam memfasilitasi influx neutrofil dalam mencegah translokasi bakteri (Sansoonetti *et al.*, 1999 dalam Philpott, 2000).

Peradangan akibat shigellosis dapat terjadi di usus selama lebih dari sebulan, dengan regulasi dari beberapa sitokin (IL-1, TNF- α , IL-6, IFN-c, TNF-b, IL-4, IL-10, TGF- β , dan IL-8 (Jennison & Verma, 2004). Beberapa gejala klinis merupakan akibat langsung dari sitokin, sitokin juga membantu mengontrol terjadinya infeksi. Makrofag dan infiltrasi monosit tidak dapat membunuh *Shigella flexneri* di phagosom, sehingga menyebabkan apoptosis phagosom (Hathaway *et al.*, 2002).

IL-18 dikeluarkan oleh makrofag yang apoptosis dan menjadi target NK sel dan limfosit T, yang kemudian menginduksi produksi IFN-c (Biet *et al.*, 2002). Defisiensi IFN-c pada mencit, lima kali lebih rentan terhadap infeksi *Shigella*, IFN-c mengaktifkan makrofag dan sel fibroblast, yang berperan pada pembersihan bakteri dan mungkin menghambat replikasi bakteri dalam epitel (Jennison & Verma, 2004).

Konsekuensi penting dari respon imun bawaan tampaknya adalah sitokin yang diinduksi oleh migrasi sel PMN. Faktor transkripsi NF- κ B diaktifkan pada sel epitel yang terinfeksi *Shigella*, menyebabkan produksi dan sekresi IL-8 oleh sel-sel yang terinfeksi

(Jennison & Verma, 2004). IL-8 adalah *chemoattractant* yang poten untuk sel PNM, seperti IL-1 yang dilepaskan oleh makrofag yang apoptosis. *Shigella* tidak dapat melepaskan diri dari fagositosis vakuola sel PMN, sehingga mereka membunuh bakteri dalam phagosom (Mandic-Mulec *et al.*, 1997).

Penelitian terakhir dari neutrophil elastase (NE) pada manusia sebagai protein pertahanan inang dari neutrophil, mampu merusak protein virulensi *Shigella* dalam waktu 10 menit setelah *Shigella* menginfeksi neutrophil. Sel PNM mempunyai peran penting dalam mengendalikan infeksi *Shigella*, menghalangi bakteri masuk mukosa, mencegah invasi bakteri ke jaringan yang lebih dalam serta mencegah penyebaran sistemik (Jennison & Verma, 2004).

Mekanisme pertahanan lain dari sel inang terhadap *Shigella* baru-baru ini ditemukan. Glikoprotein, laktoferin yang terdapat pada sekresi mukosa, air susu ibu dan sel fagositik dapat merusak kemampuan *Shigella flexneri* untuk menyerang sel hela, paparan kompleks ipa-B-ipa-C untuk degradasi protease dengan mengganggu permukaan bakteri (Gomez *et al.*, 2003). Selain itu, penelitian pada tikus transgenik menjelaskan bahwa defensin usus mempunyai peran dalam sekresi antibiotik peptide. Sekresi antibiotik peptide usus dapat mengendalikan infeksi *Salmonella typhimurium* enterik (Salzman *et al.*, 2003). Hal ini juga memungkinkan bahwa defensin usus mempunyai sifat antibiotik yang sama terhadap enterik *Shigella flexneri*.

5.2.2. Respon Imun Selluler

Selama proses infeksi, *Shigella* berada di ekstraseluler dan intraseluler. Hal ini berimplikasi pada respon imun humoral dan respon imun seluler. Respon imun seluler terhadap shigellosis belum banyak diketahui.

Penelitian menunjukkan bahwa peningkatan aktivasi sel T pada pasien Shigellosis dan kloning sel T yang telah diisolasi akan berkembang biak dalam merespon antigen *Shigella flexneri* (Islam & Christensson, 2000). Dalam suatu studi vaksin, pemberian antigen *Shigella* dapat menginduksi sitokin dengan menunjukkan adanya respon limfosit Th1 dan Th2 (Kotloff *et al.*, 2000). Sel T diproduksi untuk melawan *Shigella* dan sel T aktif telah diisolasi dari darah pasien dengan Shigellosis tetapi fungsi mereka belum diketahui (Islam *et al.*, 1996 dalam Philpott, 2000). Peran limfosit T pada respon imunitas terhadap shigella juga dipelajari pada model tikus defisiensi sel T, setelah pemberian vaksin *Shigella flexneri*

yang sudah dilemahkan, tikus tersebut dapat terlindungi dari ancaman *Shigella* meskipun kekurangan limfosit T (Jennison & Verma, 2004).

5.2.3. Respon Imun Humoral

Respon imun humoral adalah komponen utama perlindungan terhadap Shigellosis. Pertahanan sistemik maupun pertahanan mukosa akan diaktifkan terhadap LPS dan beberapa virulensi yang dikodekan oleh protein plasmid, termasuk protein ipa (Jennison & Verma, 2004).

Struktur serotipe spesifik LPS diasumsikan menjadi target utama respon imun natural inang. Sebuah percobaan infeksi dengan shigella memberikan imunitas serotipe spesifik, dimana sebelumnya infeksi atau vaksinasi memberikan sedikit perlindungan terhadap serotipe yang heterolog. Namun antibodi yang ditunjukkan terhadap epitop tertentu bereaksi dengan struktur antigen-O yang tampaknya menunjukkan beberapa reaksi silang (Jennison & Verma, 2004).

Dari sejumlah studi, IgA terutama IgA anti LPS telah terdeteksi pada manusia penderita shigellosis, dan merupakan respon imun yang berperan penting terhadap infeksi ulang. Antibodi IgA anti LPS dalam ASI ibu yang terpapar Shigellosis juga berperan terhadap penurunan keparahan Shigellosis pada bayi yang terinfeksi *Shigella*. Selain itu implantasi serotipe spesifik s-IgA hibridoma di bagian belakang tikus melindungi mereka terhadap paparan organisme intranasal *Shigella flexneri* pada dosis yang mematikan (Jennison & Verma, 2004).

Meskipun Shigellosis umumnya merupakan infeksi mukosa lokal, serum antibodi IgG dan IgM yang terdeteksi pada manusia terinfeksi, ditujukan terhadap LPS dan antigen virulensi plasmid (Oberhelman *et al.*, 1991 dalam Jennison & Verma, 2004). IgG dan IgM anti LPS telah terbukti berperan sebagai imunitas terhadap *Shigella* pada percobaan menggunakan hewan coba mencit. Defisiensi IgA pada mencit yang diberi vaksin, sepenuhnya terlindung dari paparan *Shigella*, hal ini menunjukkan bahwa IgG atau IgM mampu memberikan kekebalan (Way *et al.*, 1999 dalam Jennison & Verma, 2004). Imunisasi yang diberikan pada mencit defisiensi limfosit T juga terlindungi dari paparan *Shigella* dengan didominasi oleh respon IgM anti LPS. Hal ini masih belum jelas peranan serum antibodi anti LPS *Shigella flexneri*, walaupun mereka dapat menstimulasi pembunuhan bakteri di mukosa. Namun peran antibodi serum dalam mengendalikan infeksi

Shigella pada mencit maupun manusia yang diberi vaksin parenteral, menunjukkan bahwa stimulasi serum Ig tidak berhubungan dengan perlindungan (Jennison & Verma, 2004).

5.3. Perkembangan Vaksin Shigella

Beberapa masalah terkait shigellosis yang menjadi pusat perhatian di dunia antara lain adalah terjadinya resistensi terhadap antibiotik (Sansone, 2001). Menurut sejarah, Shigella spp, mudah sekali menjadi resisten terhadap antibiotik (WHO, 2001) terutama pada beberapa tahun terakhir ini. Strain Shigella semakin menjadi resisten terhadap sebagian besar antimikroba yang digunakan sehingga mengakibatkan kegagalan pengobatan dan peningkatan mortalitas (Levine, 1986). Multidrug resistensi merupakan masalah serius dalam pengobatan Shigellosis, terutama yang disebabkan oleh *Shigella dysenteriae*.

Resistensi Shigella spp terhadap antibiotik pertama kali dilaporkan tahun 1960. Tetrasiklin, olampisilin dan kotrimoksazol yang sebelumnya efektif digunakan dalam pengobatan shigellosis, dilaporkan terjadi resistensi terhadap ketiga obat tersebut (Ross, 1972).

Antara tahun 2000 sampai 2004, survei dari 600.000 orang dari segala usia di Bangladesh, Cina, Pakistan, Indonesia, Vietnam dan Thailand, Shigella terisolasi sekitar 5% dari episode diare dan sebagian besar isolat bakteri resisten terhadap amoksisilin dan kotrimoksazol. Demikian pula, selama penelitian surveilans 36-bulan di sebuah distrik pedesaan di Thailand, 95% dari isolat *Shigella sonnei* dan *Shigella flexneri* resisten terhadap tetrasiklin dan kotrimoksazol, dan 90% dari isolat *Shigella flexneri* juga resisten terhadap ampisilin dan kloramfenikol. Temuan serupa di Jakarta Utara (Indonesia), dimana sebuah penelitian surveilans yang dilakukan antara Agustus 2001 dan Juli 2003 menemukan bahwa anak usia 1 sampai 2 tahun memiliki insiden tinggi Shigellosis (32/1000/year) dengan 73% sampai 95% dari isolat resisten terhadap ampisilin, trimetoprim-sulfametoksazol, kloramfenikol dan tetrasiklin (Seidlein, 2006).

Pengembangan vaksin Shigella yang aman dan efektif saat ini menjadi prioritas WHO karena bakteri ini menunjukkan peningkatan resistensi antibiotik, bahkan dengan antibiotik yang terbaru (Shim, 2007). Biaya pengobatan Shigellosis menggunakan antibiotik, terutama di negara berkembang menjadi tidak realistis. Kekebalan serotipe spesifik yang dihasilkan oleh *Shigella flexneri* memberikan perlindungan terhadap infeksi ulang oleh serotipe

homolog, sehingga vaksinasi menjadi pilihan yang layak untuk mengendalikan Shigellosis. Vaksin untuk Shigellosis harus memenuhi persyaratan tertentu, dapat mengaktifkan sistem kekebalan mukosa dan kekebalan ini harus tahan lama, produksi vaksin murah, menyebabkan efek samping yang minimal dan pengelolaannya sederhana, anak-anak di negara berkembang akan menjadi target utama pemberian vaksin shigellosis (Jennison & Verma, 2004).

Sejak tahun 1940-an sejumlah kandidat vaksin untuk *Shigella flexneri* telah dikembangkan tetapi belum ada yang cukup sukses untuk dirilis. Upaya-upaya awal untuk mengembangkan vaksin *Shigella flexneri* terdiri dari bakteri yang dilemahkan diberikan parenteral, tetapi gagal untuk menginduksi respon imun protektif, meskipun menginduksi titer tinggi serum antibodi anti LPS (Barnes *et al.*, 1951 dalam Jennison & Verma, 2004). Kurangnya perlindungan kemungkinan besar karena kegagalan vaksin parenteral dalam menginduksi respon imun mukosa. Akibatnya strategi berikutnya berkonsentrasi pada pengembangan vaksin berupa strain hidup yang diberikan secara oral dan akan mengaktifkan efektor kekebalan mukosa.

5.3.1. Subunit vaksin

Sub unit vaksin Shigella menjadi alternatif terkait isu-isu keamanan dan keselamatan penggunaan vaksin hidup. LPS dapat dikomplekskan untuk proteosomes dan diberikan kepada manusia melalui intranasal. Uji klinis telah menunjukkan bahwa vaksin LPS-proteosome *Shigella flexneri 2a* mampu menghasilkan respon kekebalan serotipe spesifik pada manusia (Fries *et al.*, 2001). LPS *Shigella flexneri* telah diberikan melalui parenteral kepada relawan sebagai vaksin. Vaksin-vaksin itu aman pada manusia dan dapat menginduksi kuat respon antibodi serum (Ashkenazi *et al.*, 1999; Passwell *et al.*, 2001). Tikus dan kelinci percobaan terlindungi dari paparan *Shigella flexneri* dengan pemberian imunisasi mukosa menggunakan kompleks IPAB, IPAC, iPad dan LPS (Turbyfill *et al.*, 2000). Preparat ribosom *Shigella* juga telah diberikan melalui parenteral dan dapat menghasilkan kekebalan protektif pada marmut dan monyet. Respon imun diarahkan terhadap antigen polisakarida O-(L-hapten) dimurnikan dengan preparat ribosom. Namun, antigen-O konten dalam persiapan ribosom bervariasi, membuat konsisten vaksin sulit untuk memproduksi (Levenson, 1988 dalam Jennison & Verma, 2004).

5.3.2. Killed oral vaccine

Killed oral vaccine / Vaksin oral dengan bakteri yang sudah dimatikan. Percobaan awal yang dilakukan pada monyet mengungkapkan bahwa pemberian secara oral *Shigella* yang telah dimatikan dan dikeringkan, tidak dapat melindungi monyet dari infeksi Formal et al., 1965 dalam Jennison & Verma, 2004). Percobaan pada model kelinci dengan memberikan vaksin berupa *heat-killed virulent Shigella flexneri 2a*, menunjukkan perlindungan 100 % terhadap spesies homolog, berupa peningkatan IgG dan IgA (Chakrabarti, 2010).

Selain itu membran luar protein dengan berat molekul 34 kDa telah diidentifikasi juga sebagai pelindung antigen. Protein tersebut menginduksi pelepasan IL-12, IL-1 β , TNF α , G.CSF, NO dan IL-6 oleh makrofag peritoneal murine. Hal ini menunjukkan bahwa protein memiliki kemampuan dalam menginduksi respon imun terhadap invasi bakteri patogen. Telah dibuktikan juga bahwa protein meningkatkan ekspresi tipe-1 kemokin (MIP-1 α , MIP-1 β dan RANTES) serta molekul lain (MHC II, CD40 dan CD80), yang diketahui memodulasi respon adaptif Th1 (Chakrabarti, 2010).

5.3.3. Non-invasive-live vaccines

Mutasi pada kromosom *Shigella flexneri* atau virulensi plasmid telah digunakan sebagai *non-invasive-live vaccines*. Sebagian besar strain aman pada manusia dan mampu menginduksi beberapa derajat pelindung kekebalan pada sukarelawan (Tabel 2.2). Yang paling sukses dari vaksin ini adalah invasi plasmid mutan, *Shigella flexneri 2a*, 100% aman pada manusia dan mempunyai daya lindung 85%. Namun, harus diberikan dalam jumlah besar (1×10^{11} CFU) setiap enam bulan, vaksin ini mahal dan sulit untuk diterapkan di negara berkembang (Meitert et al., 1984 dalam Jennison & Verma, 2004).

5.3.4. Invasive live vaccines

Strategi *invasive live vaccines* peroral semakin banyak dieksplorasi sebagai strain invasif dengan memberikan antigen pada sistem imun mukosa, memprovokasi kekebalan tubuh dengan respon yang kuat. Virulensi genetik *Shigella flexneri* telah mengalami banyak perubahan sehingga diperlukan strategi pengembangan vaksin invasif yang aman. Vaksin Invasif umumnya dilemahkan dengan mutasi baik pada virulensi gen yang diperlukan untuk patogenesis setelah masuk sel atau pada

metabolik gen yang dapat mencegah replikasi bakteri dan penyebaran bakteri setelah invasi.

Mutasi pada ICSA dan / atau pada berbagai metabolisme gen telah menghasilkan vaksin berupa invasif strain hidup yang dilemahkan yang aman dan mampu hingga perlindungan 100% dengan dosis ganda pada monyet. Sejumlah vaksin yang juga membawa mutasi pada gen virulensi, telah dilakukan uji klinis tahap 1 pada sukarelawan manusia, mampu meningkatkan respon kekebalan terhadap serotipe spesifik. Strain ini bervariasi dalam menginduksi respon.

Vaksin *Shigella flexneri 2a*, SC602 telah berjalan untuk uji klinis tahap kedua pada manusia. Strain ini membawa penghapusan ICSA, yang terlibat dalam transportasi zat besi. SC602 aman pada manusia pada dosis rendah (1×10^4 CFU) dan mampu memberikan perlindungan bagi manusia yang terpapar *Shigella Flexneri 2a*. Namun vaksin dapat menyebabkan gejala diare ringan dan demam bila diberikan dalam dosis yang lebih dari 1×10^4 CFU (Coster *et al.*, 1999 dalam Jennison & Verma, 2004). Meskipun menjanjikan, vaksin ini perlu diteliti lebih lanjut untuk mencapai keseimbangan antara imunogenisitas dan keselamatan pada manusia.

5.3.5. Hybrid vaccines

Kandidat vaksin *E. coli* juga telah digunakan untuk mengembangkan *hybrid* vaksin yang mengekspresikan antigen *Shigella*. Pada percobaan awal menggunakan *Shigella-E. coli* hibrida vaksin diberikan secara invasif, menyebabkan beberapa gejala pada sukarelawan manusia, artinya vaksin ini tidak protektif (Falkow *et al.*, 1963 dalam Jennison & Verma, 2004).

Berikutnya adalah kandidat vaksin *Shigella flexneri* yang direkayasa untuk mengekspresikan antigen-O dari *Shigella* spesies lain. *Shigella flexneri 2a* galur T 32 membawa plasmid yang berisi cluster gen coding untuk *Shigella sonnei* antigen-O, mampu memberikan 100% perlindungan kepada tikus yang dipapar dengan kedua virulen *Shigella flexneri* dan *Shigella sonnei* (Rui *et al.*, 1996 dalam Jennison & Verma, 2004).

BAB VI KARAKTERISASI PROTEIN PILI BAKTERI SHIGELLA

6.1. Bakteri Shigella

Shigella adalah bakteri patogen usus yang dikenal sebagai agen penyebab penyakit disentri basiler. Shigella merupakan bakteri gram-negatif, tidak bergerak, berbentuk batang dan tumbuh baik pada suasana aerob dan fakultatif anaerob (Schroeder & Hilbi 2008, Cabral 2010).

Taksonomi bakteri Shigella adalah;

Kingdom : *Bacteria*
Filum : *Proteobacteria*
Kelas : *Gamma Proteobacteria*
Ordo : *Enterobacteriales*
Famili : *Enterobacteriaceae*
Genus : *Shigella*
Species : *Shigella dysenteriae, Shigella sonnei, Shigella flexneri, Shigella boydii*
(Todar, 2012).

Genus Shigella terdiri dari empat spesies yaitu *S. dysenteriae* (serogrup A), *S. flexneri* (Serogrup B), *S. boydii* (serogrup C), dan *S. sonnei* (Serogrup D) (Schroeder & Hilbi 2008, Lamps 2009, Ploeg *et al* 2010). Masing-masing spesies dibagi lagi menjadi beberapa serotipe berdasarkan sifat biokimia dan antigennya. Shigella mempunyai susunan antigen yang kompleks. Sebagian besar bakteri ini mempunyai antigen O yang juga dimiliki oleh kuman enterik lainnya. Antigen somatic O dari Shigella adalah lipopolisakarida. Kekhususan serologiknya tergantung pada polisakarida. Shigella mempunyai lebih dari 40 serotipe yaitu *Shigella dysenteriae* (13 serotipe), *Shigella flexneri* (6 serotipe), *Shigella boydii* (18 serotipe) dan *Shigella sonnei* (1 serotipe) (Wang *et al.*, 2009).

Kelompok Shigella dapat diidentifikasi dengan aglutinasi menggunakan antiserum, baik polivalen dan monovalen antiserum Shigella. Antiserum polivalen digunakan untuk menentukan kelompok dan berisi antibodi terhadap beberapa serotipe Shigella. Sebagai contoh antiserum, polivalen yang tersedia secara komersial untuk *Shigella flexneri* akan bereaksi dengan semua serotipe *S. flexneri*. Antiserum monovalen digunakan untuk menentukan serotipe. Sebagai contoh, *S. dysenteriae* tipe 1 antiserum hanya akan bereaksi dengan isolat *S. dysenteriae* Tipe 1 (Ploeg *et al.*, 2010).

Shigella diklasifikasikan berdasarkan reaksi serologis dari antigen O mereka saja, mereka tidak memiliki antigen H (flagellar) dan K (kapsul). Dengan demikian hanya antigen somatik (O) yang

digunakan untuk penentuan serotipe. Sedangkan antigen flagellar (H) tidak diekspresikan. Antigen O terdiri dari pengulangan unit oligosakarida, dan merupakan bagian dari lipopolisakarida (LPS) dari membran luar bakteri gram negatif dan berkontribusi terhadap variabilitas antigenik utama pada permukaan sel (Cabral, 2010).

6.2. Isolasi bakteri *Shigella*

Identifikasi *Shigella* spp. dalam laboratorium klinis didasarkan terutama pada isolasi *Shigella* dengan media kultur selektif, diikuti dengan identifikasi fenotip dan serotipe. Proses ini memakan waktu 3-5 hari untuk mendapatkan hasil (Li *et al.*, 2009). Proses isolasi bakteri *Shigella* melibatkan penggunaan media biakan, baik media diferensial maupun media selektif (Bopp *et al.*, 2003).

Media biakan adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran nutrisi / zat makanan yang dipakai untuk menumbuhkan mikroorganisme (bakteri, virus, jamur). Media selektif merupakan media yang selain mengandung nutrisi juga ditambah suatu zat tertentu sehingga media tersebut dapat menekan pertumbuhan mikroba lain dan merangsang pertumbuhan mikroba yang diinginkan. Sedangkan media diferensial merupakan media yang bertujuan untuk mengidentifikasi mikroba dari bakteri lainnya yang sama-sama tumbuh dalam media pembenihan berdasarkan karakter spesifik yang ditunjukkan pada media diferensial (Hadiutomo, 1993).

Beberapa media biakan yang dirancang untuk pertumbuhan bakteri enterik (*Salmonella* dan *Shigella*) adalah *Eosin Metylen Blue* (EMB) agar, agar *Mac Conkey*, *Xylose Lysine Deoxycholate* (XLD), *Hektoen enterik* (HE) agar dan *Salmonella-Shigella* (SS) agar (Todar, 2012).

Media *Mac Conkey* (MAC) merupakan media diferensial *Mac Conkey* dapat menumbuhkan bermacam-macam kuman khususnya untuk bakteri gram negatif seperti *Salmonella*, *Shigella*, *Hydrocolera* dan *E.Coli*. *Xylose Lysine Deoxycholate* (XLD) adalah media selektif dan diferensial kuman enterobacteriaceae khususnya untuk *salmonella* sp dan *shigella* sp. Media XLD dapat dikombinasikan dengan media penyubur *Gram Negative Enrichment broth* untuk mendapatkan isolasi yang lebih baik. *Salmonella Shigella* (SS) agar merupakan media selektif untuk mengisolasi kuman *Salmonella spp* dan *Shigella spp* dari sampel feses, urin, dan makanan. Untuk isolasi bakteri *Shigella*, media ini

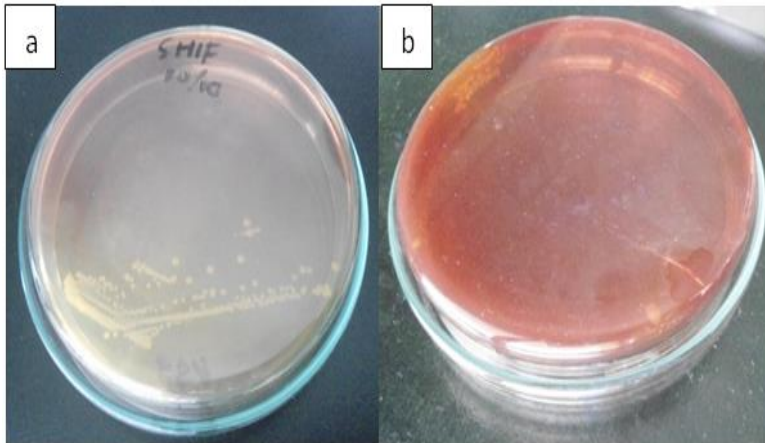
tidak disarankan karena beberapa spesies *Shigella* akan terhambat (Murray *et al.*, 1999).

Dalam suatu penelitian menunjukkan bahwa untuk isolasi *S. flexneri* dan *S. sonnei*, *xylosa-lisin-deoksikolat* (XLD) agar adalah yang paling sensitif dibandingkan *Mac Conkey* (MAC) agar dan *Salmonella-Shigella* (SS), sedangkan untuk *S. boydii* and *S. dysenteriae*, MAC adalah yang terbaik (Surjawidjaja dkk, 2007).

Vandepitte dan Vorhaegen (2011), melaporkan bahwa untuk *Shigella* spp., *Salmonella* spp., dan *I. enterocolitica*, dianjurkan menggunakan media padat (agar) serba guna dengan selektivitas rendah dan media dengan selektivitas sedang atau tinggi. *Mac Conkey* agar dengan kristal violet dianjurkan sebagai media serba guna. Untuk *I. enterocolitica*, inkubasi *Mac Conkey* agar pada suhu 35°C selama 1 hari dan kemudian pada suhu ruang (22-29 °C) satu hari lagi. *Xylosa-lisin-deoksikolat* (XLD) dianjurkan sebagai media dengan selektivitas sedang atau tinggi untuk isolasi *Shigella* spp. dan *Salmonella* spp. *Shigella dysenteriae* tipe 1, *Shigella sonnei*, dan *Escherechia coli* enteroinvasif tidak tumbuh dengan baik pada agar SS.

Beberapa studi melaporkan bahwa performa agar SS untuk isolasi spesies *Shigella* lebih inferior dibandingkan dengan MAC dan XLD, namun demikian SS agar digunakan di banyak tempat dan merupakan media yang telah mapan di dalam sistem biakan untuk isolasi *Shigella*. Agar SS ini untuk waktu lebih dari 10 tahun tidak pernah dievaluasi efektifitasnya terhadap *Shigella* meskipun dari hasil-hasil laboratorium frekuensi isolasi *Shigella* tetap rendah (Surjawidjaja dkk, 2007).

Percobaan yang kami lakukan, bakteri *Shigella* spp yang dimurnikan dengan media SS hanya dapat menumbuhkan bakteri *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* dan *Shigella boydii*. Sedangkan bakteri *Shigella dysenteriae* tidak tumbuh pada media SS, sehingga bakteri tersebut dikultur menggunakan media *Mac Conkey* (Anam, 2012). Media SS merupakan jenis media selektif yang bertujuan untuk menumbuhkan bakteri tertentu saja yaitu *Salmonella* dan *Shigella*. Media ini dapat menekan pertumbuhan bakteri atau mikroba yang lain. *Mac Conkey* agar merupakan media diferensial dan selektif karena tidak dapat menumbuhkan bakteri gram positif. Media ini terdiri dari zat warna Kristal violet untuk menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan jamur dan memungkinkan beberapa macam bakteri gram negatif batang tumbuh.



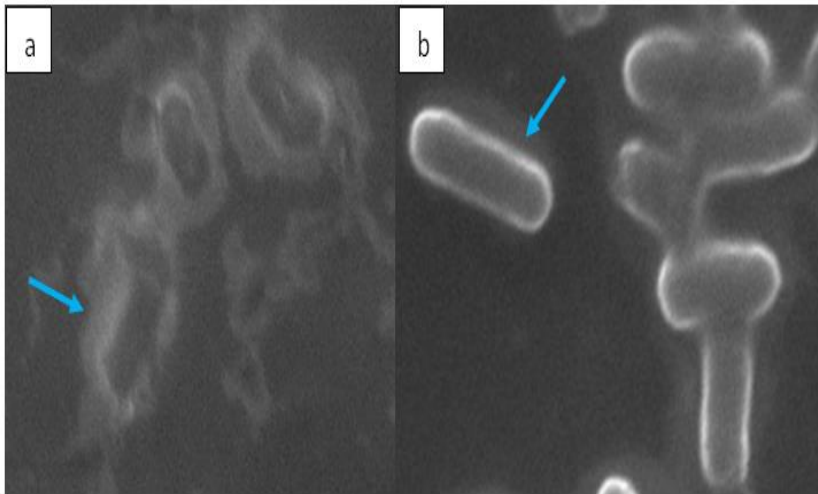
Gambar 6.1. Koloni bakteri bakteri *Shigella* spp pada media SS agar dan media *Mac Conkey*. a. koloni bakteri dengan media SS agar; b. koloni bakteri dengan media *MacConkey*. (Anam *et al.*, 2016).

Pengamatan terhadap morfologi bakteri *Shigella* terlihat koloni yang berbentuk basil (bulat), berwarna putih dan transparan serta berbentuk cembung (Anam, 2012; Jawetz *et al.*, 2008). Hasil pengamatan juga menunjukkan bahwa bakteri *Shigella* yang ditumbuhkan di media *Thiaproline Carbonat Glutamate* (TCG) dengan penambahan media penyubur *Brain heart infusion broth* (BHI) memiliki jumlah pili yang melimpah (gambar 2.2a). TCG merupakan media khusus untuk pertumbuhan pili bakteri *Shigella*, sedangkan BHI adalah media penyubur yang berguna untuk pertumbuhan berbagai macam bakteri. Bahan utama BHI terdiri dari beberapa jaringan hewan ditambah pepton, buffer posfat, dan sedikit dekstrosa. Penambahan karbohidrat memungkinkan bakteri dapat menggunakan langsung sebagai sumber energi.

Isolasi pili bakteri *Shigella* merujuk pada penelitian Sumarno *et al* (2012). Pili yang dipanen berasal dari biakan bakteri yang tumbuh pada setiap botol medium TCG yang telah diinkubasi. Hasil koleksi bakteri dikumpulkan dalam satu botol steril, kemudian di tambahkan *trichloroacetic acid* (TCA) dengan konsentrasi mencapai 3%. Setelah dikocok rata kemudian koleksi bakteri diletakkan pada suhu kamar selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan menggunakan kecepatan sebesar 6.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Pellet hasil sentrifugasi diambil dan disuspensikan memakai cairan PBS pH 7,4 dengan

berbandingan 1:10. Suspensi bakteri tersebut dicukur dengan menggunakan alat pencukur pili yaitu *bacterial pili cutter* desain Sumarno (2000). Kecepatan mencukur bakteri tersebut dilakukan secara penuh selama 30 detik. Pada potongan pertama sampai ketiga dengan kecepatan 10.000 rpm. Sedangkan potongan keempat sampai kelima dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit dan hasil cukuran dilakukan sentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatans hasil sentrifugasi yang mengandung bagian pili bakteri disimpan pada suhu 4°C.

Gambar 2.2b memperlihatkan bakteri setelah dilakukan pemotongan pili menggunakan *pili cutter*.



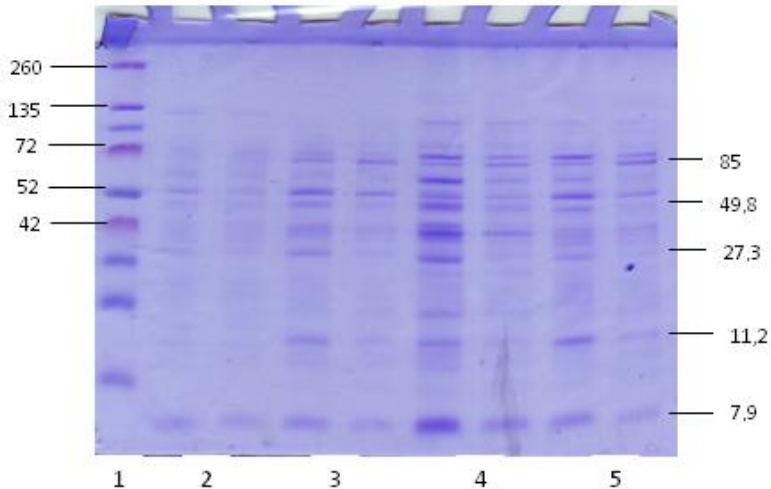
Gambar 6.2. Morfologi bakteri *Shigella* menggunakan *scanning electron microscope/ SEM* (perbesaran 50.000x). a. Sel bakteri sebelum pemotongan pili; b. Sel bakteri setelah pemotongan pili. (Anam *et al.*, 2016)

Gambar 6.2 menunjukkan adanya morfologi yang berbeda dari gambar a dan gambar b. Gambar a merupakan gambar bakteri *Shigella* yang memiliki jumlah pili yang sangat melimpah, sedangkan gambar b menunjukkan bentuk bakteri tanpa adanya pili karena bakteri sudah dilakukan pemotongan dengan *pili cutter*. Dari pengamatan bakteri menggunakan mikroskop elektron membuktikan bahwa alat *pili cutter* efektif dalam memotong pili bakteri *Shigella* dari membran selnya.

6.3. Karakterisasi protein pili bakteri *Shigella*

6.3.1. Hasil Isolasi protein pili *Shigella* spp

Setelah dilakukan pemotongan pili dengan *bacterial pili cutter*, isolasi protein dilakukan dengan menggunakan metode elektroforesis SDS-PAGE. Isolasi dilakukan terhadap keempat spesies *Shigella* (*Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* dan *Shigella boydii*). Hasil isolasi protein terlihat ekspresi band dari protein pili *Shigella* spp. Profil dan perhitungan berat molekul dari keempat spesies *Shigella* menunjukkan gambaran yang hampir sama seperti terlihat pada gambar 6.3.



Gambar 6.3. Profil protein pili 1 dan pili 3 *Shigella* spp.

1. marker
 2. *S. dysenteriae*, pili 1 dan pili 3
 3. *S. flexneri*, pili 1 dan pili 3
 4. *S. sonnei*, pili 1 dan pili 3
 5. *S. boydii*, pili 1 dan pili 3
- (Anam *et al.*, 2016)

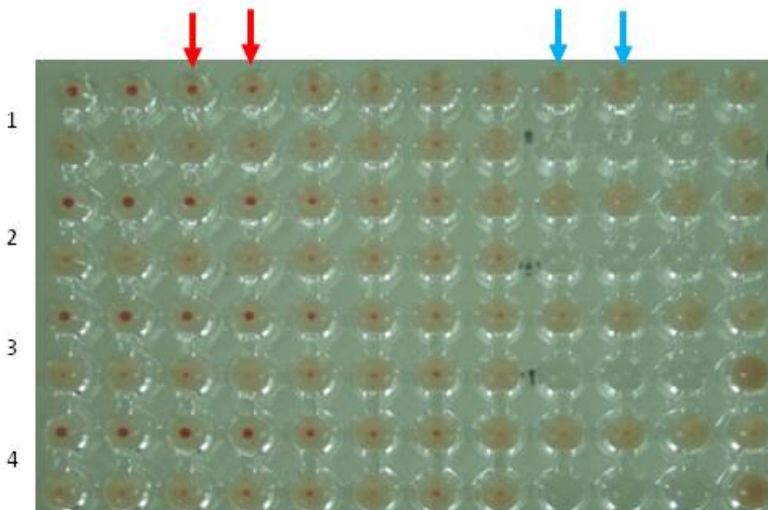
Hasil potongan yang pertama tampak warna pitanya lebih tebal dibandingkan dengan potongan yang ke tiga yang terlihat pada setiap bakteri *Shigella* spp. Setiap ulangan potongan pili untuk *Shigella* spp menghasilkan profil protein sub unit pili *Shigella* spp hasil potongan ke 1 lebih tebal dibanding potongan ke 2, ke 3 dan seterusnya yang akhirnya tidak tampak gambaran pita protein (Anam *et al.*, 2016).

Dari perhitungan berat molekul ditemukan protein pada masing-masing jenis *Shigella* dengan berat molekul 85, 49.8, 27.3, 11.2 dan 7.9 kDa. Hasil tersebut secara molekuler dapat disimpulkan bahwa keempat *Shigella* tersebut memiliki

karakteristik yang sama dan menunjukkan adanya kekerabatan yang sangat dekat. Kelima band dari masing-masing protein *Shigella spp* yang terdiri dari protein dengan berat molekul 85, 49.8, 27.3, 11.2 dan 7.9 kDa merupakan kandidat protein adhesi sub unit pili *Shigella spp*.

6.3.2. Uji hemaglutinasi crude pili *Shigella sp*

Hemaglutinasi adalah uji yang dilakukan untuk melihat kemampuan protein pili. menggumpalkan sel darah merah/eritrosit. Uji Hemaglutinasi (HA) pada *crude* pili bertujuan untuk melihat kemampuan pili mengaglutinasi sel eritrosit mencit sebelum dilakukan pemurnian protein. Gambar 2.4. dan tabel 2.1 menunjukkan hasil dan rangkuman uji HA *crude* pili *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* dan *Shigella boydii*.



Gambar 6.4. Uji HA Crude pili 1 (pemotongan 1) *Shigella spp* dengan sel eritrosit mencit. Panah biru (→) = Positif aglutinasi, panah merah (→) = negative aglutinasi

1. Pili 1 *S. dysenteriae* titer 1/2 - 1/1.048.576

2. Pili 1 *S. flexneri* titer 1/2 - 1/1.048.576

3. Pili 1 *S. sonnei* titer 1/2 - 1/1.048.576

4. Pili 1 *S. boydii* titer 1/2 - 1/1.048.576

(Anam *et al.*, 2016).

Tabel 6.1. Rangkuman titer hemaglutinasi *crude* pili *Shigella spp*.

Bakteri												
S. dys	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	+			K
S. flex	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
	-	-	-	-	-	-	-	-				K
S. son	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-				K
S. boy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-				K

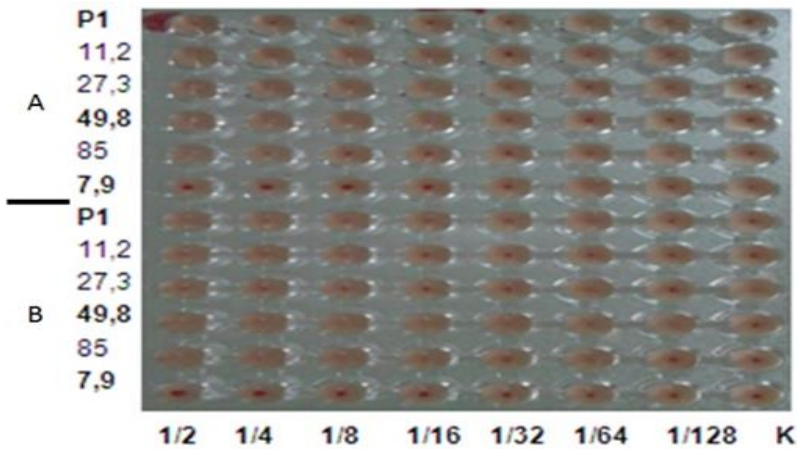
Keterangan: (+) = positif aglutinasi; (-) = negatif aglutinasi; (K) = kontrol

Gambar 6.4 dan tabel 6.1 menunjukkan hasil kemampuan *crude* pili *Shigella* spp. dalam mengaglutinasi sel eritrosit. Dari hasil tersebut ternyata ada perbedaan dalam aglutinasi eritrosit. Pada pili *Shigella dysenteriae* terjadi pada titer 1/1.048.576, aglutinasi pada pili *Shigella flexneri* terjadi pada titer 1/2048. Sedangkan pada *Shigella sonnei* dan *Shigella boydii* belum terlihat adanya aglutinasi.

6.3.3. Uji hemaglutinasi protein pili *Shigella* sp hasil purifikasi

Hasil uji hemaglutinasi bertujuan untuk mencari protein hemaglutinin dan antihemaglutinin yang dimiliki oleh *Shigella* spp. Protein hemaglutinin dan antihemaglutinin merupakan protein adhesin yang memperantarai perlekatan bakteri pada sel hospes. Hal ini dilakukan untuk mengkonfirmasi dan membuktikan bahwa protein 49,8 dan 7,9 kDa pada *Shigella* spp merupakan protein adhesin.

Uji aglutinasi dilakukan pada protein pili masing-masing spesies *Shigella* yang terdiri dari 5 band dan memiliki pita lebih tebal dari yang lain. Protein yang menjadi kandidat sebagai molekul adhesi adalah protein dengan berat molekul 49,8 kDa dan 7,9 kDa.



Gambar 6.5. Uji HA Protein pili *Shigella dysenteriae* dan *Shigella flexneri* hasil purifikasi. Panah biru (→) = Positif aglutinasi, panah merah (→) = negative aglutinasi
A. *Shigella flexneri* berat molekul; 7.9, 11.2, 27.3, 49.8, 85 kDa
B. *Shigella dysenteriae* berat molekul; 7.9, 11.2, 27.3, 49.8, 85 kDa (Anam *et al.*, 2016).

Tabel 6.2. Rangkuman uji HA Protein pili *Shigella dysenteriae* dan *Shigella flexneri* hasil purifikasi

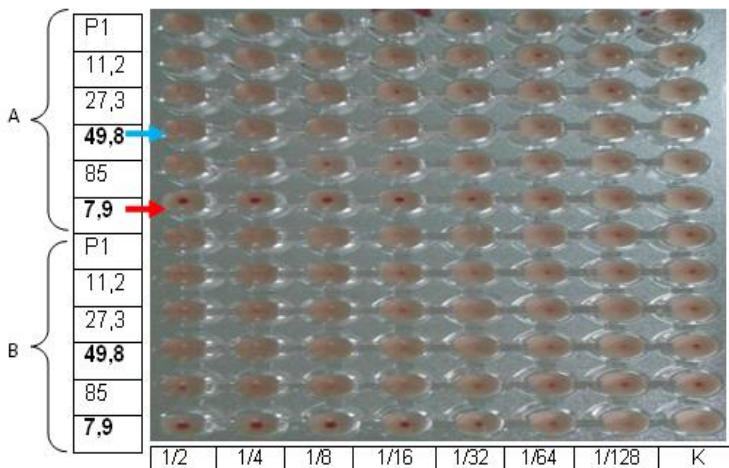
Bakteri	Protein (kDa)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	K
<i>Shigella flexneri</i>	P1	-	-	-	-	-	+	-	-
	11,2	+	+	-	-	-	-	-	-
	27,3	+	+	+	+	-	-	-	-
	49,8	+	+	+	+	-	-	-	-
	85	+	-	-	-	-	-	-	-
	7,9	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	P1	+	+	-	-	-	-	-	-
	11,2	+	+	+	-	-	-	-	-
	27,3	-	-	-	-	-	-	-	-
	49,8	+	+	+	+	+	+	+	-
	85	+	+	+	-	-	-	-	-
	7,9	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan ; (+) = positif aglutinasi
 (-) = negative aglutinasi
 (K) = control

Pada hasil uji hemaglutinasi yang terlihat pada gambar 6.5 dan tabel 6.2 bahwa protein pili *Shigella dysenteriae* 49,8 kDa terjadi aglutinasi pada titer 1/128, sedangkan pada protein 7,9 kDa tidak terjadi aglutinasi. Tidak adanya aglutinasi pada protein 7,9

kDa menunjukkan bahwa protein tersebut merupakan anti hemaglutinin. Terjadinya aglutinasi ditunjukkan dengan tidak adanya endapan eritrosit di dasar sumuran. Sedangkan endapan yang terjadi pada dasar sumur menunjukkan hasil yang negatif. Hal ini karena eritrosit tidak terikat oleh protein sub unit pili *Shigella dysenteriae*

Gambar 6.5 dan tabel 6.2 juga menunjukkan bahwa pada protein pili *Shigella flexneri* 49,8 kDa terjadi aglutinasi pada titer 1/16, sedangkan pada protein 7,9 kDa tidak terlihat adanya aglutinasi. Hal ini menunjukkan bahwa pada pili *Shigella flexneri* juga memiliki protein hemaglutinin dengan berat molekul 49,8 dan antihemaglutinin dengan berat molekul 7,9 kDa.



Gambar 6.6. Uji HA Protein pili *Shigella sonnei*, *Shigella boydii* hasil purifikasi. Panah biru () = Positif aglutinasi, panah merah () = negative aglutinasi

A. *Shigella boydii* berat molekul; 7.9, 11.2, 27.3, 49.8, 85 kDa

B. *Shigella sonnei* berat molekul; 7.9, 11.2, 27.3, 49.8, 85 kDa

Tabel 6.3. Rangkuman uji HA protein pili *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*

Bakteri	Protein (kDa)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	K
<i>Shigella boydii</i>	P1	+	-	-	-	-	+	+	-
	11,2	+	+	+	-	-	-	-	-
	27,3	+	+	-	-	-	-	-	-
	49,8	+	+	+	+	+	-	-	-
	85	+	+	-	-	-	-	-	-
	7,9	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	P1	+	+	+	+	+	+	-	-
	11,2	+	+	-	-	-	-	-	-
	27,3	+	-	+	-	+	-	+	-
	49,8	+	+	+	+	+	-	-	-
	85	-	-	-	+	-	-	-	-
	7,9	-	-	-	-	-	-	+	+

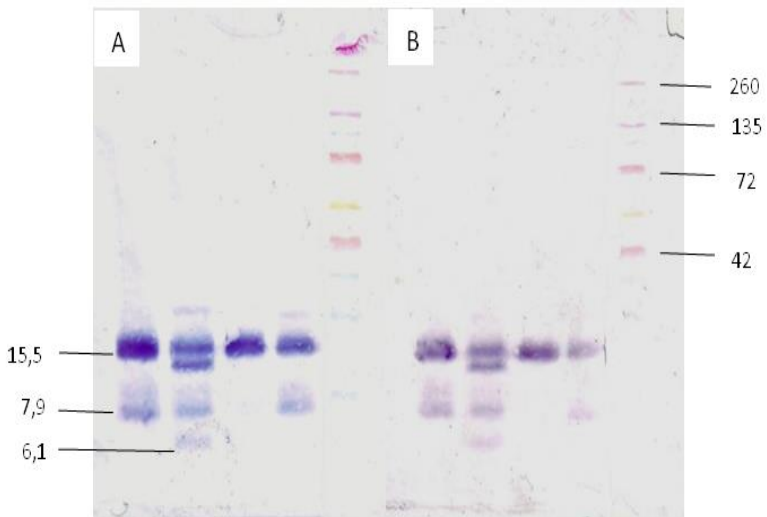
Keterangan ; (+) = positif aglutinasi
 (-) = negative aglutinasi
 (K) = control

Gambar 6.6 dan tabel 6.3 menunjukkan hasil uji hemaglutinasi pada protein sub unit pili *Shigella sonnei* dan *Shigella boydii*. Pada protein sub unit pili *Shigella sonnei* 49,8 kDa terjadi aglutinasi pada titer 1/32, sedangkan pada protein 7,9 kDa tiak menunjukkan aglutinasi. Pada protein sub unit pili *Shigella boydii* 49,8 kDa terjadi aglutinasi pada titer 1/32, pada protein 7,9 kDa tidak terlihat aglutinasi. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada pili *Shigella sonnei* dan pili *Shigella boydii*, keduanya memiliki protein hemaglutinin dengan berat molekul 49,8 kDa dan antihemaglutinin dengan berat molekul 7,9 kDa seperti yang dimiliki oleh *Shigella dysenteriae* dan *Shigella flexneri*.

Hasil uji hemaglutinasi pada *Shigella* spp menunjukkan bahwa pada keempat spesies *Shigella* memiliki karakterisasi yang sama dan memiliki protein hemaglutinin dengan berat molekul 49,8 kDa dan antihemaglutinin dengan berat molekul 7,9 kDa.

6.3.4. Reaksi antigen-antibodi dengan metode *Western blot*

Western blot adalah metode yang digunakan untuk menguji respon imun yang dapat menentukan kuantitas relatif dan berat molekul protein dalam campuran protein atau molekul lain dengan melihat reaksi antigen antibodi. Metode *western blot* digunakan untuk melihat respon imun antigen-antibodi menggunakan antibodi protein 49,8 kDa *Shigella dysenteriae* dengan reaksi silang terhadap protein 49,8 kDa keempat spesies bakteri *Shigella*. *Western blot* juga dilakukan menggunakan antibodi protein 7,9 kDa *Shigella dysenteria* terhadap protein 7,9 kDa keempat spesies bakteri *Shigella*.



Gambar 6.7. Hasil uji Western blot pada protein 49,8 kDa dan 7,9 kDa dari *Shigella spp*

A. Reaksi antigen-antibodi protein 49,8 kDa *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* dan *Shigella boydii* dengan antibodi protein 49,8 kDa *Shigella dysenteriae*.

B. Reaksi antigen-antibodi protein 7,9 kDa *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* dan *Shigella boydii* dengan antibodi protein 7,9 kDa *Shigella dysenteriae*.

Hasil *Western blot* pada gambar 6.7 (A) menunjukkan adanya pita protein yang berwarna biru keunguan dengan berat molekul 15,5 kDa dan 7,9 kDa. Protein pili dengan berat molekul 15,5 dan 7,9 pada *Shigella spp.* kemungkinan memiliki epitop yang dapat dikenali oleh antibodi protein 49,8 kDa. Sedangkan protein 49,8 kDa pada *Shigella spp.* tidak dapat direspon oleh antibodi protein 49,8 kDa, hal ini dikarenakan pada protein pili 49,8 kDa masih belum terurai pada saat diseparasi. Sehingga epitop yang terdapat pada protein tersebut masih berada di dalam gumpalan protein yang mengakibatkan antibodi tidak dapat merespon antigen tersebut.

Hasil gambar 6.7 (B) menunjukkan adanya pita protein yang berwarna biru keunguan dengan berat molekul 15,5 kDa dan 7,9 kDa. Protein pili dengan berat molekul 15,5 pada *Shigella spp.* kemungkinan memiliki epitop yang dapat dikenali oleh antibodi protein 7,9 kDa. Pada antigen protein 7,9 kDa *Shigella spp.* dapat

direspons oleh antibodi protein 7,9 kDa. Hal ini dikarenakan antibodi protein 7,9 kDa mengandung reseptor yang dapat mengenali epitop dari protein pili 7,9 kDa *Shigella* spp.

Gambar 6.7 menunjukkan terdapat kemiripan pada hasil *western blotting* antara antibodi protein sub unit pili 49,8 kDa dengan antibodi protein sub unit pili 7,9 kDa. Kedua jenis antibodi ini menunjukkan reaksi yang positif pada protein sub unit pili BM 15,5 kDa , 7,9 kDa dan 6,1 kDa. Sedangkan protein sub unit pili BM 49,8 kDa reaksinya negatif atau tidak direspons. Hasil tersebut terkait dengan karakter protein pili pada kelompok bakteri gram negatif sebagai media adhesi, dan pertahanan diri, sehingga mampu mengenali serta berikatan dengan minimal satu molekul epitop (Kundera, 2011). Hasil tersebut juga menunjukkan bahwa ada kemiripan epitop dari penyusun protein sub unit pili keempat spesies *Shigella*, sehingga mampu menjalankan fungsinya sebagai protein adhesin. Hasil ini juga sesuai dengan hasil yang ditemukan oleh Sumarno dkk (1991) bahwa konformasi protein monomer dari tetramer protein hemagglutinin berfungsi sebagai protein anti hemagglutinin.

BAB VII

PERKEMBANGAN SEL Th17 DAN PERAN SITOKIN Th17 DALAM MENGENDALIKAN PENYEBARAN PATOGEN DI MUKOSA USUS

7.1. Peran sel T dalam mengatur pertahanan Mukosa Usus

Sel T merupakan salah satu kelompok sel darah putih yang diketahui sebagai limfosit dan memainkan peran utama pada kekebalan selular. Sel T mampu membedakan jenis patogen dengan kemampuan berevolusi sepanjang waktu demi peningkatan kekebalan setiap kali tubuh terpapar patogen. Hal ini dimungkinkan karena sejumlah sel T teraktivasi menjadi sel T memori yang mempunyai kemampuan berkembangbiak dengan cepat untuk melawan infeksi yang mungkin terulang kembali (*memory T cell*) (Kresno, 2010).

Sel-sel limfosit menempati suatu organ yang disebut organ limfoid. Organ limfoid dibagi menjadi dua bagian, pertama disebut sentral atau organ limfoid primer dan kedua disebut periferal atau organ limfoid sekunder. Sel-sel limfosit dihasilkan oleh organ limfoid primer yang pada gilirannya akan menuju ke organ limfoid sekunder. Yang termasuk organ limfoid primer adalah sumsum tulang dan timus, sedangkan yang termasuk organ limfoid sekunder di antaranya adalah *spleen*, *lymph node*, *Peyer's patch*, *appendix*, *adenoid*, dan tonsil (Abbas & Litchman, 2004).

Limfosit T berasal dari sumsum tulang, limfosit T kemudian melakukan migrasi dari sumsum tulang menuju organ timus sebelum masak dan mengalami pemasakan pada organ ini. Limfosit yang telah mengalami pemasakan pada organ limfoid primer segera memasuki peredaran darah menuju organ limfoid sekunder. Antigen dan limfosit akhirnya akan bertemu pada organ limfoid periferal yaitu pada *lymph node*, *spleen*, dan jaringan limfoid mukosa. Pada organ limfoid periferal inilah sebenarnya dimulainya imunitas adaptif. Pada organ limfoid periferal sel-sel tertentu yang dikenal dengan nama *antigen presenting cell* (APC) seperti makrofag, sel dendritik, dan sel B akan mempresentasikan antigen dalam bentuk peptida. Peptida dipresentasikan pada permukaan APC dalam keadaan terikat oleh *major histocompatibility complex* (MHC). Limfosit akan mengenali antigen yang terikat oleh MHC (Abbas & Litchman, 2004).

Banyak mikroorganisme yang hidup dan berkembang biak intraseluler, antara lain virus dan mikroba intraseluler seperti M-

tuberkulosa dan Shigella, sehingga sulit dijangkau oleh antibodi. Untuk melawan mikroorganisme intraseluler diperlukan respon imun seluler yang merupakan fungsi limfosit T. Terdapat 2 cara untuk menyingkirkan mikroorganisme intraseluler ini yaitu 1) Sel terinfeksi dapat dibunuh melalui sistem efektor ekstraseluler, misalnya oleh sel T sitotoksik, 2) Sel terinfeksi diaktivasi agar mampu membunuh mikroorganisme yang menginfeksi. Subpopulasi sel T yang disebut sel T-*helper* (Th) akan mengenali mikroorganisme atau antigen bersangkutan yang terdapat pada sel makrofag atau sel yang terinfeksi melalui *T cell receptor* (TCR) dan molekul MHC kelas-II. Sinyal yang diterima dari sel yang terinfeksi ini menginduksi limfosit untuk memproduksi berbagai jenis limfokin, termasuk diantaranya interferon, yang dapat membantu makrofag menghancurkan mikroorganisme tersebut (Kresno, 2010).

Subpopulasi limfosit T lain yang disebut sel T-sitotoksik (Tc) juga berfungsi menghancurkan mikroorganisme intraseluler yang disajikan melalui atau bersama-sama dengan MHC kelas I dengan cara kontak langsung antar sel (*cell to cell contact*). Selain menghancurkan mikroorganisme secara langsung, sel T sitotoksik juga menghasilkan γ interferon yang mencegah penyebaran mikroorganisme ke sel-sel lain (Kresno, 2010).

Sel T merupakan komponen utama mukosa usus yang terdapat dalam epitel mukosa (limfosit intraepitel) dan di dalam lamina propria (Blaschitz & Raffatellu, 2010). Limfosit intraepitel terbanyak adalah sel T (>90%), yang berupa sel CD4+ dan CD8+ (Abbas & Litchman, 2004). Limfosit intraepitel berfungsi sebagai pertahanan dan integritas epitel usus (Blaschitz & Raffatellu, 2010). Ketika terjadi infeksi di daerah perifer, maka sel dendritik segera menangkap antigen tersebut dan membawanya dari tempat infeksi ke *draining lymph node* melalui pembuluh limfatik afferent. Pada *lymph node* sel dendritik akan mempresentasikan antigen yang ditangkap dalam bentuk peptida ke sel T yang bersirkulasi di daerah tersebut. Sel dendritik juga memproduksi sitokin untuk membantu aktivasi sel T (Murphy, 2008).

Sel T CD4+ sangat penting sebagai pertahanan mukosa usus. Penurunan sel T CD4+ menyebabkan peningkatan kerentanan terhadap bakteremia yang disebabkan oleh patogen usus seperti Salmonella, Shigella dan *Champylobacter*. Pada percobaan menggunakan hewan coba tikus, penurunan CD4+ atau CD8+ subset sel T menyebabkan peningkatan translokasi E.coli ke kelenjar getah bening mesenterika (Blaschitz & Raffatellu, 2010)

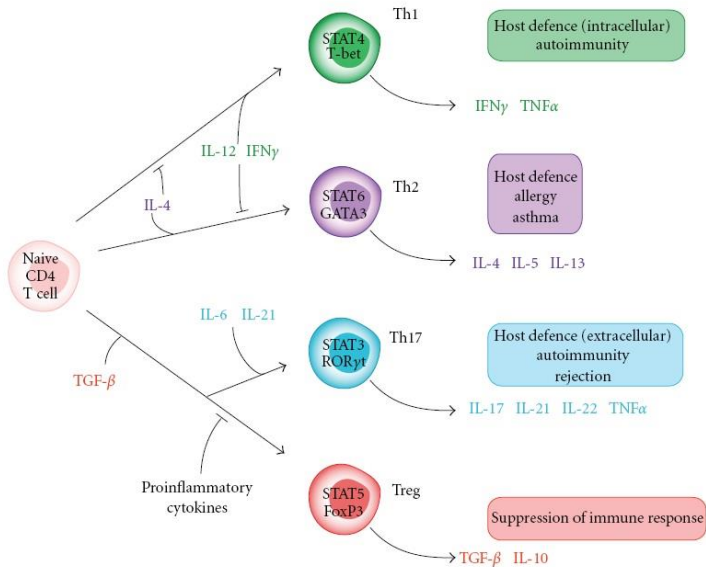
7.2. Perkembangan Sel Th17 di Mukosa Usus

7.2.1. Perkembangan Sel Th17

Saat ini sel T CD4+ dibagi menjadi empat subset besar, berdasarkan profil ekspresi mereka dari faktor transkripsi dan sitokin yang disekresi, yaitu Th1, Th2, Th17, dan sel T regulator (Treg). Dua subset utama, Th1 dan Th2 diidentifikasi pada tahun 1980. Sel Th1 ditandai dengan sekresi IFN γ , sebuah sitokin proinflamasi yang diperlukan untuk aktivasi makrofag dan terlibat dalam imunitas terhadap patogen intraseluler. Sel Th2 terutama memproduksi IL-4, IL-5, dan IL-13 dan memainkan peran penting dalam alergi serta dalam pembersihan berbagai patogen ekstraseluler dan parasit. Sel T regulator (Treg) adalah subset unik dari sel T helper CD4+ yang mengontrol respon sel T efektor untuk mencegah reaksi autoimun. Diferensiasi Treg diinduksi oleh TGF- β namun terhambat dengan hadirnya sitokin pro-inflamasi. Sel Treg dikarakterisasi oleh ekspresi dari faktor transkripsi Foxp3 dan STAT5 dan ekspresi CD25 pada permukaannya (Chen Zhi & O'Shea, 2008).

Perkembangan imunologi selanjutnya menghasilkan penemuan lain dalam perkembangan sel T. Penemuan sel T efektor yang secara selektif memproduksi sitokin IL-17 disebut sebagai sel Th17 (Kresno, 2010). Sel Th17 adalah subset baru dari sel T helper CD4+ yang ditemukan pada tahun 2005. Mereka mewakili subtipe lain dari sel T helper proinflamasi yang berbeda dari sel Th1 dan Th2 dalam perkembangan dan fungsinya (Chen Zhi & O'Shea, 2008).

Diferensiasi sel Th17 memerlukan aksi gabungan dari *transforming growth factor- β* (TGF- β), IL-6, dan IL-21 pada tikus, sedangkan IL-6 dan IL-21 dapat digantikan oleh IL-23 atau IL-1 β pada manusia. Sitokin ini menginduksi *retinoic acid related orphan receptor* (ROR γ t) pada tikus atau RORc pada manusia. *Retinoic acid related orphan receptor* (ROR γ t) atau RORc diperlukan untuk perkembangan sel Th17, namun faktor transkripsi ROR α dan STAT3 juga diaktifkan (Chen Zhi & O'Shea, 2008).



Gambar 7.1. Diferensiasi subset sel T CD4+ (pada tikus).

Setelah aktivasi, sel T CD4+ naif dapat berdiferensiasi menjadi subset yang berbeda tergantung pada lingkungan sitokin sekitarnya. Sub-populasi yang berbeda menunjukkan pola ekspresi yang berbeda dari faktor transkripsi dan dapat ditandai dengan sekresi sitokin penanda yang unik untuk setiap subset. Setiap subset mengambil bagian pada berbagai jenis respon imun terhadap berbagai patogen atau mediasi autoimunitas (Chen Zhi & O’Shea, 2008).

Gambar 7.1 merangkum sitokin yang mendorong diferensiasi populasi sel T-helper, sitokin efektor utama mereka, dan karakteristik faktor transkripsi untuk subset yang berbeda. Diferensiasi sel Th1 terutama disebabkan oleh IL-12 dan dapat lebih ditingkatkan dengan *Interferon γ* (IFN γ). Sel Th2 berkembang dengan keberadaan IL-4. Th1 dan Th2 secara negatif mengatur satu sama lain melalui aksi sitokin spesifik mereka: IL-12 menekan induksi sel Th2, sedangkan IL-4 menghambat perkembangan sel Th1. Pada level transkripsional, sitokin Th1 berpolarisasi menginduksi faktor transkripsi T-bet dan STAT4, sedangkan sel Th2 memerlukan aksi GATA3 dan STAT6 (Chen Zhi & O’Shea, 2008).

Perkembangan sel Th17 ditekan oleh IFN γ dan IL-4 yang mempromosikan berturut-turut sel Th1 atau Th2. *Transforming growth factor- β* (TGF- β) saja, dalam ketiadaan sitokin proinflamasi

lainnya seperti IL-6, menginduksi sel T regulator FoxP3+, bukan sel Th17, yang menunjukkan hubungan erat antara Th17 dan Treg. Setelah sel Th17 mengalami perkembangan, diperlukan IL-23 untuk stabilisasi dan ekspansi lebih lanjut (pada tikus). Pada manusia, IL-1 β dan IL-6 juga dapat beraksi meningkatkan perkembangan dan ekspansi sel Th17. Apabila sel Th17 teraktivasi, maka akan mensekresikan IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, dan *tumor necrosis factor* (TNF- α), yang kemudian mempromosikan inflamasi jaringan dengan induksi mediator proinflamasi lainnya dan perekrutan leukosit, terutama neutrofil, ke situs inflamasi. *Interleukin 17* dapat menginduksi ekspresi kemokin atraktan (neutrofil), seperti CXCL1, CXCL2 atau CXCL8 pada berbagai jenis sel, di antaranya berbagai jenis sel epitel dan endotel, tetapi IL-17 itu sendiri juga dapat beraksi untuk memobilisasi dan mengaktifkan neutrofil (Chen Zhi & O'Shea, 2008).

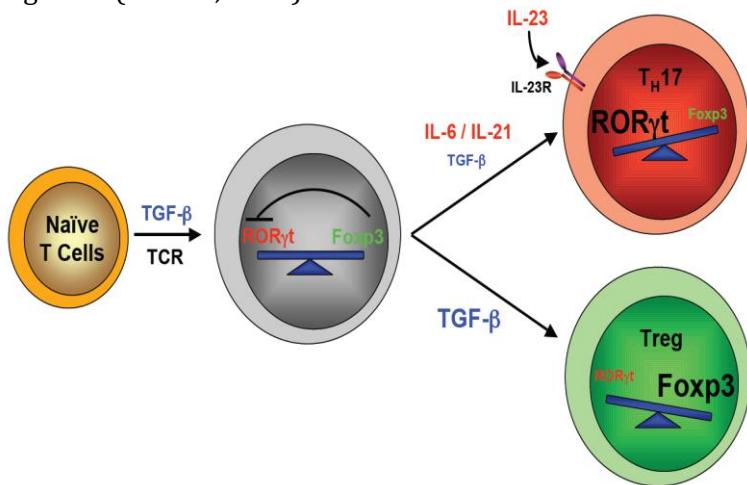
Beberapa sitokin yang menginduksi diferensiasi limfosit Th17 adalah TGF- β dan IL-6. *Transforming growth factor- β* (TGF- β) selama ini dianggap sebagai sitokin anti inflamasi, yang berperan sebagai penekan dalam proses autoimun dengan menginduksi faktor transkripsi untuk sel Treg, Fox-P3. Sitokin IL-6 merupakan pro inflamasi yang menghambat aktivitas Fox-P3, dengan demikian memainkan peran penting dalam menjaga keseimbangan antara sel Th17 dan sel Treg. Selain itu IL-6 juga meningkatkan ekspresi IL-23R dalam limfosit Th0, membuat mereka lebih sensitif terhadap IL-23 (Nawrocka *et al.*, 2011).

Studi selanjutnya menjelaskan bahwa diferensiasi sel Th17 juga dapat terjadi tanpa IL-6, TGF- β dan IL-21. *Interleukin-21* merupakan sitokin yang disekresikan oleh sel Th17. Percobaan menggunakan mencit defisiensi IL-6, telah diamati bahwa dalam keadaan tidak ada IL-21, diferensiasi sel Th17 menjadi terganggu. Studi lain menjelaskan bahwa perkembangan sel Th17 tidak terganggu pada mencit defisiensi IL-21 dan reseptor IL-21 (IL-21R). *Interleukin-6* menginduksi diferensiasi Th17 lebih kuat dan tidak tergantung pada IL-21. Mc Geachy *et al.*, menjelaskan bahwa proses pematangan limfosit Th17 sangat tergantung pada IL-23. Tanpa adanya sitokin ini, diferensiasi akan dihambat pada tahap awal (Nawrocka *et al.*, 2011).

7.2.2. Faktor Transkripsi sel Th17

Faktor transkripsi terpenting untuk perkembangan sel Th17 adalah *retinoic acid related orphan receptor* (ROR γ t). Sel ini terbukti berasal dari sel induk yang sama dengan sel Treg

(CD4+Foxp3+) dan keduanya diproduksi sebagai respon terhadap TGF- β , tetapi polarisasi kearah Th17 hanya terjadi apabila secara simultan juga diproduksi IL-6 (Romagnani, 2008 dalam Kresno, 2010). Data terbaru menunjukkan bahwa jalur perkembangan timbal balik untuk pembentukan sel efektor Th17 dan Treg dikendalikan oleh lingkungan sitokin melalui program transkripsi nyang ketat (Kresno, 2010).



Gambar 7.2. Perkembangan sel Treg dan sel Th17 dengan pengaruh TGF- β dan IL-6 (Zhou & Littman, 2009)

Gambar di atas memperlihatkan bahwa polarisasi perkembangan sel Treg dan Th17 dibawah pengaruh TGF- β dan IL-6. *Transforming growth factor- β* (TGF- β) saja mampu menginduksi ekspresi kedua faktor transkripsi utama yang terlibat dalam program genetik, yaitu ROR γ t untuk Th17 dan Foxp3 untuk sel Treg. Walaupun demikian TGF- β tidak akan mengawali differensiasi Th17, kecuali apabila ada IL-6 atau IL-21. Apabila sitokin ini tidak ada, Foxp3 berinteraksi dengan ROR γ t dan menekan transkripsi IL-17. Sitokin IL-6 atau IL-21 dan IL-23 mampu melepaskan hambatan Foxp3 terhadap ROR γ t dan mengaktifkan STAT-3 sehingga diferensiasi Th17 dapat berlangsung. Proses ini juga dapat dipengaruhi oleh konsentrasi TGF- β dalam lingkungan. *Transforming growth factor- β* dalam konsentrasi rendah akan bersinergi dengan IL-6 dan IL-21 untuk mendorong diferensiasi Th17 (mengarahkan polarisasi kearah sel Th17) sedangkan konsentrasi TGF- β tinggi akan menekan ekspresi IL-23 yang berakibat polarisasi perkembangan kearah Treg (Zhou

& Littman, 2009).

Ivanov *et al* (2006) juga menjelaskan bahwa ROR γ t adalah faktor transkripsi yang berperan penting dalam diferensiasi sel Th17. Ivanov *et al* menemukan bahwa sel T di lamina propia yang mengekspresikan ROR γ t adalah IL-17+ dan IL-17-, Ekspresi sel-sel ini menurun pada mencit defisiensi ROR γ t. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ROR γ t diperlukan untuk perkembangan sel Th17 di lamina propia. Selain itu tercatat bahwa peningkatan ekspresi ROR γ t dalam sel T CD4+ yang terinfeksi retrovirus menstimulasi diferensiasi sel naif CD4+ ke sub populasi Th17. Berikutnya defisiensi ROR γ t menghambat diferensiasi Th17.

Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT3) merupakan faktor transkripsi lain yang berperan penting dalam diferensiasi sel Th17. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* berperan dalam ekspresi ROR γ t. Dilaporkan bahwa defisiensi *Suppressor of cytokine Signaling 3* (Socs3), partikel yang mensupresi STAT3, dapat menyebabkan peningkatan ekspresi IL-17 secara signifikan. Selain itu, peningkatan aktivasi STAT3 dapat menginisiasi diferensiasi sel Th17 (Nawrocka *et al.*, 2011).

Beberapa kelompok peneliti lain mengidentifikasi faktor transkripsi lain yaitu *Aryl Hydrocarbon Receptor* (AHR). *Aryl Hydrocarbon Receptor* ditemukan pada keduanya, limfosit Th17 dan Treg. Ekspresi AHR tidak menghambat perkembangan Th17 tetapi menghambat sekresi IL-22 (Veldhoen *et al.*, 2008; Dong, 2009).

Faktor transkripsi lain yang juga berperan dalam perkembangan sel Th17 adalah *Interferon Regulator Factor-4* (IRF4). Defisiensi IRF4 menyebabkan berkurangnya ekspresi ROR γ t dan peningkatan ekspresi Foxp3, sehingga menstimulasi perkembangan sel Treg dan menghambat diferensiasi Th17 (Nawrocka *et al.*, 2011).

7.2.3. Regulasi homeostatik sel Th17 oleh Mikrobiota Usus

Perkembangan sistem imun di mukosa usus dipengaruhi oleh mikrobiota usus. Mikrobiota usus berperan penting dalam mengatur penyerapan nutrisi dan vitamin, mencegah kolonisasi bakteri patogen dan merangsang pengembangan struktur limfoid sekunder seperti *patch peyer* dan folikel limfoid usus (Rubino *et al.*, 2012). Mikrobiota usus terutama terdiri dari bakteri *filum bacteroidetes* dan *firmicutes*. Studi menunjukkan bahwa bakteri dari genus *clostridia* (Filum Firmicutes), disebut sebagai *segmented filamentous bacteria* (SFB), SFB sangat penting perannya dalam perkembangan sel-sel Th17 pada usus tikus (Blaschitz & Raffatellu,

2010). Bacterium derived ATP adalah faktor penting yang menstimulasi *dendritic cells* (DC) untuk diferensiasi sel Th17 (Atarashi, 2008). *Segmented filamentous bacteria* (SFB), anggota genus *Clostridium* teridentifikasi menempel pada permukaan enterosit di ileum, sebagai spesies mikroba tertentu yang menginduksi respon homeostatik Th 17 di usus halus (Rubino *et al.*, 2012).

Salah satu faktor yang mempengaruhi komposisi mikrobiota usus adalah ekspresi protein antimikroba seperti defensin. Komposisi mikrobiota dapat berubah termasuk hilangnya SFB (Blaschitz & Raffatellu, 2010). Perubahan mikrobiota usus menyebabkan penurunan produksi IL-17 oleh sel T di lamina propria. Sebaliknya tikus yang dipapar dengan SFB memiliki peningkatan gen yang terkait dengan peradangan dan pertahanan antimikroba sehingga lebih tahan terhadap infeksi *Citrobacter rodentium* (Ivanov *et al.*, 2009).

Pengurangan level SFB mikrobiota usus oleh *paneth-cell-derived defensins* berkorelasi dengan penurunan jumlah sel Th17 di lamina propria (Ivanov *et al.*, 2009). Respon homeostatis Th17 terhadap SFB dapat meningkatkan respon imun inang selama infeksi *Citrobacter rodentium* dengan mencegah kolonisasi patogen di kolon (Salzman *et al.*, 2010). Sejalan dengan temuan tersebut, mencit bebas kuman juga ditemukan mengalami gangguan kemampuan pada respon Th17 di lamina propria selama infeksi dengan *Salmonella typhimurium*, hal ini mengindikasikan bahwa elemen mikrobiota dibutuhkan untuk pertahanan usus melalui respon Th17 terhadap bakteri patogen (Rubino *et al.*, 2012).

7.2.4 Sumber-sumber IL-17 dan IL-22 di Mukosa Usus

Sel Th CD4⁺ merupakan populasi sel pertama yang mensekresi IL-17A dan IL-22, selanjutnya diketahui bahwa IL-17A dan IL-22 juga diproduksi oleh sel tipe lain. Sel yang paling banyak memproduksi IL-17 dan IL-22 di usus adalah sel Th17. Hal ini dibuktikan dengan percobaan menggunakan kera, menunjukkan bahwa penurunan sel Th17 CD4⁺ di usus menyebabkan peningkatan infeksi secara progresif setelah dipapar dengan *Salmonella typhimurium* (Rubino *et al.*, 2012).

Penurunan sel T CD4⁺ pada mencit model streptomycin *Salmonella typhimurium* menyebabkan penurunan IL-17 dan berhubungan dengan penurunan protektifitas di mukosa. Selain itu subset sel T CD4⁺ di lamina propria mengekspresikan IL-17A dan IL-22 selama fase respon imun bawaan pada infeksi dengan

Salmonella Typhimurium (1 hari pasca infeksi) dan Citrobacter rodentium (4 hari pasca infeksi), dan saat ini telah teridentifikasi dan dinamakan sel *innate* Th 17 (iTh17) (Geddes *et al.*, 2011).

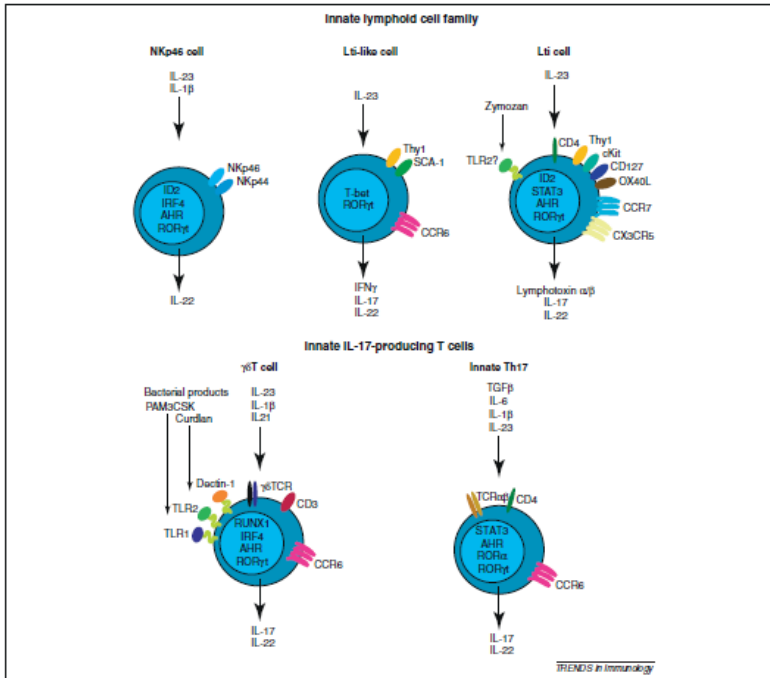
Selama infeksi Salmonella Typhimurium, IL-17A dan IL-22, ekspresinya di induksi sangat kuat di sel $T\gamma\delta$ usus (Geddes *et al.*, 2011). Sel $T\gamma\delta$ banyak ditemukan di *Intestinal epithelial lymphocyte* (IEL). Kompartemen dari mukosa usus dan sel ini dibagi menjadi subset penghasil IL-17 atau subset penghasil $IFN\gamma$ (Rubino *et al.*, 2012).

Sel $T\gamma\delta$ CD27-ROR γ t⁺ mensekresi IL-17A ketika distimulasi oleh IL-23, IL1 β atau *phorbol 12-myristate 13 acetate* (PMA) dan ionomycin cocktail atau sel $T\gamma\delta$ CD27⁺ mengekspresikan faktor transkripsi T-bet, yang mengatur sekresi $IFN\gamma$ (Rubino *et al.*, 2012).

Blaschitz & Raffatellu (2010) juga menjelaskan bahwa IL-17 dihasilkan oleh sel $T\gamma\delta$ sebagai respon terhadap stimulasi IL-23. Sel *natural killer* (NK) dan NKT juga dapat menghasilkan IL-17 dan IL-22. *Antigen presenting cells* (APC) seperti sel dendritik dapat mensekresikan IL-22 sebagai respon infeksi bakteri. Sitokin IL-17A, IL-17F dan IL-22 diekspresikan di mukosa sebagai respon terhadap beberapa bakteri dan patogen lain di usus (Blaschitz & Raffatellu, 2010).

Sitokin Th17 juga disekresikan oleh sel jenis lain yaitu sel Lti. Sel Lti murine di definisikan sebagai ekspresi permukaan sel dari CD4⁺CCR7⁺THY1⁺, faktor transkripsi ROR γ t, dan leukosit *lineage marker negative* (LIN⁻). Pada manusia, sel LT, diklasifikasikan sebagai LIN⁻CD4⁺CD127⁺CD45^{int}. Sel Lti dapat di isolasi dari *spleen* (limpa), kelenjar getah bening dan lamina propria usus, dan berperan penting pada perkembangan organ limphoid melalui produksi *lymphotoxin* (LT) α dan LT β . Pada awal sekresi IL-22 oleh sel LT_i epitel usus dibutuhkan untuk mengontrol infeksi Citrobacter rodentium (Rubino *et al.*, 2012).

Seperti sel LT_i, IL-23 juga diperlukan untuk menginduksi IL-17A, $IFN\gamma$ dan IL-22 di ekspresikan oleh THY1⁺SCA-1⁺Lti-like ILCs. Percobaan pada mencit ditemukan bahwa NKp46⁺ ILCs yang distimulasi oleh IL-23 juga mensekresikan IL-22. NKp46⁺ ILCs diregulasi selama infeksi Citrobacter rodentium. Namun NKp46 tidak dibutuhkan untuk melawan infeksi patogen, hal ini dibuktikan dengan studi menggunakan mencit defisiensi NKp46. Studi tersebut menjelaskan bahwa pada manusia dan murine sel Lti dapat mengekspresikan marker NK *in vitro* (Rubino *et al.*, 2012).



Gambar 7.3. Produksi IL-17 dan IL-22 di usus. Sel NKp46 memproduksi IL-22 sebagai respon terhadap IL-23 dan IL-1β, pada permukaan sel mengekspresikan marker NKp46 dan NKp44, dan faktor transkripsi ID2,IRF4, AHR, RORγt. Sel Lti-like memproduksi IL-17, IL-22 dan IFNγ sebagai respon terhadap IL-23, pada permukaan sel mengekspresikan marker THY1, *stem cell antigen-1* (SCA-1) dan CCR6, dan faktor transkripsi T-bet dan ROR γt. Sel Lti memproduksi LTα dan LTβ, IL-17 dan IL-22 sebagai respon terhadap IL-23 dan stimulan TLR2 seperti Zymozan, pada permukaan sel mengekspresikan marker CD4, THY1, cKit, CD127, OX40L, CCR7 dan CX3CR5, dan faktor-faktor transkripsi ID2, STAT3, AHR dan RORgt. Sel Tγδ memproduksi IL-17 dan IL-22 sebagai respon terhadap IL-23, IL-1β dan IL-21. Sel Th 17 memproduksi IL-17 dan IL-22 sebagai reson terhadap TGFβ, IL-6, IL-1β dan IL-23 (Rubino *et al.*, 2012)

Gambar di atas menjelaskan bahwa IL-17 dan IL-22 di usus di produksi oleh sel NKp46 sebagai respon terhadap IL-23 dan IL-1β, sel Lti-like sebagai respon terhadap IL-23 dan sel Lti sebagai respon terhadap IL-23 dan stimulan TLR2 seperti Zymozan.

7.3. Peran sitokin Th17 dalam mengendalikan penyebaran patogen

7.3.1 Fungsi Fisiologis Sitokin Th17

Limfosit Th17 dalam merespon sitokin tertentu (TGF- β , IL-6, IL-21, IL-23 dan IL-1b) mensekresi IL-17A (IL-17), IL-17F, IL-21 dan IL-22 (Nawrocka *et al.*, 2011). Pada manusia dan mencit, anggota keluarga IL-17 terdiri dari IL-17A (disebut juga IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (dikenal sebagai IL-25), dan IL-17F. *Interleukin-17A* dan IL-17F mempunyai sequence homologi yang dekat, sinyal keduanya melalui reseptor IL-17A dan reseptor IL-17C, ditemukan pada sel hematopoietik dan non hematopoietik (Rubino *et al.*, 2012).

Secara fungsional, IL-17A menginduksi granulopoiesis neutrofil dengan menstimulasi sel-sel epitel untuk mensekresikan *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF). Selain itu, IL-17A dan IL-17F dapat langsung merekrut dan mengaktifkan respon seluler neutrofil pada lokasi inflamasi (Rubino *et al.*, 2012). *Interleukin-17A* bersama sinyal IL-22 melalui reseptor IL-22, yang terletak di sel non hematopoietik, untuk menginduksi mekanisme imun bawaan epitel tergantung STAT3. Ini termasuk menstimulasi sekresi antimikroba seperti protein Reg, lipocalin-2 dan defensin, memperkuat *tight junctions* antara enterosit dan meningkatkan proliferasi sel epitel (Sonnenberg *et al.*, 2011).

Interleukin-21 disekresikan oleh banyak sel-sel dari sistem kekebalan tubuh, terutama oleh sel-sel Th17. *Interleukin-21* berperan pada diferensiasi sel Th17. Selain itu, IL-21 juga berperan aktif pada imunitas seluler dan humoral. *Interleukin-21* mengatur maturasi dan diferensiasi akhir limfosit B dengan menginduksi faktor transkripsi yang terlibat, sebagai contoh IL-21 meningkatkan sekresi IFN- γ dari NK-sel dan limfosit Th1. *Interleukin-21* memodulasi perkembangan sel NK dan bersama-sama dengan IL-15 mengatur proliferasi T0 dan limfosit T CD8⁺. *Interleukin-21* juga menghambat maturasi sel dendritik dan menstimulasi produksi IL-10. Studi terbaru menunjukkan bahwa IL-21 menyebabkan kerusakan mukosa dengan meningkatkan metaloproteinase, pada sel epitel usus dan fibroblas. Studi tersebut menunjukkan IL-21 berperan dalam kerusakan jaringan usus (Nawrocka *et al.*, 2011).

Studi lain membuktikan bahwa pada mencit dan manusia dengan *Systemic Lupus Erythematosus* (SLE), konsentrasi IL-21 dalam serum meningkat. Polimorfisme reseptor IL-21 berhubungan dengan kerentanan terhadap penyakit. Studi tersebut juga menjelaskan bahwa inaktivasi IL-21 pada mencit dapat mengurangi gejala SLE (Ishigame *et al.*, 2009). Percobaan lain membuktikan bahwa netralisasi sitokin IL-21 menyebabkan

penurunan yang signifikan terhadap kebutuhan dosis insulin pada penderita diabetes tipe-1. Hal ini menunjukkan bahwa IL-21 berperan dalam patogenesis penyakit autoimun (Nawrocka *et al.*, 2011)

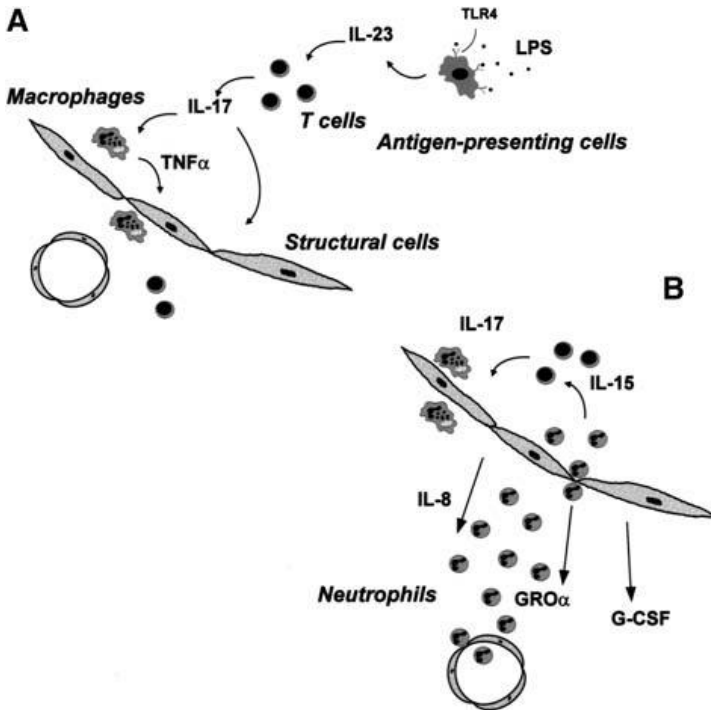
7.3.2. Peran sitokin Th17 pada penyakit Infeksi

Sitokin Th17 telah diketahui mempunyai peran dalam pertahanan sistem imun inang dan dalam proses patogenesis penyakit infeksi. *Interleukin-17* adalah sitokin utama limfosit Th17. *Interleukin-17A/IL-17A* adalah yang paling poten untuk menginduksi kemokin di sel-sel epitel (Nawrocka *et al.*, 2011).

Interleukin-17, IL-17F dan IL-22 berperan dalam melawan patogen ekstraseluler dengan menstimulasi pematangan neutrofil dan kemotaksis (Salzman *et al.*, 2010). Disamping itu, sitokin ini juga menginduksi ekspresi protein antimikroba seperti β -defensin 2, s100Ag, s100A8 dan s100A7 di epidermis, epitel, paru-paru dan saluran pencernaan (Song *et al.*, 2011).

Interleukin-17 merupakan sitokin pro-inflamasi yang dapat meningkatkan ekspresi *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) pada sel epitel dan menstimulasi ekspresi kemokin (IL-8, CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL6), IL-6 dan beberapa faktor pertumbuhan termasuk GM-CSF dan VEGF) dari sel epitel dan fibroblas. Sebaliknya, IL-22 mempunyai efek perlindungan pada sel epitel. Selain itu, IL-22 meningkatkan proliferasi sel-sel epitel bronkial dan dengan demikian berkontribusi terhadap regenerasi jaringan epitel. *Interleukin-22* juga melindungi terhadap pengembangan hepatitis dan penyakit infeksi usus. Meskipun IL-22 berfungsi protektif, IL-22 juga dapat meningkatkan kapasitas pro-inflamatori dari TNF- α pada keratinosit (Nawrocka *et al.*, 2011).

Interleukin-17 merupakan sitokin pro inflamasi yang terlibat dalam patogenesis beberapa penyakit yaitu *rheumatoid arthritis* (RA), *multiple sclerosis* (MS), dan *inflammatory bowel disease* (IBD). Hewan coba model arthritis menunjukkan bahwa inaktivasi IL-17 dan IL-17F dapat memperparah penyakit. Studi lain menggunakan hewan coba model MS menunjukan bahwa defisiensi IL-17 dan IL-17 F tidak berpengaruh terhadap perjalanan penyakit. Pasien dengan penyakit crohn dan kolitis ulseratif menunjukan ekspresi mRNA IL-17 di mukosa usus. Selain itu IL-17 terdeteksi dalam serum selama eksaserbasi (Nawrocka *et al.*, 2011).



Gambar 7.4. Peran IL-17 pada infeksi bakteri. (A) Lipopolysaccharide bakteri akan menstimulasi antigen presenting cells (APC) untuk memproduksi IL-23 yang kemudian menstimulasi sel T CD4+ dan CD8+ untuk melepaskan IL-17. IL-17 akan berperan pada makrofag dan struktur sel. (B) Sebagai respon terhadap IL-17, sel menghasilkan CXC, G-CSF, GM-CFF. Pada makrofag IL-17 menstimulasi sekresi TNF α . TNF- α bersama dengan IL-17 akan mempengaruhi struktur sel. Akumulasi neutrofil akan menstimulasi produksi IL-15. *Interleukin-15* akan menstimulasi sel T untuk mensekresi IL-17 (Nawrocka *et al.*, 2011).

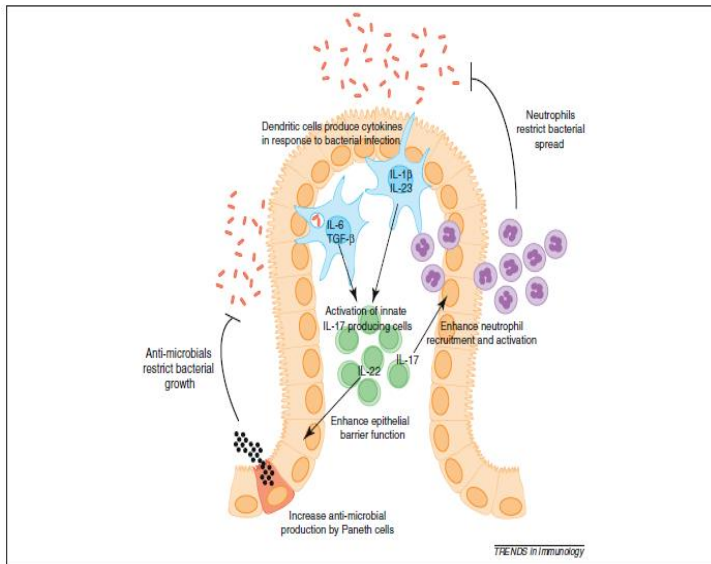
Interleukin-22 merupakan keluarga sitokin IL-10 yang disekresikan oleh sel Th-17 sehingga diklasifikasikan sebagai sitokin Th17. Telah banyak dilaporkan tentang peran IL-22 dalam berbagai penyakit infeksi. Ekspresi IL-22 yang diamati pada penyakit infeksi usus yaitu penyakit crohn, konsentrasi IL-22 dalam serum berkorelasi dengan aktivasi penyakit. *Interleukin-22* meningkatkan sekresi sitokin pro inflamasi, proliferasi, dan migrasi dari sel usus (Nawrocka *et al.*, 2011).

7.3.3. Peran Sitokin Th17 (IL-17 dan IL-22) pada infeksi mukosa usus

Peran IL-17 dan IL-22 selama infeksi mukosa telah banyak diteliti. Sebelumnya respon Th17 dianggap hanya berperan untuk perlindungan terhadap infeksi bakteri ekstraseluler dan jamur, namun saat ini beberapa studi telah menunjukkan bahwa respon IL-17 juga dapat berperan untuk perlindungan terhadap infeksi bakteri intraseluler seperti *Salmonella typhimurium*. Pada mencit yang diberi perlakuan menggunakan streptomycin pada colitis *Salmonella Typhimurium*, IL-6, IL-1 β , IL-17A dan IL-22, semuanya diinduksi di sekum pada 24 jam pasca infeksi. Sedangkan IL-23 diinduksi pada 48 jam pasca infeksi (Godinez *et al.*, 2009 dalam Rubino *et al.*, 2012).

Mencit defisiensi reseptor IL-17A yang terinfeksi *Salmonella Typhimurium* juga menunjukkan terjadinya penurunan jumlah sitokin inflamatori, penurunan rekrutmen neutrofil dan peningkatan penyebaran bakteri ke spleen dan kelenjar getah bening (Raffatellu *et al.*, 2008 dalam Rubino *et al.*, 2012). *Interleukin-23* tampaknya penting pada awal ekspresi IL-17A dan IL-22 di jaringan cecal karena pada mencit defisiensi IL-23 menunjukkan penurunan kadar sitokin yang signifikan setelah terpapar *Salmonella typhimurium*, hal ini menyebabkan penurunan rekrutmen neutrofil (Rubino *et al.*, 2012).

Penurunan respon sel Th17 di lamina propria juga terjadi pada mencit defisiensi IL-6 setelah infeksi *Salmonella Typhimurium* (Geddes *et al.*, 2011). Rubino *et al.* (2012) menjelaskan bahwa IL-23 dan IL-6 yang diinduksi oleh bakteri patogen akan menginduksi IL-17A dan IL-22. Ekspresi ini merupakan respon imun bawaan pada perjalanan infeksi. Mekanisme respon imun bawaan tersebut menyebabkan aktivasi neutrofil dan sekresi protein antimikroba di sel epitel. Gambar berikut ini menjelaskan tentang peran IL-17 dan IL-22 sebagai pertahanan di mukosa usus terhadap bakteri patogen.

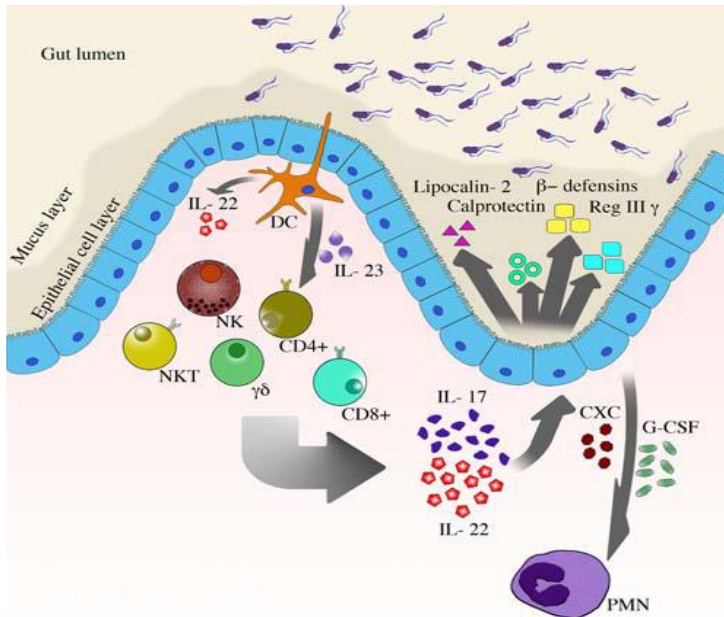


Gambar 7.5. Peran respon imun bawaan IL-17 dan IL-22 terhadap infeksi bakteri enterik. Bakteri ekstraseluler seperti *C.rodentium* dan bakteri intraseluler seperti *S.Typhimurium* yang terdeteksi melalui mekanisme langsung atau tidak langsung oleh DC yang menghasilkan sitokin TGF β , IL-6, IL-23 dan IL-1 β yang akan menginduksi limfosit untuk memproduksi IL-17 dan IL-22. *Interleukin-22* di sel epitel (seperti sel Paneth) berfungsi sebagai pertahanan dengan memproduksi protein antimikroba yang akan mengontrol atau mengendalikan pertumbuhan bakteri, sedangkan IL-17 akan meningkatkan rekrutmen dan aktivasi neutrofil sehingga dapat mencegah penyebaran bakteri (Rubino *et al.*, 2012).

Infeksi kolon dengan *Citrobacter rodentium*, IL-17A, IL-17F dan IL-22 berperan dalam mengendalikan tingkat keparahan usus (Takatori *et al.*, 2009 dalam Blaschitz & Raffatellu, 2010). Percobaan menggunakan kera, penurunan sel Th17 menyebabkan penurunan pertahanan mukosa dan peningkatan penyebaran *Salmonella typhimurium* ke kelenjar getah bening. Penelitian lain menjelaskan bahwa peningkatan IL-17 dan IL-22 merupakan respon terhadap infeksi patogen di mukosa (Blaschitz & Raffatellu, 2010).

Selanjutnya Blaschitz & Raffatellu (2010) menjelaskan bahwa respon imun lokal berperan dalam mencegah infeksi oleh bakteri patogen dan mencegah penyebaran patogen secara sistemik. Beberapa subset sel T dalam usus (sel Th 17, sel T $\gamma\delta$, NK cell, NK cell T) berkontribusi pada respon imun mukosa terhadap patogen dengan mengeluarkan subset sitokin IL 17A, IL 17F, IL 22

dan IL 26. Sitokin menginduksi sekresi kemokin & protein antimikroba. Protein antimikroba tersebut merupakan bentuk pertahanan mukosa gastrointestinal terhadap patogen.



Gambar 7.6. Peran sitokin Th 17 pada mukosa usus. Sel dendritik diaktifkan oleh patogen dan mensekresikan beberapa sitokin proinflamasi yaitu IL 22 dan IL 23, yang kemudian menstimulasi beberapa subset sel T (sel Th 17, sel T $\gamma\delta$, sel NK dan sel NK-T) untuk mensekresikan IL 17 dan IL 22. IL 17 dan IL 22 akan menstimulasi epithelium usus untuk mensekresikan CXC (*Chemokines Neutrophil Chemoattractants*) dan *antimicrobial peptides* (*lipocalin-2, calprotectin, Reg III γ* dan *β defensins*) (Blaschitz & Raffatellu, 2010).

Reseptor IL-17A dan IL-17F (IL-17Ra dan IL-17Rc) diekspresikan di beberapa tipe sel, sedangkan reseptor untuk IL-22 dan IL-26 diekspresikan oleh sel-sel epitel. Sedikit yang diketahui tentang peran IL-26 karena sitokin ini tidak ada dalam genom tikus. Pada studi invitro dengan sel epitel usus, IL-17, IL-22, IL-26 menginduksi perubahan ekspresi gen termasuk peningkatan kemokin (cxcl-8, ccl20) dan respon protein antimikroba (Inos, lipocalin-2) (Blaschitz & Raffatellu, 2010).

Interleukin 17 dan IL-22 menstimulasi granulopoiesis dengan menginduksi ekspresi *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) dan *Chemokine expression* (CXC), yang berperan terhadap

akumulasi neutrofil dan merupakan respon mukosa terhadap infeksi (Blaschitz & Raffatellu, 2010).

Sitokin Th17 berkontribusi sebagai pertahanan mukosa melalui beberapa mekanisme, pada saat aktivasi menghasilkan respon imun mukosa untuk melawan patogen. Respon mukosa pada pasien dengan diare infeksi ditandai dengan banyaknya neutrofil yang menginfiltrasi mukosa usus. Bukti klinis menunjukkan bahwa neutrofil dapat melokalisasi infeksi dan mencegah penyebaran sistemik (Blaschitz & Raffatellu, 2010).

Percobaan menggunakan mencit diare infeksi menunjukkan bahwa defisiensi Th17 menyebabkan penurunan rekrutmen neutrofil di mukosa pada infeksi dengan *Salmonella typhimurium*. Gangguan rekrutmen neutrofil tersebut dapat menjelaskan mengapa terjadi peningkatan penyebaran *Salmonella typhimurium* pada kondisi tidak adanya sinyal IL-17 (Raffatellu *et al.*, 2008).

Salah satu respon mukosa pada infeksi colon yang di induksi oleh *Citrobacter Rodentium* adalah sekresi antimikroba tipe C lektin, family Reg III termasuk Reg 3 γ dan Reg 3 β . Induksi Reg 3 γ tergantung pada IL-22 dan penting untuk mengendalikan infeksi usus akibat *Citrobacter Rodentium* (Blaschitz & Raffatellu, 2010).

Model *Citrobacter Rodentium* telah banyak digunakan untuk mengetahui respon imun di mukosa usus terhadap bakteri patogen. *Citrobacter Rodentium* dapat menginduksi IL-17 dalam sekum dan usus besar pada awal terjadinya infeksi (4-7 hari pasca infeksi) dan di ikuti dengan respon adaptif yang kuat. Sebuah studi menggunakan mencit defisiensi IL-17A dan IL-17F menunjukkan bahwa keduanya IL-17A dan IL-17F diperlukan untuk menghambat kolonisasi *Citrobacter Rodentium* dan mencegah kerusakan mukosa usus (Rubino *et al.*, 2012).

Eksresi IL-22 di cecum dan colon juga di induksi pada awal terinfeksi *Citrobacter rodentium* (pada hari ke 4 pasca infeksi). Pada mencit defisiensi IL-22 terjadi perkembangan penyakit setelah 10 hari pasca infeksi. Sekresi IL-22 tergantung pada RegIII γ sangat penting sebagai perlindungan terhadap *Citrobacter Rodentium* karena pemberian RegIII γ dari luar tubuh dapat menyelamatkan mencit defisiensi IL-22 dari mortalitas dan morbiditas. Selain itu mencit defisiensi IL-6 dan IL-23, dua sitokin inflamatori yang menginduksi IL-17A dan IL-22 juga gagal mengontrol infeksi *C. Rodentium* dan meningkatkan angka kematian (Rubino *et al.*, 2012).

Telah dilaporkan juga bahwa kadar IL-17C di epitel usus

diinduksi secara maksimal pada 4 hari pasca infeksi *Citrobacter Rodentium*. Sinyal IL-17 melalui reseptor IL-17 sangat penting untuk mencegah penyebaran sistemik patogen dan mencegah kematian (Rubino *et al.*, 2012)

β defensin juga diinduksi di usus oleh IL-17A dan IL-17F selama infeksi *Citrobacter Rodentium*. Defensin merupakan protein yang bersifat antimikrobal (*natural antimicrobial protein*), merupakan peptida kationik kecil dengan aktivitas anti-bakteri luas. Terdapat 2 kelas, α dan β , berperan dalam pertahanan tubuh antara lain dengan cara mematahkan struktur atau fungsi membran sitoplasma mikroba. Defensin diinduksi oleh sitokin dalam respon terhadap infeksi atau inflamasi, yaitu *interleukin-1 β* , *interferon- γ* , dan TNF- α . β -defensin memiliki aktivitas antimikroba yang luas terhadap sejumlah mikroorganisme, termasuk bakteri gram-positif dan gram-negatif, jamur, dan virus (Blaschitz & Raffatellu, 2010).

Dalam kondisi normal, zat besi sebagian besar terikat serum transferin. Pada peradangan usus, lactoferin disekresikan oleh neutrofil yang berfungsi sebagai pengikat zat besi lain. Bakteri melakukan perlawanan terhadap mekanisme pertahanan inang dengan cara mensekresi chelator besi yang dikenal sebagai *siderophores*. *Siderophores* yang diproduksi oleh sebagian besar anggota *Enterobacteriae* adalah target protein antimikroba lipocalin-2. Lipocalin-2 berikatan dengan zat besi dan mencegah masuknya bakteri sehingga menghambat pertumbuhan bakteri tersebut. Baik *invitro* maupun *invivo*, ekspresi dan sekresi lipocalin-2 tergantung pada stimulasi sel-sel epitel oleh IL-17 dan IL-22. Ekspresi lipocalin-2 meningkat pada permukaan mukosa usus selama terjadi infeksi mukosa (Blaschitz & Raffatellu, 2010).

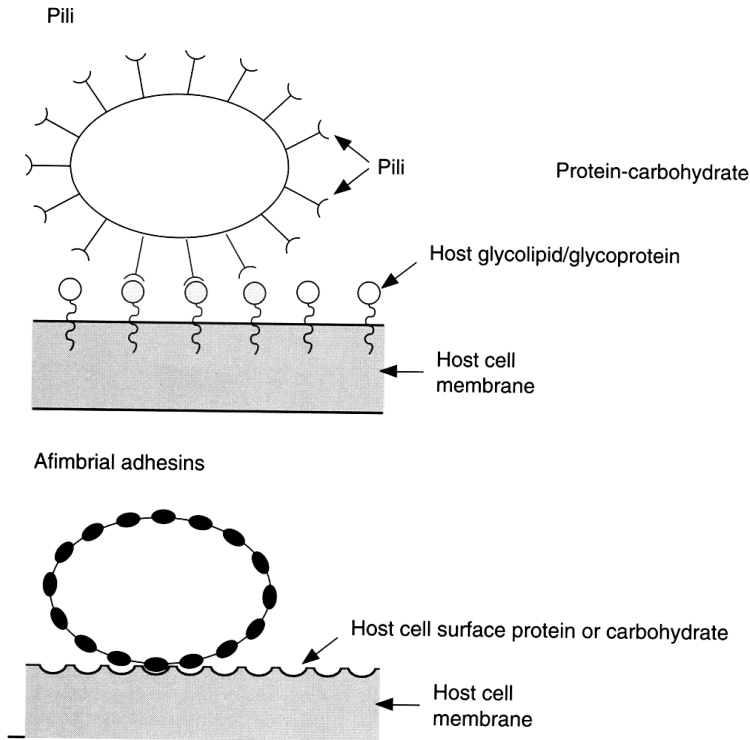
BAB VIII

EFEK PROTEKTIF PROTEIN ADHESI SUBUNIT PILI *Shigella flexneri* 49,8 kDa DALAM MENGINDUKSI PROTEIN ANTIMIKROBA DAN ANTIBODI MUKOSA USUS

8.1. Protein Adhesin Bakteri

Infeksi bakteri diawali dengan proses interaksi antara molekul adhesi di permukaan sel bakteri yang dikenal dengan adhesin dengan reseptor spesifik pada permukaan sel inang. Adhesi bakteri pada reseptor sel inang menyebabkan perubahan *extracellular matrix* (ECM) dan menstimulasi pelepasan sitokin imunoregulator pada tempat infeksi bakteri (Coutte *et al.*, 2003, Cerda & Cossart, 2006). Patogenesis *Shigella* juga diawali dengan langkah inisiasi yaitu perlekatan *Shigella* ke sel enterosit, langkah ini merupakan langkah utama dalam proses terjadinya infeksi. Penghambatan pada proses adhesi dapat mencegah terjadinya patogenesis infeksi bakteri (Schroeder & Hilbi, 2008). Oleh karena itu keberadaan protein adhesin menjadi salah satu faktor virulensi bakteri patogen yang berperan penting terhadap timbulnya infeksi.

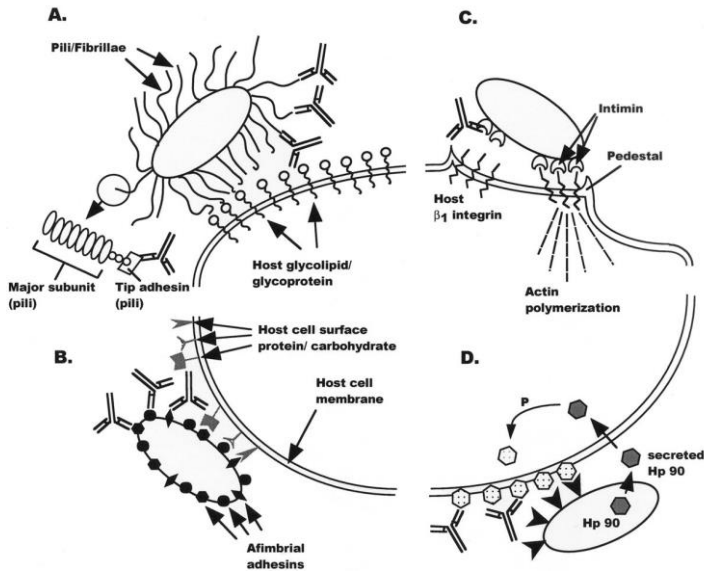
Bakteri memproduksi beberapa tipe faktor adhesi untuk memediasi perlekatan pada sel inang. Secara morfologi ada dua struktur bakteri yang berperan dalam proses adhesi yaitu pili (*fimbriae*) yang merupakan struktur protein berbentuk panjang ke luar dari permukaan sel bakteri dan *afimbriae adhesin* yang merupakan protein dari permukaan sel bakteri. Kebanyakan bakteri patogen menggunakan dua tahap proses perlekatan yaitu pertama menggunakan pili dalam bentuk ikatan longgar disebut dengan *docking*, kemudian diikuti dengan ikatan yang lebih kuat menggunakan protein permukaan sel atau OMP (*outer membrane protein*) disebut *anchoring* (Salyer & Whitt, 2002). Gambar dibawah ini merupakan dua strategi bakteri dalam melekatkan diri pada sel inang.



Gambar 8.1. Dua model mekanisme perlekatan bakteri (Salyers & Whitt, 2002).

Pili merupakan salah satu faktor perlekatan yang diekspresikan oleh kebanyakan bakteri gram-negatif. Pili adalah struktur filamer pada permukaan sel bakteri yang terdiri atas sebagian besar subunit pengulangan protein tunggal. Pili mengikat satu adhesin yang fungsinya berikatan dengan reseptor seluler pada sel inang (Straks *et al.*, 2006). Sebagian besar bakteri yang tergolong famili *Enterobacteriaceae* pada bagian tubuhnya terdapat pili. Pili yang dimiliki famili *Enterobacteriaceae* terdiri dari 2 golongan yaitu yang pertama sebagai *adhesive organelles* dan yang kedua merupakan *sex pili* yang mempunyai peranan pada transfer material DNA selama proses konjugasi dan sebagai reseptor untuk *male-specific bacteriophages*. Pili golongan 1 disandi oleh DNA kromosom. Molekul adhesi di dalam *extracellular matrix* (ECM) diantaranya adalah kolagen, fibronektin serta matrik protein atau reseptor adhesi seperti integrin. Adhesi pada sel inang mampu berinteraksi secara langsung dengan reseptor melalui adhesin permukaan, sehingga bakteri patogen terfasilitasi masuk dalam jaringan (Pascale *et al.*, 2000).

Kolonisasi bakteri dimulai dengan perlekatan bakteri pada reseptor yang diekspresikan oleh sel permukaan mukosa. Perlekatan diperantarai oleh protein permukaan yang dikenal sebagai adhesin, lektin bakterial merupakan jenis adhesin yang paling lazim pada bakteri gram negatif dan gram positif (Wizemann *et al.*, 1999). Gambar berikut ini menunjukkan 4 mekanisme perlekatan bakteri pada reseptor yang diekspresikan oleh sel yang membentuk lapisan mukosa.



Gambar 8.2. Empat mekanisme perlekatan bakteri. A. Pili atau *fimbriae* pada permukaan bakteri, B. proses interaksi bakteri dengan sel epitel yang diperantarai oleh protein adhesin *afimbrial*, C. Bakteri memulai hubungan dengan sel eukariotik dengan protein intimin, D. mekanisme dimana bakteri mensekresi protein reseptornya sendiri, yang diinternalisasi oleh sel inang (Wizemann *et al.*, 1999)

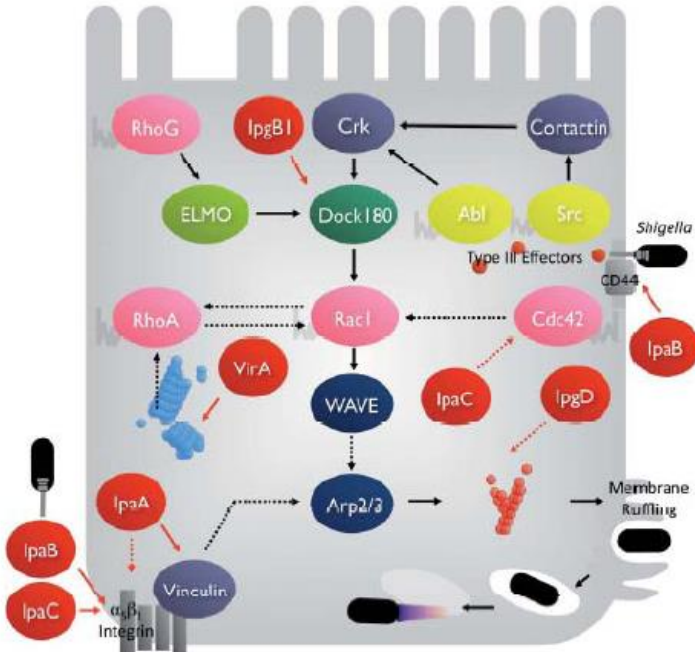
Pili yang dimiliki oleh sebagian besar kelompok bakteri *Enterobacteriaceae* termasuk *Shigella* adalah *Fimbriae type-1*. Beberapa molekul dengan berat berkisar 45-110 kDa diketahui sebagai reseptor *fimbriae type-1* pada sel yang berbeda. Protein *fimH* merupakan elemen pengenalan terhadap reseptor *fimbriae type-1*. Studi pada *Salmonella Typhimurium* menunjukkan bahwa adhesin *fimH* bertanggungjawab terhadap *binding* pada sel hela (Hep-2) dan pada sel epitel intestinal tikus (Nymu, 2008). Faktor adhesin pada *Shigella* adalah kompleks IpaB/C dan IpaB (Reis &

Horn, 2010). Berikut ini adalah tabel tentang struktur adhesin bakteri dan reseptornya.

Tabel 8.1. Struktur adhesin bakteri dan reseptornya

Pathogen	Adhesin	Receptor	Effect on host cell
EPEC	BFP EspA Intimin	Not fully elucidated Not fully elucidated Tir	Activation of T3SS and formation of A/E lesion and change of epithelial cell morphology
Salmonella sp.	Fim A Fim H	Mannosylated proteins in epithelial cells	Activation of T3SS and transport of effector proteins necessary for invasion and/or invasion
<i>Shigella sp.</i>	Complex IpaB/C IpaB	Integrin a5b1 CD44 (natural receptor of hyaluronic acid)	Activation of T3SS and transport of effector proteins necessary for invasion and/or invasion
<i>Yersenia sp.</i>	Invasin YadA	b1 integrin (natural receptor of fibronectin)	Activation of T3SS and transport of effector proteins necessary for invasion and/or apoptosis

Protein yang berperan pada proses adhesi bakteri *Shigella* sama dengan protein yang menginisiasi proses invasi. Protein IpaB berikatan dengan reseptor *hyaluronic acid*, CD44, sedangkan kompleks IpaB dengan IpaC berikatan dengan reseptor *fibronectin* dan integrin a5b1 (Reis & Horn, 2010). Sasakawa (2010) menambahkan selain IpaB dan IpaC, IpaD juga diperlukan untuk pembentukan struktur adhesi yaitu menentukan titik fokus kontak pada membran sel bakteri. Adhesi *shigella* pada sel target selanjutnya akan mengaktifkan *Type 3 secretory system* (T3SS) dan melepaskan efektor di sekitar permukaan bakteri kemudian masuk ke dalam sel inang.



Gambar 8.3. Mekanisme Invasi Shigella. Efektor IpaB berinteraksi dengan CD44 dan β 1-integrin, sedangkan efektor IpaC berinteraksi dengan β 1-integrin. Efektor bakteri berinteraksi dengan target molekul inang dan menginduksi beberapa sinyal transduksi yang mampu mengaktifkan rac1-wave-arp2/3, menginduksi polimerisasi aktin serta membentuk tonjolan membran ruffles (Sasakawa 2010).

Dari gambar di atas terlihat bahwa dua protein penting dalam proses adhesi Shigella adalah efektor IpaB dan IpaC (Sasakawa, 2010). Protein adhesi adalah protein hemaglutinin yang memainkan peran penting dalam inisiasi, perkembangan gejala klinis serta komplikasi pada shigellosis. Karakterisasi molekul adhesi diketahui melalui adanya kemampuan menggumpalkan sel darah merah mamalia yang dimiliki oleh protein adhesin tersebut. Terdapat kemiripan struktur biologi antara permukaan sel darah merah dengan sel epitel reseptor. Protein hemaglutinin yang mempunyai kemampuan menggumpalkan sel darah merah terletak pada pili bakteri (Rosen *et al.*, 2008).

Protein hemaglutinin merupakan protein adhesi yang berperan sebagai faktor virulensi yang berpengaruh pada proses adhesi bakteri pada sel epitel usus halus (Sumarno, 2000). Pernyataan ini didukung oleh Ogra *et al* (2001) yang menyatakan

bahwa *fimbria adhesin* cukup potensial sebagai kandidat perantara perlekatan bakteri pada permukaan usus. Oleh karena itu protein yang memiliki sifat adhesif seperti pili sangat efektif menginduksi respon imun mukosal dan respon antibodi serum jika diberikan peroral.

Berat molekul protein adhesin bervariasi antara bakteri yang satu dengan yang lain, misalnya pada *E.coli* memiliki protein dengan BM 31 kDa yang merupakan protein adhesin pada *Klebsiella pneumoniae* (Di Martino, 1995). Pada pili bakteri *V. cholerae* ditemukan protein adhesi dengan BM 37,8 kDa (Sumarno, 2000). Prabowo (2011) menemukan bahwa protein hemagglutinin yang dianggap sebagai protein adhesi pada *Shigella dysenteriae* terdapat pada BM 49,8 kDa. Anam (2012), mengkonfirmasi bahwa pada pili *Shigella flexneri* juga mengandung protein hemagglutinin dengan BM 49.8 kDa, protein tersebut merupakan protein adhesin.

Pemberian protein adhesi sub unit pili *Shigella flexneri* 49,8 kDa peroral diharapkan mampu menginduksi AMPs dan antibodi di mukosa usus. *Antimicrobial peptides* terutama cathelicidin dan defensin serta antibodi mukosa yaitu s-IgA berperan pada pembersihan bakteri patogen dari lumen usus sehingga dapat mencegah patogenesis infeksi *Shigella*.

8.2. Modulasi dan Protektivitas AMPs di Mukosa Usus

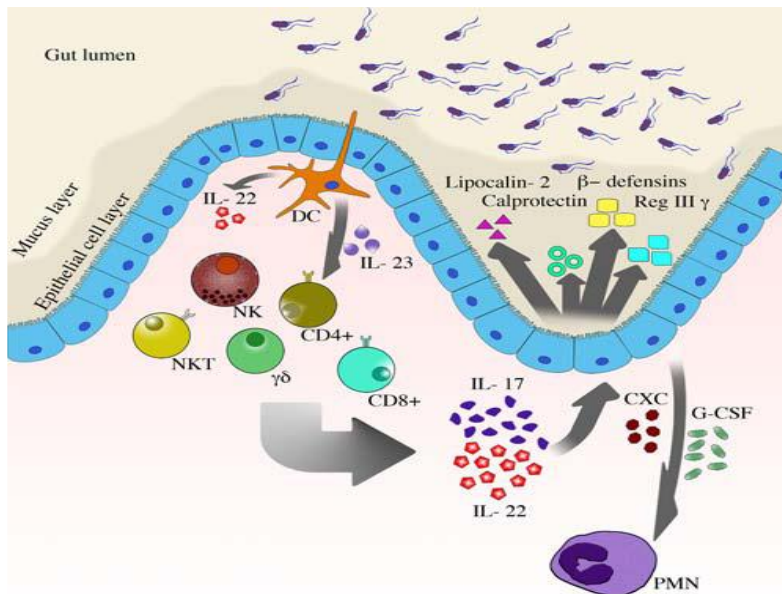
Respon imun lokal berperan dalam mencegah infeksi bakteri patogen dan mencegah penyebaran patogen secara sistemik. Beberapa subset sel T dalam usus (sel Th 17, sel T γ δ , NK cell, NK cell T) berkontribusi pada respon imun mukosa terhadap patogen dengan mengeluarkan sitokin IL 17A, IL 17F, IL 22 dan IL 26. Sitokin tersebut dapat menginduksi sekresi kemokin & protein antimikroba. Protein antimikroba tersebut merupakan bentuk pertahanan mukosa gastrointestinal terhadap patogen (Blaschitz & Raffatelli, 2010).

Pertahanan yang efektif terhadap mikroba pada saluran pencernaan bergantung pada kemampuan sistem imun mukosa dalam mengeliminasi pathogen. Pada umumnya, proses pengenalan bakteri terjadi melalui *Toll Like receptor* (TLR) dan *Pattern recognition Molecules* (PRM) sel inang dengan *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMP) (Fritz *et al.*, 2006). Setelah fase pengenalan antigen, respon antimikroba dihasilkan dengan cara merekrut sel imun dan sintesis protein antimikroba oleh mukosa yang terluka. *Antimicrobial peptides* seperti defensin, cathelicidin, lisozim, fosfolipase, dan protease menghasilkan

aktifitas antimikroba kuat terhadap berbagai pathogen (Zasloff, 2002).

Infeksi *Shigella* dapat menginduksi sel Th17 untuk mensekresikan IL-17 dan IL-22 yang akan berperan dalam meningkatkan pertahanan inang terhadap bakteri dan jamur dengan memediasi ekspresi sitokin/ kemokin yang akan memicu migrasi PMN selama fase infeksi akut (Curtis & Way, 2009). Selain itu IL-17 dan IL-22 yang dihasilkan oleh sel Th17 dapat menginduksi produksi protein antimikroba oleh sel epitel usus (Sellge *et al.*, 2009).

Sitokin Th17 berkontribusi sebagai pertahanan mukosa melalui beberapa mekanisme, pada saat aktivasi menghasilkan respon imun mukosa untuk melawan patogen. Sel dendritik diaktifkan oleh patogen dan mensekresikan beberapa sitokin proinflamasi yaitu IL 22 dan IL 23, yang kemudian menstimulasi bebrapa subset sel T (sel Th 17, sel $T\gamma\delta$, sel NK dan sel NK-T) untuk mensekresikan IL 17 dan IL 22. *Interleukin-17* dan IL 22 akan menstimulasi epitelium usus untuk mensekresikan CXC (*Chemokines Neutrophil Chemoattractants*) dan *antimicrobial peptides* (*lipocalin-2*, *calprotectin*, *Reg III γ* dan β defensins) (Blaschitz & Raffatelu, 2010).



Gambar 8.4. Modulasi *Antimicrobial peptides* di mukosa usus.

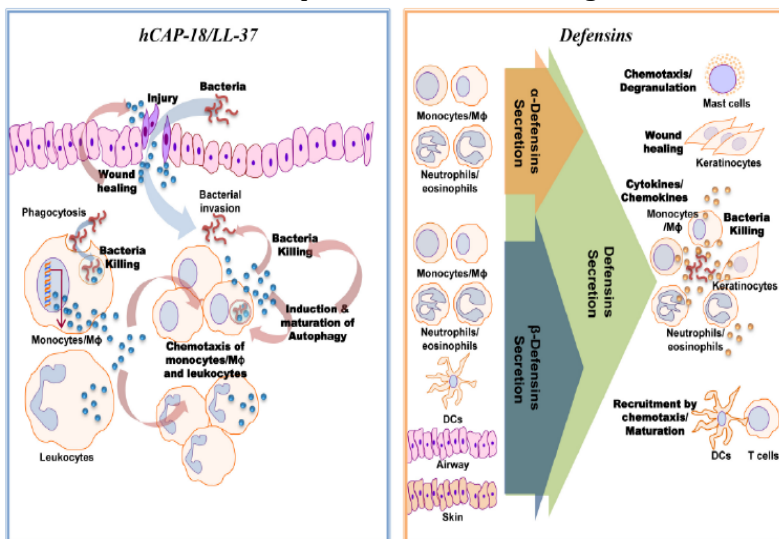
Sel dendritik diaktifkan oleh patogen dan mensekresikan beberapa sitokin proinflamasi yaitu IL 22 dan IL 23, yang kemudian menstimulasi beberapa subset sel T (sel Th 17, sel $T\gamma\delta$, sel NK dan sel NK-T) untuk mensekresikan IL 17 dan IL 22. IL 17 dan IL 22 akan menstimulasi epitelium usus untuk mensekresikan CXC (*Chemokines Neutrophil Chemoattractants*) dan *antimicrobial peptides* (*lipocalin-2, calprotectin, Reg III γ dan β defensins*) (Blaschitz & Raffatelu, 2010).

Antimicrobial peptides (AMPs) adalah antibodi alami dari respon imun bawaan terhadap berbagai organisme patogen. Protein ini penting sebagai sinyal regulasi sistem imun bawaan dan sistem imun adaptif serta *direct killing* terhadap patogen (Shin & Kyeong Jo, 2011). Pada infeksi shigella, bakteri mampu merubah alur inflamasi yang terjadi dengan kemampuannya menghindari fagositosis makrofag (Jennison & Verma., 2004). Makrofag yang mengalami apoptosis tidak mensekresikan IL-23 yang merupakan rangsangan kuat bagi Th naif untuk berdiferensiasi menjadi Th17. Th17 adalah subset sel T helper yang mampu menginduksi sel epitel usus untuk memproduksi protein antimikroba. Makrofag yang mengalami apoptosis kemudian mensekresikan IL-1B. Epitel yang mengalami nekrosis akibat invasi Shigella mensekresikan IL-8. *Interleukin-1B* bersama dengan IL-8 tersebut memicu inflamasi dan rekrutmen netrofil secara besar-besaran menuju tempat terjadinya infeksi. Berlebihnya rekrutmen netrofil tersebut semakin memperparah kerusakan jaringan dan invasi Shigella (Jennison & Verma, 2004). Selain kerusakan jaringan yang terjadi, tidak disekresikannya IL-23 oleh makrofag menyebabkan berkurangnya rangsangan terhadap aktivasi dan diferensiasi T helper naif menjadi Th17. Keadaan tersebut membuat sekresi IL-17 dan IL-22 juga menurun. *Interleukin-17* dan IL-22 merupakan perangsang kuat bagi sel epitel dan sel imun lainnya untuk mensekresi AMPs (Sperandio, 2008).

Beberapa sitokin yang dapat menginduksi diferensiasi limfosit Th17 adalah TGF- β dan IL-6. *Transforming growth factor- β* selama ini dianggap sebagai sitokin anti inflamasi, yang berperan sebagai penekan dalam proses autoimun dengan menginduksi faktor transkripsi untuk sel Treg, Fox-P3. Sitokin IL-6 merupakan pro inflamasi yang menghambat aktivitas Fox-P3, dengan demikian memainkan peran penting dalam menjaga keseimbangan antara sel Th17 dan sel Treg. Selain itu IL-6 juga meningkatkan ekspresi

IL-23R dalam limfosit Th0, membuat mereka lebih sensitif terhadap IL-23. Limfosit Th17 dalam merespon sitokin tertentu (TGF- β , IL-6, IL-21, IL-23 dan IL-1 β) mensekresi IL-17, IL-21 dan IL-22 (Nawrocka *et al.*, 2011). *Interleukin-17* bersama sinyal IL-22 melalui reseptor IL-22, menginduksi mekanisme imun bawaan dan menstimulasi sekresi AMPs seperti protein Reg, lipocalin-2 dan defensin (Sonnenberg *et al.*, 2011).

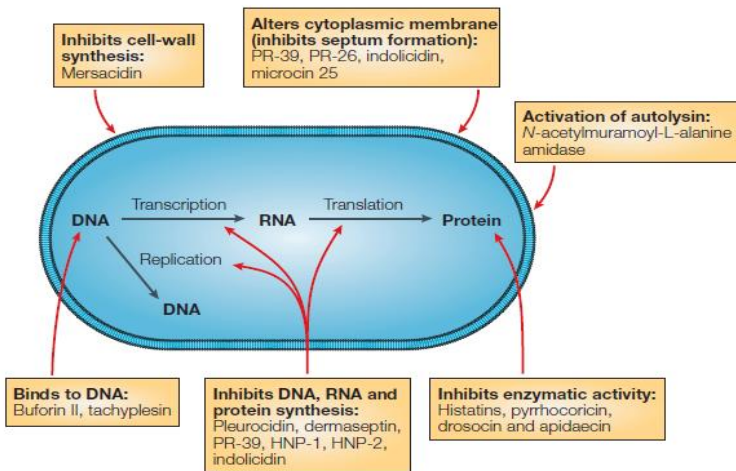
Defensin dan cathelicidin merupakan famili AMPs pada kebanyakan mamalia (Agerbert *et al.*, 2012). Defensin dan cathelicidin berperan penting pada proses biologis karena aktivitasnya sebagai antimikroba dan immunomodulator (Shin & Kyeong Jo, 2011). Berikut adalah gambar mengenai peran AMPs cathelicidin dan defensin pada sistem imun inang.



Gambar 8.5. Peran AMPs Cathelicidin dan defensin pada sistem imun inang. Gambar sebelah kiri menunjukkan efek biologis cathelicidin (hCAP-18/LL-37) pada sistem imun. hCAP-18/LL-37 disintesis dan disekresikan oleh sel epitel sebagai respon terhadap infeksi bakteri atau injuri fisik. Gambar sebelah kanan menunjukkan fungsi imunologi defensin pada berbagai sel imun. Defensin di induksi oleh stimulus fisiologis yaitu TLR atau infeksi α -defensin disintesis dan disekresikan oleh monosit/ makrofag dan neutrofil/ eosinofil, sedangkan β -defensin disintesis dan disekresikan juga oleh DCs, epitel sel saluran pernafasan dan kulit (Shin & Kyeong Jo, 2011).

Cathelicidin berperan dalam rekrutmen neutrofil dan

sirkulasi sel lain yaitu monosit/ makrofag ke tempat terjadinya infeksi oleh kemotaksis melalui sekresi beberapa sitokin/ kemokin. Sekresi cathelicidin dari keratonosit menyebabkan induksi *wound healing*. Cathelicidin juga berperan *direct killing* dan *indirect killing* dengan mengaktifasi autophagi dan menstimulasi maturasi monosit/ makrofag. Defensin mempunyai efek *direct killing* dan *indirect killing* yaitu berinteraksi dengan beberapa sel target dan jaringan untuk memodulasi inflamasi, rekrutmen sel imun dan aktivasi serta maturasi beberapa sel imun (Shin & Kyeong Jo, 2011).



Gambar 8.6. Aktivitas intraseluler *Antimicrobial peptides* (Brogden, 2005).

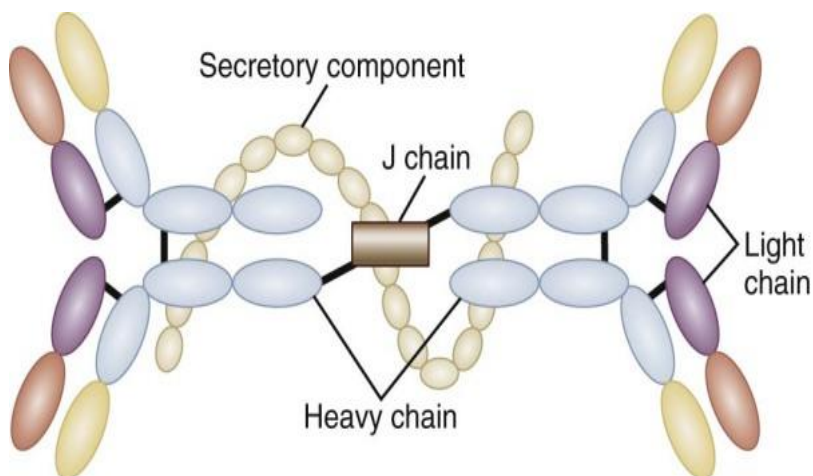
Gambar di atas menunjukkan aktivitas intraseluler AMPs. *Antimicrobial peptides* memberikan efek melalui perubahan permeabilitas membran sel bakteri. Permeabilisasi membran target merupakan langkah krusial pada aktifitas antimikroba dan sitotoksitas yang dimediasi oleh protein antimikroba. Pada bakteri, proses ini terjadi secara bersamaan dengan inhibisi sintesis RNA, DNA, dan protein, sehingga semakin menurunkan viabilitas bakteri (Brogden, 2005). Protein antimikroba juga diketahui memiliki peran dalam menjembatani respon imun innate dan adaptif. Protein antimikroba memiliki aktifitas kemotaktik terhadap sel imun, baik monosit, sel T, sel dendritik, dan dapat memicu produksi sitokin oleh monosit dan sel epithelial. Aktifitas AMPs dimediasi oleh reseptor, yang kemudian menimbulkan aktivasi sinyal downstream (Yang *et al.*, 2004).

8.3. Modulasi dan Protektivitas s-IgA di Mukosa Usus

8.3.1. Struktur s-IgA

Imunoglobulin A merupakan kelas imunoglobulin yang paling banyak diproduksi. Imunoglobulin A dengan berat molekul 165.000 dalton ditemukan di dalam serum dan mukosa (Abbas dan Littchman, 2012). Sebagian besar IgA dihasilkan oleh sel plasma di subepitelium mukosa (Kaetzel, 2007). Imunoglobulin A ditemukan sekitar 80% pada mukosa saluran pencernaan dan sisanya terdapat di sirkulasi darah (Wilson, 2005). Imunoglobulin A adalah antibodi yang disekresi di permukaan mukosa yaitu saluran pencernaan, saluran pernafasan, saluran urogenital dan sekresi eksternal seperti colostrum, air susu ibu (ASI), keringat, air mata dan saliva (Kaetzel, 2007., Abbas dan Littchman, 2012). Peningkatan produksi IgA yang intensif merefleksikan adanya peningkatan kebutuhan pertahanan mukosa (Kaetzel, 2007).

Imunoglobulin A dihasilkan oleh sel limfosit B. Imunoglobulin A serum berasal dari sumsum tulang dalam bentuk monomerik, sedangkan IgA yang disekresi pada permukaan mukosa (disebut *secretory-IgA* atau s-IgA) dalam bentuk polimerik/ dimer. *Secretory-IgA* terdiri dari 2 unit IgA dan 2 polipeptida, *J chain* dan *Secretory Componen* (SC) (Kaetzel, 2007).



Gambar 8.7. Struktur s-IgA. Struktur s-IgA adalah dimerik, dengan dua molekul IgA yang dipersatukan oleh *J chain*. Masing-masing molekul IgA terdiri dari dua *heavy chains* dan dua *light chains*. *Secretory component* membantu melindungi antibodi dari enzim proteolitik (Kaetzel, 2007).

Secretory-IgA merupakan molekul yang stabil oleh karena berbentuk dimer/polimer (*polymeric IgA/ pIgA*) dan diikat oleh *J chain* (Johansen *et al.*, 2000). Transport *pIgA* ke permukaan mukosa berikatan dengan *Polymeric Ig Receptor* (*pIgR*) yang diekspresikan oleh sel epitel pada membran basolateral (Kaetzel, 2005). *Secretory IgA* dilepaskan pada permukaan mukosa berikatan dengan *secretory component* (SC) (Phalipon *et al.*, 2002).

Secretory-IgA memiliki berat molekul 380.000 dalton dan koefisien sedimentasi 11S. Molekul lengkapnya terdiri atas dua sub unit *IgA*, satu *secretory component* (SC) berat molekul 70.000 dalton, dan satu *J chain* berat molekul 15.000 dalton. Berbeda dengan *J chain*, SC tidak disintesa dalam sel plasma melainkan oleh sel epitel. Imunoglobulin A diikat dalam konfigurasi dimer oleh *J chain*, dan disekresikan oleh sel plasma sub mukosa serta secara aktif akan mengikat SC pada waktu melintasi lapisan sel epitel. Ikatan *IgA* dengan SC menyebabkan terjadinya transport *s-IgA* ke dalam sekresi dan juga memproteksi terhadap serangan proteolitik. Komponen sekretorik memudahkan transport *IgA* dalam cairan sekresi dan melindungi molekul *IgA* terhadap enzim proteolitik yang terdapat di dalam cairan tersebut (Abbas dan Littchman, 2012).

Secretory IgA diproduksi dalam jumlah lebih besar daripada isotipe antibodi yang lain, karena luasnya permukaan saluran cerna. Diperkirakan manusia dewasa dengan berat badan 70 kg akan mensekresikan sekitar 2-3 gram *IgA* perhari, ini merupakan 60-70% dari pengeluaran total antibodi. Karena sintesa *s-IgA* terutama terjadi di jaringan limfoid mukosal dan dikeluarkan kedalam lumen, maka isotipe ini hanya menempati kurang dari seperempat antibodi yang ada dalam plasma dan merupakan komponen minor dari imunitas humoral sistemik bila dibandingkan dengan *IgG* dan *IgM* (Kaetzel, 2007).

Berdasarkan penelitian serologis, protein *sequencing* dan biologi molekuler teridentifikasi adanya subklas *IgA* pada beberapa spesies. Pada manusia ada 2 (dua) subklas *IgA* yaitu *IgA1* dan *IgA2*, proporsi *IgA1* dan *IgA2* bervariasi dalam sekresi individual. Sel yang memproduksi *IgA1* terutama didapatkan pada jaringan mukosa dan kelenjar. Sedangkan pada usus besar dan traktus genitalis wanita sel *IgA2* sama atau lebih banyak daripada sel *IgA1*. Perbedaan utama antara *IgA1* dan *IgA2* pada manusia terletak pada *hinge region*, molekul *IgA2* tidak memiliki segmen 13-asam amino seperti *hinge region* *IgA1* (Mestecky *et al.*, 1999). Pada Mamalia lain hanya mempunyai satu isotipe *IgA*, kecuali pada

kelinci mempunyai gene untuk 13 subklas IgA (Spreaker *et al.*, 1993 dalam Kaetzel, 2007).

8.3.2. Sintesis s-IgA pada permukaan mukosa usus

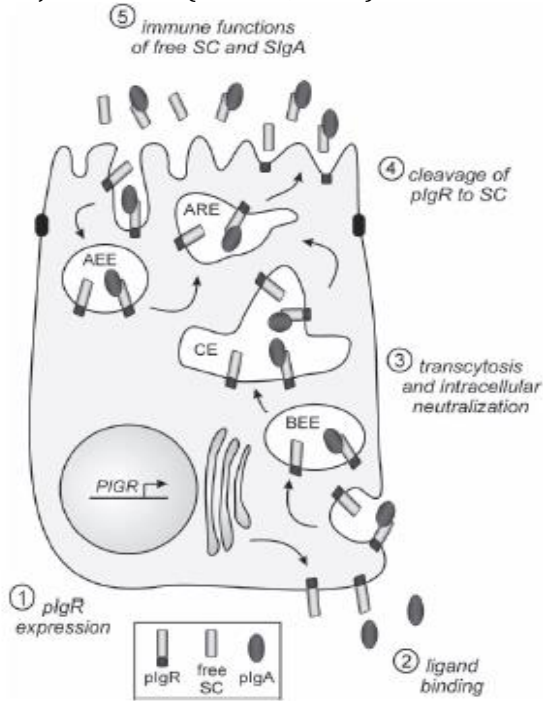
Stimulasi sel B oleh TGF- β dan IL-5 menyebabkan terjadinya *switching* ke isotipe IgA. Immunoglobulin A diproduksi lebih banyak dalam sistem imun mukosal dibandingkan jaringan lain karena *isotipe switching* ke IgA terjadi paling efisien dalam jaringan limfoid mukosal. Th2 yang memproduksi IL-5 lebih banyak dalam mukosa dibandingkan dalam jaringan limfoid lain. Sel B yang memproduksi IgA juga mempunyai kecenderungan untuk homing ke jaringan mukosal (Wilson, 2005., Abbas dan Littchman, 2012).

Sebagian besar sel plasma mukosal menghasilkan dimer dan polimer IgA (secara kolektif disebut pIgA) yang mengandung *disulfide-linked* 15kDa *polipeptide* atau disebut juga *joining* atau rantai J. Rantai J dibutuhkan sebagai aktif eksport pIgA melalui epitel sekretori seperti kriptus usus dan kelenjar antral. Transportasi ini dimediasi oleh pIgR yang awalnya disebut sebagai membran *secretory component* (Brandtzaeg, 2010).

Immunoglobulin A disekresikan sel B ke dalam lamina propria dalam bentuk dimer yang masing-masing diikat oleh rantai J, sedangkan IgA serum adalah monomer dan tidak memiliki rantai J. Selanjutnya IgA akan menuju *poly-Ig receptor* (pIgR) yang kemudian ditransportasikan melintasi epitel. *Poly-Ig receptor* disintesis oleh sel epitel mukosa dan diekspresikan pada permukaan basolateral. Dimerik IgA yang mengandung rantai J berikatan dengan pIgR pada epitel mukosa, kemudian terjadi endositosis dan secara aktif ditransportasikan dalam vesikel ke permukaan luminal. Disini bagian ekstraseluler dari pIgR yang membawa IgA akan mengalami pemecahan secara proteolitik, bagian transmembran dan cytoplasmic domain ditinggal melekat pada sel epitel, sedangkan yang berikatan dengan IgA itulah yang disebut *secretory component* (SC) (Mestecky *et al.*, 1999).

Transport polimeric IgA melintasi sel epitel mukosa dimediasi oleh membran glikoprotein yang disebut pIgR (*polimeric Immunoglobulin receptor*). Immunoglobulin A diproduksi secara lokal oleh *organized-mucosal-associated lymphoid tissues* kemudian ditransport melintasi epitel ke lumen mukosal dan berinteraksi dengan pIgR. Ikatan pIgR dengan kompleks dimeric IgA diinternalisasi dan transcytosis melalui kompartemen vesikular ke membran plasma apikal. Bagian ekstraseluler dari pIgR

membentuk SC.. Komplek dari dimerik IgA dan SC disebut s-IgA. *Secretory component* berfungsi melindungi antibodi dari enzim proteolitik. Karbohidrat dari SC membantu s-IgA sehingga *immune protection* menjadi efektif (Kaetzel, 2007).



Gambar 8.8. Mekanisme pIgR melewati epitel sel. Epitel sel di ilustrasikan dengan bagian permukaan apikal pada bagian atas dan permukaan basolateral pada bagian bawah. Sintesis pIgR terjadi pada bagian permukaan basolateral, dimana terjadi ikatan ligan. Selanjutnya mengikuti reseptor yang memediasi endositosis, ikatan ligan ditransportasikan secara berulang oleh vesicel intrasellular, dimana netralisasi patogen dan antigen terjadi di tempat ini. Pada permukaan apikal, pIgR membelah membentuk SC. Pada permukaan mukosa dan pada sekresi eksternal, *free SC* dan s-IgA berperan pada sistem imun innate dan adaptif (Kaetzel, 2007).

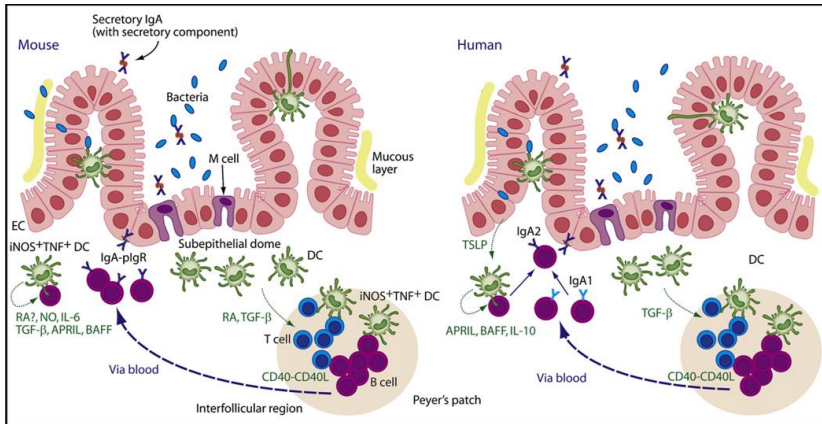
Poly-Ig receptor bertanggung jawab pada sekresi IgA ke permukaan mukosa (Mestecky *et al.*, 1999). Oleh karena itu pIgR mempunyai peran yang sangat penting dalam sistem pertahanan mukosa. Satu molekul pIgR harus disintesis untuk setiap transport satu molekul IgA. Peningkatan ekspresi pIgR berkontribusi dalam peningkatan sekresi s-IgA di mukosa usus. Beberapa sitokin pro-inflamasi berperan dalam regulasi gen transkripsi PIGR (Kaetzel,

2007). Sitokin yang berkaitan penting dengan efek ini adalah $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ dan IL-4 (Brandtzaeg, 2003).

Secretory component merupakan integral dari membran sel epitel bagian lateral dengan BM 90.000 dalton. *Secretory component* yang bebas maupun yang terikat oleh pIgA atau mengalami endositosis sel epitel, dilepaskan melalui permukaan epitel kedalam cairan eksternal. Oleh karena itu dalam cairan eksternal terdapat SC dan s-IgA (pIgA yang terikat oleh SC), kecuali pada orang yang mengalami defisiensi IgA hanya terdapat SC. Baik bentuk pIgA maupun bentuk s-IgA dengan SC merupakan molekul yang tahan terhadap enzim proteolitik (Abbas & Litchman, 2012).

Pada model mencit modulasi respon imun IgA di intestinal dimulai dengan bakteri masuk melalui sel M pada sel epitel dengan mekanisme endositosis kemudian ditangkap oleh DCs yang ada di *subepithelial dome patch Peyer*. *Dendritic Cells* migrasi ke *Interfolikular Region (IFR) Patch Peyer* untuk mempresentasikan antigen ke sel T CD4. Sel T CD4 yang teraktivasi oleh antigen tersebut melepaskan IgA *class switching* oleh stimulasi IgM dan IgD sel B yang diaktivasi oleh CD40L dan $TGF\beta$. Adanya *retinoic acid (RA)* menyebabkan IgA sel B mengekspresikan CCR9 dan $\alpha 4\beta 7$ dan kemudian migrasi ke lamina propria, dimana terjadi diferensiasi dalam sel plasma yang melepas antibodi IgA dimer (pIgA) (Cerruti, 2008). Polimer IgA kemudian berikatan dengan pIgR (disebut juga *membran Secretory Componen/ mSC*), selanjutnya IgA dilepaskan kedalam lumen dalam bentuk s-IgA (Corthesy, 2007).

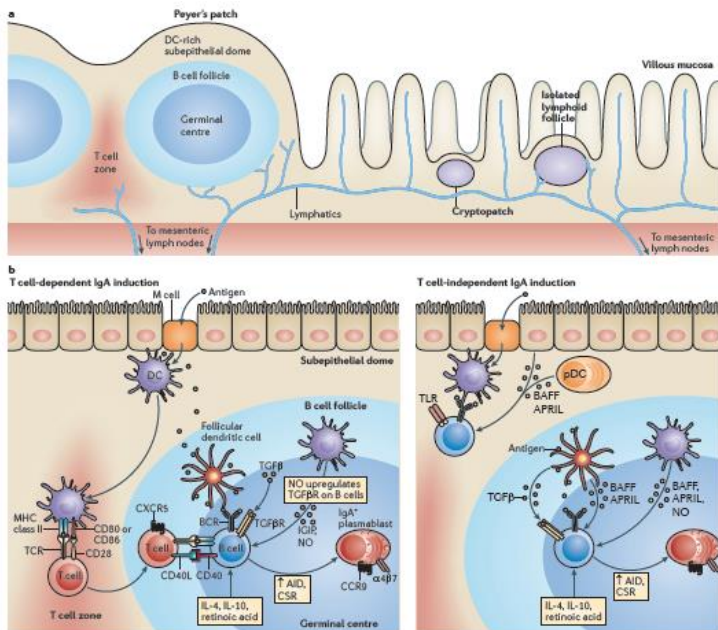
Pada manusia mekanisme modulasi s-IgA tidak jauh dari mekanisme pada model tikus. Setelah CD4 sel T melepaskan IgA1 *class switching* oleh aktivasi IgM, IgD sel B di Patch Peyer melalui CD40L dan $TGF\beta$. IgA1 sel B tersebut kemudian migrasi ke lamina propria melalui mekanisme yang mirip dengan pada tikus. Pada lamina propria, IgA1 sel B switch ke IgA2 akibat respon *a proliferation-inducing ligand (APRIL)* dan IL-10 yang dilepaskan oleh *Toll-like receptors (TLRs)* di sel epitel. DCs juga dapat melepaskan sitokin dalam merespon *thymic stromal lymphopoietin (TSLP)* yang diproduksi oleh sel epitel. Pada lamina propria, IgM, IgD sel dapat langsung switching dari IgM ke IgA1/IgA2 akibat respon dari *B cell-activating factor of the TNF family (BAFF)*, APRIL dan IL-10. IgA2 lebih resisten terhadap protease bakteri daripada IgA1 dan memiliki waktu paruh lebih panjang pada lumen usus distal (Cerruti dan Rescigno, 2008). Mekanisme modulasi IgA pada intestinal dapat dilihat pada gambar 2.9.



Gambar 8.9. Modulasi IgA pada intestinal mencit (kiri) dan manusia (kanan).
(Ceruti & Rescigno, 2008)

Modulasi respon imun IgA pada model mencit dan manusia melalui mekanisme yang sama sampai dengan tahap IgA1 sel B bermigrasi ke lamina propia. Yang berbeda adalah pada tahap berikutnya yaitu pada tikus, IgA1 berdiferensiasi dan melepas pIgA. Sedangkan pada manusia, IgA1 sel B switching ke IgA2. Perbedaan lain dijelaskan oleh Pabst (2012) yaitu dari faktor anatomi *peyer's patches*, bahwa pada manusia *peyer's patches* terkonsentrasi di terminal ileum, sedangkan pada mencit *peyer's patches* terdistribusi sepanjang usus halus.

Immunoglobulin A juga dapat dimodulasi melalui *T-cell dependent pathway* untuk bakteri patogen dan toksin yang menghasilkan IgA *innate* dan *T-cell independent pathway* untuk bakteri komensal. Respon antibodi terhadap berbagai antigen dibedakan antara *T-dependent* dan *T-independent*, berdasarkan dari adanya bantuan dari sel T. Antigen protein akan diproses di APC (*Antigen Presenting Cell*) dan dikenali oleh limfosit T helper (*T dependent*), yang berperan penting dalam aktivasi sel B serta menginduksi pergeseran isotop rantai berat dan *afinity maturation*. Sedangkan antigen non protein lain merangsang produksi antibodi tanpa bantuan sel T, sehingga disebut *T-independent* (Abbas and Litcman, 2004; Brandzaeg, 2007). Pabst (2012) menggambarkan mekanisme modulasi s-IgA melalui jalur *T-cell dependent* dan *T-cell independent*.



Gambar 8.10. Pengaturan induksi IgA. a. *Secretory-IgA* usus di induksi di patch Peyer b. patch Peyer dapat menginduksi IgA melalui 2 mekanisme yaitu: melalui *T cell dependent* (kiri) *T cell independent* (kanan) (Pabst, 2012).

Antigen translokasi melalui sel M dan kemudian ditangkap oleh DCs di kubah subepitel. Pada mekanisme *T cell dependent*, DCs masuk ke zona sel T *interfollicular* untuk mengaktifkan sel T *naive*, yang berdiferensiasi menjadi sel T efektor, masuk ke folikel sel B dan melepaskan IgA yang di induksi oleh sitokin. Sel B distimulasi oleh sel T, yang mengekspresikan CD40 ligan (CD40L) dan sitokin yang menginduksi ekspresi *activation-induced cytidine deaminase* (AID) dalam sel B dan dengan demikian memungkinkan terjadinya *class-switch recombination* (CSR). Ekspresi dari *transforming growth factor-β receptor* (TGFβR) diregulasi oleh *nitric oxide* (NO). Dalam mekanisme melalui *cell T independent*, ekspresi AID diinduksi melalui mekanisme bawaan, termasuk sinyal *Toll-like receptor* (TLR) dan sitokin-CD40L yang berhubungan dengan sitokin *B cell-activating factor* (BAFF) dan *a proliferation-inducing ligand* (APRIL), yang diproduksi oleh DC, plasmacytoid DCs (pDCs) dan sel dendritik folikular. Kedua jalur mekanisme ini mungkin berpotongan/ bertemu untuk membentuk *micromilieu* yang mengarahkan *class-switching* terhadap IgA (Pabst, 2012).

Aktivasi limfosit B menghasilkan proliferasi dari sel yang spesifik terhadap antigen tertentu yang disebut ekspansi klonal dan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang mensekresi antibodi secara aktif. Saat sel B naif teraktivasi akan dihasilkan sekitar 4000 sel plasma yang dapat memproduksi hingga 10^{12} molekul antibodi tiap harinya. Selama proses diferensiasi ini, beberapa sel B mulai memproduksi antibodi dari kelas yang berbeda yang memiliki fungsi efektor yang berbeda dan spesifik untuk mikroba tertentu. Paparan berulang dari protein antigen akan menghasilkan antibodi dengan afinitas yang meningkat terhadap antigen tersebut. Proses ini disebut dengan *affinity maturation*, hal ini dapat menyebabkan produksi antibodi dengan kapasitas yang meningkat untuk berikatan dan netralisasi mikroba beserta toksinnya (Abbas & Litchman, 2012).

Jenis antibodi yang dihasilkan juga bergantung dari tempat respon imun terjadi. Misalnya IgA paling banyak dihasilkan di jaringan limfe mukosa. Hal ini dikarenakan sel B yang akan menjadi IgA bermigrasi ke mukosa dan sitokin yang menyebabkan pergeseran ke IgA terdapat pada mukosa. Immunoglobulin A merupakan antibodi utama yang disekresi melalui epitel mukosa (Abbas & Litchman, 2012). Sekitar 80% sel plasma manusia terdapat pada lamina propria usus dan memproduksi IgA lebih banyak (40-60 mg/kg/hr) dibandingkan dengan seluruh gabungan isotope antibodi yang lain (Cerruti & Rescigno, 2008., Montila *et al.*, 2004).

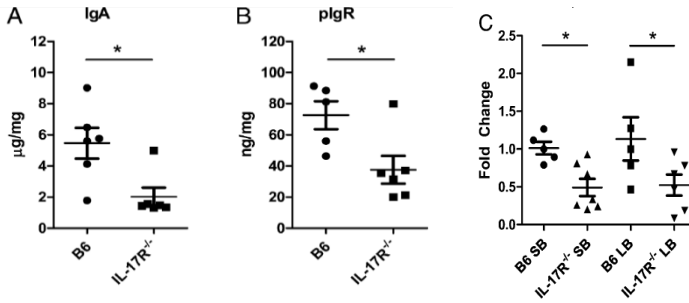
Craig dan Cebra menyebutkan bahwa mayoritas prekursor sel plasma IgA usus berada pada struktur folikuler seperti plak Peyer, perkembangan sel B-IgA bergantung pada stimulasi antigen dan bantuan dari sel T yang menginduksi susunan *germinal center*. *Germinal center* pada plak Peyer berbeda dengan *germinal center* di tempat lain oleh karena adanya sel T CD4 dan sel dendritik yang dapat menimbulkan adanya pergeseran kelas IgA. Terdapat kecenderungan homing dari sel B-IgA ke jaringan mukosa (tidak terjadi pada sel B IgG dan IgM) oleh karena adanya molekul adhesi khusus dan juga faktor lingkungan lokal yang secara khusus menarik sel plasma-IgA mukosa yang sedang beredar (Cebra, 1999).

Selain melalui jalur *T-cell dependent* dan *T-cell independent*, produksi dan sekresi IgA juga diregulasi oleh sel Treg dan sel Th17. Meskipun sel Th17 CD4⁺ banyak ditemukan di usus normal namun peran mereka terhadap respon mikroba belum banyak diketahui. Cao *et al* (2012) menemukan bahwa pIgR dan produksi IgA usus terganggu akibat *Tcell-deficient*. Pemberian IL-17 pada sel epitel

kolon dapat meningkatkan ekspresi pIgR. Ini menunjukkan peran protektif sel Th 17 pada peradangan usus. Mencit dengan level pIgR dan sekresi IgA yang rendah berkorelasi dengan penurunan berat badan setelah pemberian *dextran sodium sulfat* (DSS). *Dextran sodium sulfat* adalah bahan yang digunakan untuk menginduksi kolitis. Cao *et al* (2012) menyimpulkan bahwa sel Th17 berkontribusi terhadap homeostatis usus dengan mengatur ekspresi pIgR dan sekresi IgA di usus.

Banyak bukti menunjukkan bahwa sel Th17 mempunyai peran patogenik dalam kondisi peradangan, tetapi ada kontroversi mengenai apakah mereka juga berkontribusi pada sistem pertahanan usus. Cao *et al* (2012) menjelaskan bahwa keduanya telah dilaporkan pada pasien dengan penyakit inflamasi usus (IBD), sitokin Th17 (IL-17) berfungsi sebagai pelindung dan sitokin proinflamatori. Percobaan yang dilakukan oleh Zhang *et al* (2006) menjelaskan bahwa pasien IBD mengalami peningkatan level IL-17 dalam jaringan yang meradang. Hambatan produksi IL-17 oleh sel Th17 dengan pemberian anti IL-23p19 mAb dapat mencegah dan memperbaiki colitis pada mencit model kolitis. Namun percobaan yang dilakukan oleh Cao *et al* (2012) mengkonfirmasi bahwa defisiensi IL-17F pada mencit model kolitis tidak mencegah kolitis.

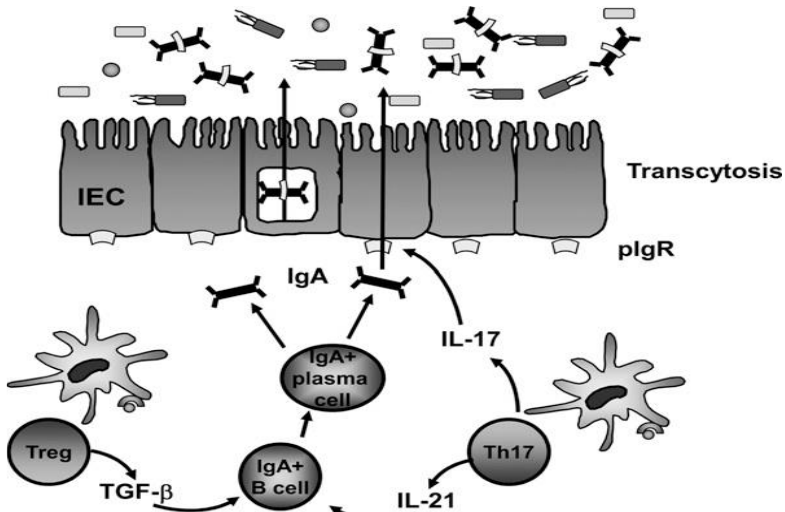
Hasil penelitian yang dilakukan oleh Cao *et al* (2012) menunjukkan bahwa IgA dan pIgR usus rendah pada tikus defisiensi IL-17R. Tingkat IgA secara signifikan menurun pada mencit defisiensi IL-17R karena tidak adanya sinyal IL-17 (gambar 2.11A) membuktikan bahwa pIgR memediasi translokasi IgA dalam lumen usus dan sebagian dari pIgR disekresikan dengan IgA untuk meningkatkan stabilitas. Analisis lebih lanjut pIgR juga secara signifikan menurun ke tingkat yang sama seperti IgA pada mencit defisiensi IL-17R, hal ini mengindikasikan bahwa defisiensi IgA di intestin berhubungan dengan penurunan sekresinya (gambar 2.11B). pIgR mRNA juga menurun pada keduanya usus halus dan usus besar pada mencit IL-17R^{-/-} (gambar 2.11C). Ini mengindikasikan bahwa penurunan level pIgR bukan dari variabel tingkat degradasi protein. Meskipun sinyal TLR pada sel epitel dapat meregulasi ekspresi pIgR, usus besar mengandung lebih banyak mikroflora daripada usus halus. Data ini mengindikasikan bahwa sinyal IL-17 mengatur ekspresi pIgR secara *independent* dari microbiota.



Gambar 8.11. Sekresi IgA dan ekspresi pIgR usus menurun pada mencit IL-17R^{-/-}. (A dan B) pelet yang dikoleksi dari feces mencit IL-17R^{-/-} yang diukur dengan metode Elisa di bandingkan dengan mencit normal. (C) Pigr mRNA juga dianalisis dari jaringan usus mencit IL-17R^{-/-}. LB, large bowel; SB, small bowel (Cao *et al.*, 2012).

Interleukin-17 dominan diproduksi oleh sel Th17 yang banyak dijumpai di usus. Keberadaan sel Th17 berpengaruh terhadap ekspresi pIgR dan sekresi sIgA usus. Studi *in vivo* menunjukkan bahwa sel Th17 meningkatkan ekspresi dan sekresi IgA. Studi *in vitro*, menunjukkan bahwa sel Th17 menginduksi langsung sel B untuk memproduksi IgA. Studi sebelumnya menjelaskan bahwa IL-17 dapat menstimulasi sejumlah sitokin dan protein antimikroba, dan pengaturan ini terjadi melalui aktivasi NF-κB dan P13 kinase. *Interleukin-17A* dapat dengan cepat menginduksi fosforilasi dari p65, dimana ini mengindikasikan aktivasi sinyal NF-κB (Cao *et al.*, 2012).

Sel Th17 dan IL-17 telah terbukti menginduksi sejumlah sitokin dan protein antimikroba yang juga berkontribusi terhadap sistem pertahanan inang terhadap patogen usus. Treg yang memproduksi TGF-β juga terbukti dapat meningkatkan produksi IgA usus melalui promosi langsung sel B *class switching* IgA (Cao *et al.*, 2012).



Gambar 8.12. Pengaturan produksi dan sekresi IgA usus oleh sel Treg dan sel Th17. TGF- β yang diproduksi oleh sel Treg mendrive sel B naive untuk berdiferensiasi menjadi sel yang memproduksi IgA. IL-21 dari sel Th17 meningkatkan efek TGF- β dan meningkatkan diferensiasi sel B IgA⁺. Polimeric IgA kemudian berikatan dengan pIgR di sel epitel usus, menyebabkan transcytosis pIgR terikat pIgA. Interleukin-17 dari sel Th17 meningkatkan sekresi sIgA ke lumen (Cao *et al.*, 2012).

Gambar di atas menunjukkan bahwa sel Th17 mempromosikan translokasi IgA ke epitel usus melalui induksi pIgR oleh IL-17. *Transforming growth factor- β* yang diproduksi oleh sel Treg mendrive sel B naive untuk berdiferensiasi menjadi sel yang memproduksi IgA. Dengan demikian, sel Treg dan Th17 secara terkoordinasi dapat memproduksi IgA usus (Cao *et al.*, 2012).

8.3.3. Peran s-IgA sebagai Pertahanan Mukosa Usus

Peran penting dari mukosa adalah memproduksi antibodi yang disebut s-IgA. *Secretory Immunoglobulin A* berperan dalam perlindungan utama mukosa terhadap mikroorganisme patogen (Brandtzaeg, 2007., Boullier *et al.*, 2009). Pada saluran cerna, kandungan s-IgA usus halus dapat dijadikan salah satu indikator kesehatan saluran pencernaan. Produksi s-IgA pada saluran pencernaan berperan mencegah perlekatan mikroorganisme patogen pada sel epitel usus (Wilson, 2005). Pada permukaan mukosa, IgA akan mengikat mikroba dan mencegah penempelan

bakteri pada epitel serta menetralkan toksin, sehingga dapat menghalangi masuknya mikroba ke dalam sel inang (Abbas & Littchman, 2012).

Secretory IgA melindungi tubuh dari patogen oleh karena dapat berinteraksi dengan molekul adhesi dari patogen potensial sehingga mencegah *adherens* dan kolonisasi patogen tersebut dalam sel inang (Bratawidjadja & Rengganis, 2004). *Secretory IgA* bersama-sama dengan mekanisme pertahanan mukosa *innate* menghambat kolonisasi dan invasi patogen (Everett *et al.*, 2004). Mekanisme s-IgA dalam pertahanan mukosa dengan cara mencegah adhesi bakteri ke permukaan mukosa dan selanjutnya akan dikeluarkan dengan pergerakan mukosiliar dan peristaltik yang disebut *immune excludion* (Ogra, 2005., Duc, 2009). *Immune excludion* adalah suatu mekanisme antibodi sekretori yang bekerja pada garis pertahanan pertama dengan cara mengeluarkan antigen ke permukaan mukosa (Brandtzaeg, 2010).

Secretory IgA dalam bentuk polimerik menjadi stabil oleh ikatan polipeptida rantai J. *Immunoglobulin A* yang mengikat permukaan bakteri dapat mengurangi mobilitasnya, sehingga menghambat penempelan bakteri pada permukaan epitel mukosa (Bratawidjadja & Rengganis, 2004). Telah diketahui bahwa koloni organisme baik patogenik maupun komensal, harus menempel pada permukaan mukosa inang. Sehingga fungsi penting antibodi pada permukaan mukosa adalah menghambat penempelan mikroba tersebut. Isotipe antibodi spesifik untuk epitop adheren mikroba akan menghambat interaksi dengan reseptor inang. *Secretory IgA* berperan dalam hal ini karena s-IgA merupakan glikosilasi luas (+- 20% BB) yang meliputi *hidrophilicity* dan beban negatif pada molekulnya, SC yang terdiri dari 22% karbohidrat dan makromolekul s-IgA (400 kDa) untuk bentuk dimeric juga sangat penting. Jika antibodi s-IgA tidak spesifik untuk adhesin antigen atau epitop yang terdapat di sekitar permukaan mukosa maka mikroba dengan mudah menempel pada permukaan mukosa. Aglutinasi mikroba difasilitasi oleh s-IgA dan kemudian akan dibuang di mukus. Kandungan karbohidrat pada s-IgA juga dapat menghambat *adherens* mikroba dengan ikatan antara karbohidrat dengan adhesin spesifik pada bakteri. Sebagai contoh strain tertentu dari *Escherichia coli* memiliki mannose-spesifik pili tipe 1 yang dapat diaglutinasi khusus oleh IgA2, yang membawa banyak *mannose glycans* dan akan menghambat penempelan bakteri ke sel epitel (Kaetzel, 2007).

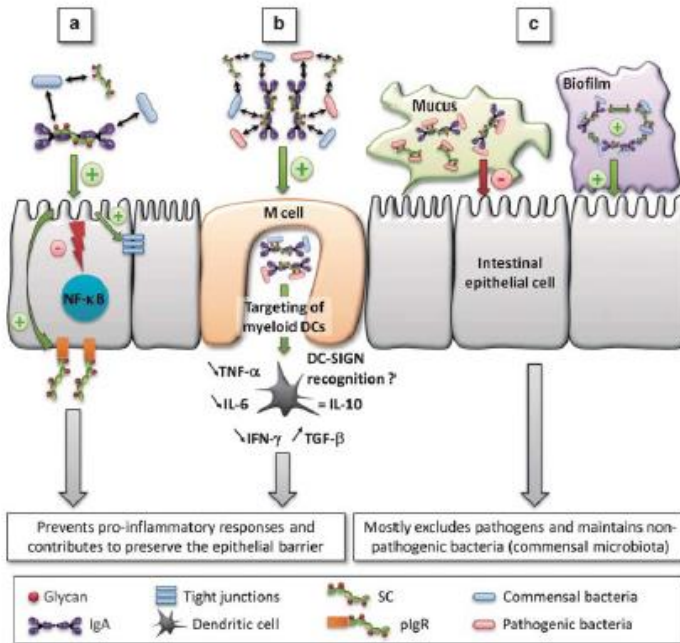
Pada percobaan *in vitro*, diketahui bahwa *Mouse IgA monoklonal antibodies* (mAbs) dapat mencegah perlekatan *Cholera Toxin* (CT) ke sel monolayer epitel usus terpolarisasi. Antibodi monoklonal ini juga dapat melindungi tikus neonatal yang di induksi CT, sehingga dapat mencegah diare sekretorik, penurunan berat badan, dan kematian. Antibodi tersebut menghambat CT mengikat sel-sel epitel melalui mekanisme *steric hindrance* (Apter *et al.*, 1993 dalam Mantis *et al.*, 2011). *Secretory IgA* mampu mencegah perlekatan patogen pada sel epitel usus dengan mengenali dan mengikat reseptor. Mantis *et al* (2011) menjelaskan bahwa perlindungan yang diberikan oleh IgA mAbs ditujukan terhadap 1 protein yaitu serat adhesin yang dikenal untuk mempromosikan perlekatan ke sejumlah sel epitel. Epitop yang dikenali oleh bagian tertentu IgA mAb terlokalisasi ke daerah 30 asam amino, kemudian kepala reseptor mengikat 1 domain.

Secretory IgA mencegah mikroba patogen dan antigen lain mendapatkan akses ke epitel usus melalui tahap aglutinasi, terperangkap dalam mukus, dan dikeluarkan melalui gerakan peristaltik usus. Aglutinasi adalah pembentukan gumpalan makroskopik bakteri (atau virus) sebagai akibat dari reaksi silang antara antibodi dengan permukaan polivalen antigen (Mantis *et al.*, 2011). Permukaan mukosa usus tersusun dari lapisan mukus sebagai bentuk *immunological flypaper* yang dapat menjerat mikroba yang kemudian dibawa dengan aliran mukus (Kaetzel, 2007).

Pengamatan menggunakan mikroskop, imunohistokimia, dan autoradiografi, menunjukkan bahwa murine IgA mAb (IgAC5) khusus untuk antigen O *Shigella flexneri*, bakteri mudah terperangkap dalam lapisan tipis lendir yang melapisi epitel. Aktivitas ini bertambah ketika kompleks IgAC5 berikatan dengan SC, hal ini dikarenakan rantai oligosakarida dari SC berasosiasi dengan mukus. Lapisan mukus usus besar dan usus kecil, baik pada mausia maupun mencit adalah kompleks, dan digambarkan dengan adanya interaksi molekuler antara s-IgA dengan komponen tertentu dari lapisan mukus (Mantis *et al.*, 2011).

Immune exclusion juga protektif terhadap enteropatogen lain seperti virus. *Secretory IgA* mampu mengikat patogen di lumen usus dan kemudian mengurangi atau mencegah perlekatan patogen ke epitel usus. Namun, ada eksperimen yang membuktikan bahwa netralisasi rotavirus di lumen usus mencit dengan IgA mABS, tidak cukup untuk menghambat infeksi. Hal ini disebabkan

karena penentu protektivitas s-IgA berkorelasi dengan epitop spesifik (Mantis *et al.*, 2011).

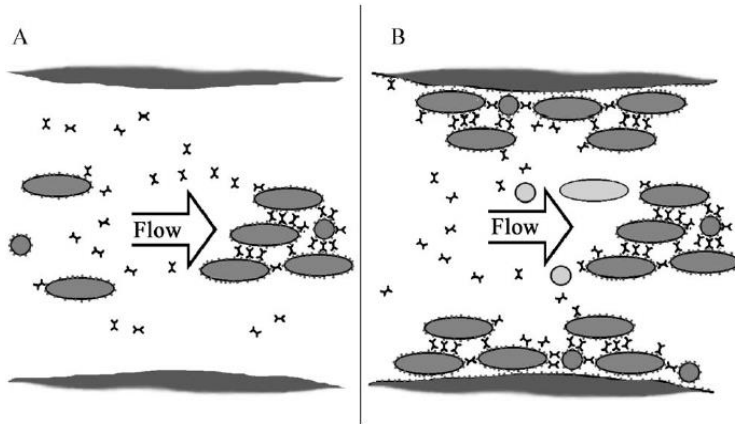


Gambar 8.13. Multifungsi interaksi antara s-IgA dengan bakteri patogen dan bakteri non-patogen di mukosa usus.

Pada semua mekanisme, bakteri patogen dan non-patogen yang dilapisi oleh s-IgA, digambarkan sebagai dimer yang terikat SC. (a) Interaksi antara s-IgA dengan bakteri komensal dapat meningkatkan pertahanan epitel, (b) s-IgA sebagai imun kompleks dengan bakteri komensal atau bakteri patogen berdampak pada pengaturan respon proinflammatory lokal, (c) s-IgA dan free SC mempunyai peran yang selektif (Mantis *et al.*, 2011).

Interaksi antara s-IgA dengan bakteri komensal meningkatkan pertahanan epitel , terjadi melalui beberapa mekanisme yaitu penguatan *tight junctions*, overproduksi pIgR, dan pengurangan translokasi NF-κB b. Secretory-IgA sebagai imun kompleks dengan bakteri komensal atau bakteri patogen selanjutnya ditangkap oleh *M cells*, disana mereka menjadi target myeloid DCs, dan mungkin akan berikatan dengan DC-SIGN, yang berdampak pada pengaturan respon proinflammatory lokal. secretory-IgA dan free SC mempunyai peran yang selektif yaitu membersihkan bakteri patogen dengan mekanisme *immune exclusion*, serta memfasilitasi pembentukan formasi biofilm bagi bakteri nonpatogen pada permukaan mukosa (Mantis *et al.*, 2011).

Secretory-IgA selain berfungsi sebagai imunitas mukosa, juga berperan pada homeostatis mukosa usus. Everett *et al* (2004) sebelumnya telah menggambarkan sebuah model aktivitas s-IgA di lumen usus.



Gambar 8.14. Model aktivitas s-IgA di usus. A) model klasik *immune exclusion*, B) *immune exclusion/ inclusion* (Everett *et al.*, 2004).

Secretory-IgA yang melapisi bakteri, memfasilitasi bakteri tersebut keluar dari lumen usus dan mencegah translokasi bakteri ke epitel, *Immune exclusion/ inclusion*, *secretory-IgA* berinteraksi dengan bakteri nonpatogen dan memfasilitasi pembentukan formasi biofilm pada permukaan mukosa. Pembentukan biofilm dapat mencegah translocation bakteri ke epitel. Bakteri yang tidak berinteraksi dengan s-IgA (yang berwarna lebih terang) berada dalam lingkungan yang kurang baik karena permukaan mukosa telah diubah oleh enzim yang dihasilkan bakteri enterik (Everett *et al.*, 2004).

Immunoglobulin A juga dapat bekerja sebagai opsonin, oleh karena neutrofil monosit dan makrofag memiliki reseptor untuk Fc α -R sehingga dapat meningkatkan efek bakteriolitik komplemen dan menetralisasi toksin (Bratawidjadja & Rengganis, 2004). Baik IgA dalam serum maupun dalam sekresi dapat menetralsisir toksin atau virus dan mencegah terjadinya kontak antara toksin atau virus dengan sel sasaran. Immunoglobulin A dapat mengaktifkan komplemen melalui jalur alternatif, tidak seperti IgG dan IgM, yang mengaktifkan komplemen melalui jalur klasik (Bratawidjadja & Rengganis, 2004). Sejumlah contoh enzim dan toksin yang dinetralsisasi oleh s-IgA telah banyak dijelaskan termasuk cholera

dan enterotoxin lain (Kaetzel, 2007).

Komplek IgA dapat menghambat pelepasan mediator proinflamasi (TNF α) dari aktivitas sel fagosit seperti makrofag, sehingga antigen yang berikatan dengan pIgA menjadi tidak menyebabkan inflamasi (Brandtzaeg, 2010). Sejumlah pIgA sel plasma penting untuk homeostatis mukosa di beberapa mekanisme antiinflamasi. Produksi lokal pIgA melibatkan homeostatis yaitu berinteraksi dengan *Fc α receptor* (CD89) pada leukosit di lamina propria. Pertama pIgA yang mengandung imun kompleks dapat menekan daya tarik neutrophil, eosinophil dan monosit, sehingga dapat mengurangi aktivitas proinflamasi. Kedua, IgA dapat mengatur sekresi sitokin proinflamasi seperti TNF α dari aktivitas monosit. Ketiga, neutrophil dan monosit yang teraktivasi dapat menyebabkan bangkitan dari *reaction oxygen metabolites* yang dilaporkan dapat dihambat oleh IgA. Sebaliknya pIgA dapat memicu monosit, meningkatkan aktivitas termasuk sekresi TNF α . *Secretory-IgA* tampaknya menjadi aktivator yang poten dari eosinophil. Sebuah studi *in vitro* menjelaskan bahwa partisipasi pIgA pada homeostatis mukosa adalah cukup baik (Brandzaeg, 2010).

Pengikatan antigen oleh antibodi s-IgA pada mukosa dapat ditemukan pada tiga tempat, pertama pada lumen yang merupakan tempat awal masuknya antigen. Antibodi yang dihasilkan sel B akan dikeluarkan ke lumen melalui pIgR, setelah sampai pada lumen antibodi akan menetralkan atau mengikat antigen yang ada di permukaan lumen. Kedua pada intraseluler enterosit, ketika antigen masuk pada sel tersebut, dan ketiga pada lamina propria dimana antibodi dihasilkan yang akan mengikat atau menetralkan antigen yang masuk lamina propria melalui sel M (Bratawidjadja & Rengganis, 2004).

8.4. Uji Immunogenitas dan Uji Protektivitas pada Pemberian protein subunit pili *Shigella Flexneri*

8.4.1. Pembuatan bahan imunisasi

Bahan imunisasi yang akan digunakan adalah protein adhesin sub unit pili *Shigella flexneri* 49,8 kDa. Protein ini adalah protein pili yang memperantarai perlekatan bakteri pada sel enterosit yang diisolasi dari sub unit pili *Shigella flexneri* melalui SDS-PAGE setelah dilakukan pemotongan dengan *pili cutter*.

Tahapan pembuatan bahan imunisasi adalah sebagai berikut :

a. Kultur bakteri *Shigella flexneri*

Bakteri yang digunakan adalah *Shigella flexneri* yang

berasal dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Isolat bakteri diperbanyak pada medium *MacConkey*, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil biakan pada media *MacConkey* tersebut dipanen dengan menggunakan kerokan kemudian dimasukkan dalam botol yang mengandung 1000 ml larutan *brain heart infusion broth* (BHI). Botol kemudian dikocok kuat selama 30 menit pada penangas air dengan suhu 37°C. Selanjutnya dari botol tersebut suspensi bakteri sebanyak 10 ml dimasukkan dalam masing-masing botol yang telah mengandung medium TCG dan kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 2x24.

Medium TCG dibuat dengan memakai botol ukuran 250 ml yang dibuat secara miring kurang lebih 15 botol. Dalam setiap botol diisi medium TCG sebanyak 50 ml. *Thiaproline arbonate Glutamate* (TCG) adalah medium yang dapat memperkaya pertumbuhan pili *Shigella. Flexneri*. Medium ini mengandung 0,02% *thioproline*; 0,3% NaHCO₃; 0,1% *mono sodium 1-glutamat*, 1% *baktotryptone*; 0,2% *yeast extract*; 0,5% NaCl; 2% *bacto agar* dan 1 mM β -*amino ethyl ether -N,N,N"n",-tetra acid* (EGTA) (Ehara *et al.*, 1988).

b. Isolasi pili *Shigella flexneri*

Isolasi yang akan dikerjakan merujuk seperti penelitian Ehara (1988) dengan modifikasi penggunaan *pili cutter* desain Sumarno (2000). Pili yang dipanen dan yang akan dikoleksi berasal dari biakan bakteri yang tumbuh pada setiap botol medium TCG yang telah di inkubasi. Hasil koleksi bakteri di kumpulkan dalam satu botol steril yang kemudian di tambahkan *trichloroacetic acid* (TCA) sampai konsentrasinya mencapai 3%. Setelah dikocok rata maka koleksi bakteri diletakkan pada suhu kamar selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan menggunakan kecepatan sebesar 6.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C.

Pellet hasil sentrifugasi diambil dan disuspensikan memakai cairan PBS pH 7,4 dengan perbandingan 1:10. suspensi bakteri tersebut dicukur dengan menggunakan *pili cutter*. Kecepatan mencukur bakteri 5000 rpm selama 30 detik pada potongan ke-satu. Sedangkan potongan ke-dua dan seterusnya dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit dan masing-masing hasil cukuran dilakukan sentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 12.000 rpm memakai suhu 4°C. Supernatans hasil sentrifugasi yang mengandung bagian pili bakteri di simpan pada suhu 4°C, sedangkan pada bagian endapannya ditambahkan cairan PBS pH 7,4 dengan jumlah volume yang sama seperti tersebut di

atas. Cara isolasi bagian pili bakteri yang masih ada pada bagian endapan ini dikerjakan dengan cara perbandingan yang sama seperti diatas dan akan diakhiri apabila pada isolasi bagian supernatannya kelihatan bening dengan menggunakan cairan PBS pH 7,4 sebagai cairan pembanding.

c. SDS-PAGE

Hasil koleksi pili tersebut dilakukan elektroforesis dengan menggunakan metode SDS-PAGE. Sampel protein dipanaskan 100°C selama 5 menit dalam larutan penyangga yang mengandung 5 mM Tris pH 6,8; 5% 2-mercapto ethanol; 2,5% w/v sodium dodecyl sulfate, 10% v/v glycerol dengan menggunakan warna pelacak bromophenol blue. Dipilih 12,5 mini slab gel dengan tracking gel 4%. Voltase aliran listrik yang digunakan adalah 120 mV. Sebagai bahan warna yang digunakan adalah coomassie brilliant blue dan molekul standar sigma low range marker. Setelah dilakukan perhitungan berat molekul maka dilakukan perbanyakkan protein dengan berat molekul 49,8 kDa, kemudian dilakukan permurnian protein yaitu elektroelusi (Laemli, 1970 dalam Sumarno, 2000)

d. Isolasi protein pili *Shigella flexneri*

Petunjuk isolasi protein hemagglutinin pili seperti Ehara dengan modifikasi (Sumarno *dkk.*, 1991 dan Winarsih *dkk.*, 1998). Hasil koleksi pili tersebut dilakukan elektroforesis dengan menggunakan metode SDS-PAGE. Hasil elektroforesis yang terbentuk gel dipotong tegak lurus sehingga tiap potongnya akan mengandung tiga pita protein. Hasil potongan pita tersebut diatas dikumpulkan yang kemudian dimasukkan ke dalam tabung membrane dianalisis memakai cairan penyangga elektroforesis running buffer. Selanjutnya dilakukan elektroelution menggunakan elektroforesis horizontal apparatus aliran listrik 120 mV selama 90 menit. Hasil dari elektroelusi kemudian dilakukan dialisis dengan cairan penyangga PBS pH 7,4 sebanyak 2 liter selama 2x24 jam. Cairan dianalisis diganti sebanyak tiga kali. Cairan yang ada dalam selovan dikumpulkan sebagai protein pili 49,8 kDa. Cairan tersebut diukur konsentrasinya dengan menggunakan spektrofotometer.

8.4.2. Uji Imunogenitas pada pemberian protein sub unit pili *Shigella flexneri*

Respon antibodi dan antimikroba pada pemberian protein sub unit pili shigella dilakukan dengan percobaan *in vivo*, menggunakan hewan coba mencit Balb/c. Mencit Balb/c memiliki

komponen sistem imun yang mirip dengan manusia.

8.4.2.1. Pemberian imunisasi

Bahan imunisasi yang akan digunakan adalah protein adhesin sub unit pili *Shigella flexneri* 49,8 kDa. Besar molekul penting dalam menentukan kemampuan menginduksi respon imun. Molekul besar biasanya lebih imunogenik oleh karena memberikan kesempatan menjadi lebih kompleks (lebih banyak epitop yang beranekaragam). Imunisasi diberikan 4 kali selang 1 minggu, dengan dosis protein 100µg/100µl. Dosis protein adhesin tersebut berdasarkan penelitian Prabowo (2011) bahwa dengan pemberian protein 49,8 kDa dengan konsentrasi protein 100µl dapat menghambat adhesi bakteri pada enterosit mencit.

Imunisasi diberikan secara oral dengan menggunakan sonde. Imunitas mukosa timbul bila patogen terpajan dengan sistem imun mukosa. Oleh karena itu vaksin yang diberikan secara oral atau intranasal biasanya lebih efektif dalam memacu imunitas setempat dibanding dengan pemberian parenteral (Baratawidjaja & Rengganis, 2014)

Peningkatan imunogenitas suatu zat dapat dilakukan dengan mencampurnya bersama adjuvant. Adjuvan adalah zat yang menstimulasi respon imun dengan memfasilitasi ambilan ke dalam sel penampil-antigen (Brooks *et al.*, 2014). Salah satu adjuvan mukosa yang poten adalah CTB. Pemberian imunisasi protein sub unit pili *Shigella flexneri* disertai dengan pemberian adjuvan CTB.

Prosedur penggabungan protein + CTB dengan metode hasil modifikasi dari Santoso (2000). Hasil koleksi protein adhesi 49,8 kDa sub unit pili *shigella flexneri* diambil sebanyak 8 mg dalam 1.5 ml PBS, sedangkan CTB sebanyak 0,230 mg dalam 1.5 ml PBS. Kemudian diaduk didalam lemari asam dan ditambahkan 2% Glutaraldehyde 3 cc. Inkubasi pada suhu ruang selama 1 jam dengan diaduk perlahan. Ditambahkan glycine pH 7,2 sebanyak 2.24 ml (BM= 75,07) diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam diaduk perlahan, setelah itu didialisa dengan PBS semalam sebanyak 4 kali, kemudian disimpan - 20°C.

8.4.2.2. Pemeriksaan kadar antibodi dan antimikroba

Sampel yang digunakan untuk pemeriksaan kadar antibodi dan antimikroba adalah mukus yang diperoleh dari lumen usus halus mencit, setelah pemberian imunisasi sebanyak 4 kali. Preparasi mukus dilakukan dengan cara sebagai berikut: potongan usus dicuci dengan PBS dingin. Kemudian usus dibuka sehingga terlihat bagian mukosa usus halus. Lapisan mukus diambil dengan

cara scraping longitudinal menggunakan spatel dan ditampung didalam tabung yang berisi PBS steril dan protease inhibitor. Suspensi dikocok, kemudian disentrifus 12.000 rpm pada 4°C selama 10 menit. Supernatan diambil dilakukan pemurnian, disuspensi dengan PBS dan dilakukan dialisis menggunakan PBS dan digunakan sebagai sampel untuk pemeriksaan kadar antibodi dan antimikroba (Hernandez *et al.*, 1997; Santoso, 2002).

Kadar antibodi dan antimikroba diukur dengan metode ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) menggunakan mouse s-IgA ELISA kit. Prosedur dilakukan mengikuti petunjuk dari distributor. sebagai berikut : Kit dikeluarkan dari suhu 2-8°C dan dibiarkan pada suhu ruang selama 30 menit sebelum digunakan. Disiapkan terlebih dahulu wash solution yang diencerkan dengan distilled water 1 : 20. Kemudian well disusun ke dalam *plate/strip*. *Sampel diluent* dimasukkan ke *well* pertama sebagai blanko sebanyak 50 µl, dan ke semua *standart well* dan sampel sebanyak masing-masing 50µl. Ditambahkan standart masing-masing 50µl ke dalam keenam *standart well* dan 50 µl sampel ke dalam *sample well*. Kemudian ditambahkan HRP-*conjugated antibody* 100µl pada tiap *well*, selanjutnya dishaker, ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah itu dilakukan washing dengan washing solution yang telah disiapkan sebanyak 5 kali. Kemudian ditambahkan chromogenic substrat A 50 µl dan Substrat B 50µl pada tiap-tiap well, selanjutnya dishaker dan diinkubasi pada suhu 37° selama 15 menit, lindungi dari cahaya. Kemudian ditambahkan stop solution 50 µl pada tiap-tiap *well* untuk menghentikan reaksi (warna biru berubah menjadi warna kuning). Kemudian diukur *optical density* (OD) pada 450 nm dalam waktu 15 menit pada ELISA reader. Kemudian hasil absorbansinya dihitung dengan regresi linier dan hasil penghitungan x menunjukkan konsentrasi s-IgA (*Manufactured by: immunology Consultants Laboratory, inc.USA*).

8.4.3. Uji protektivitas pada pemberian protein sub unit pili *Shigella*

Uji protektivitas menggunakan metode *mice ligated ileal loop* (MLIL). Uji protektivitas ini menggunakan percobaan dengan potongan usus halus mencit, setelah pemberian imunisasi selama 4 minggu. Pada minggu berikutnya mencit dimatikan, diambil usus halusnya. Usus halus sepanjang ujung lambung hingga ujung usus besar dipotong 10 cm, kemudian kedua ujungnya diikat dengan benang (MLIL/*Mice Ligated Ileal Loop*). Masing-masing usus yang telah diikat tersebut diinjeksi dengan *Shigella flexneri* sebanyak

100µl kemudian ditimbang sebagai berat awal usus. Setelah ditimbang usus dililitkan kedalam alat khusus dan kemudian dimasukkan kedalam media *Roswell Pack Medium Institute* (RPMI) dan diputar diatas stirer dengan suhu 37°C (Desain Sumarno, 2007). Waktu pemaparan dengan bakteri adalah 4 jam (Philpot *et al.*, 2000).

Usus halus yang telah terpapar *Shigella flexneri*, selanjutnya dimasukkan ke dalam formalin dibiarkan terendam di dalamnya selama 24 jam. Jaringan di pilih yang terbaik sesuai dengan yang akan di teliti. Jaringan di potong kurang lebih ketebalan 2-3 mili meter (potongan melintang dengan satu sampel kolon dipotong menjadi tiga bagian). Di masukan kekasat dan di beri kode sesuai dengan kode gross peneliti. Dimasukan ke larutan formalin 10 % sebelum di proses. Di proses menggunakan alat/mesin Tissue Tex Prosesor. Jaringan di angkat dari mesin *Tissue Tex Prosesor*. Jaringan di blok dengan paraffin sesuai kode jaringan. Jaringan di potong dengan alat microtome ketebalan 3-5 mikron. Kemudian di taruh dalam oven selama 30 Menit dengan suhu panas 50-70 derajat , kemudian di masukan ke dalam dua tabung larutan xylol masing-masing 20 menit setelah itu di masukan ke alkohol 3 tempat masing-masing tempat 3 menit kemudian dimasukan air mengalir selama 15 menit.

Setelah proses di atas, kemudian dilakukan proses pewarnaan (HE) dengan cat utama Harris Hematoksilin selama 10-15 Menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15 Menit, alkohol asam 1 % 2-5 celup, amonia air 3-5 Celup dan cat perbandingan Eosin 1% selama 15 Menit. Selanjutnya dilakukan dehidrasi dengan alkohol 96% selama 3 menit sebanyak 2 kali dan alkohol 80% selama 3 menit. Tahap selanjutnya dilakukan proses penjernihan (*clearing*) dengan menggunakan xylol selama 15 menit sebanyak 2 kali. Kemudian dilakukan *Mounting* dengan entelan dan deckglass.

Selanjutnya dilakukan pemotretan dan scanning dengan software OLIVIA (*Olympus Viewer for Imaging Application*), untuk dapat diamati tingkat kerusakan epitel mukosa.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas K & Litchman Andrew H, 2004. *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier Science USA

- Abbas AK, Lichman AH, Pillai S. 2007. *Properties and overview of immune responses*. Cellular and molecular immunology. Edisi kelima. Philadelphia: WB Saunders Co. 3-17
- Abbas, A.K & Litchman, A.H 2011, *Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System*, Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Amy V, Jennison, Naresh K, *et al.* 2004. *Shigella flexneri Infection: Pathogenesis and Vaccine Development*. FEMS Microbiology Review. 28. 43-58
- Aivarez, M., Urbina, G.; Muller, C. & Perdomo. L. , 2007. Excretion products of *Shigella dysenteriae* and apoptotic cell death on chick embryo muscle tissue. *Int. J. Morphol.*, **25**(3):615-620.
- Ansaruzzaman, M., Sultana, M., Talukder K. A., Alam, K., Matsushita, S., Safa, A., Khajanchi, B.K., Dutta, D.K., Islam, Z., Albert, M. J., Nair G. B and Sack, D.A.,. 2005. Isolation and characterization of provisional serovar *Shigella boydii* E16553 from diarrhoeal patients in Bangladesh. *Journal of Medical Microbiology*, **54**: 477-480
- Anam K., Utami YW., Sumarno., Suyuti H. 2012. *Identifikasi Protein Hemagglutinin Sub-unit Pili 49,8 kDa dan Anti Hemagglutinin 7,9 kDa serta Uji Respon Imun Reaksi Silang Shigella spp* (Unplished)
- Anam K., Setyorini D., Agustina W., Wibowo., Lestari FE., Utami YW., Sumarno. 2012. *The confirmation of protein adhesion haemagglutinin inhibition 8 kDa sub unit pili Shigella dysenteriae by using immunocyto chemistry and calculation of dot blott methods*. Presented : At the 5th ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology (ACTMP) in Manila University Philippines.
- Anam K., Nurdiana, Herowati T.E, Suyuti H and Sumarno.RP. 2016. *“Cross Immunity among Pili sub-unit Hemagglutinin and Pili sub-unit Anti Hemagglutinin Proteins of Shigellas spp”*. Ijppr.Human, 2016; Vol. 7 (2): 19-30

- Anderson Arthur O. 2004. *Peripheral and mucosal immunity: critical issues for oral vaccine designs*
- Agerbert B., Raqib R., Nizet V., Weintraub A., Jonsson AB., Putsep K. 2012. *Role of antimicrobial peptides in combating shigellosis and in antibiotic associated diarrhea*. Karolinska institutet. 1-2
- Ashkenazi, S., Passwell, J.H., Harlev, E., Miron, D., Dagan, R., Farzan, N., Ramon, R., Majadly, F., Bryla, D.A., Karpas, A.B., Robbins, J.R. and Schneerson, R. 1999. *Safety and immunogenicity of Shigella sonnei and Shigella flexneri 2a O-specific polysaccharide conjugates in children*. J. Infect. Dis. 179.1565–1568
- Ashkenazi Shai, Levy Itzhak, Kaza Ronovski V. 2003. *Growing Antimicrobial Resistance of Shigella Isolates*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 51. 427-429
- Atarashi, K. et al. 2008. *ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation*. Nature 455, 808–812
- Azuma M. 2006. *Fundamental mechanism of host immune responses to infection*. J Periodont Res. 41. 361—373
- Ashida H, Ogawa M, Mimuro H. and Sasakawa C. 2009. *Shigella infection of intestinal epithelium and circumvention of the host innate defense system*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 337. 231- 255
- Avanita Prabowo. 2011. *Partial characterization of adhesins pili on Shigella dysenteriae*. Tesis
- Bauer E., Williams B., Smidt H., Verstegen M and Mosenthin R. 2004. *Influence of Gastrointestinal Microbiota on development of the immune system in young animal*. Curr issues intestinal Microbiol. 7. 35-52
- Biet, F., Loch, C. and Kremer, L. 2002. *Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens*. J. Mol. Med. 80, 147–162.

Biro Pusat Statistik Kantor Menteri Negara Kependudukan / Badan Koordinasi Keluarga Berencana Nasional Departemen Kesehatan. 1997. *Survai Demografi dan Kesehatan*.

Behrman, Kliegman, Arvin. 2000. *Ilmu Kesehatan Anak (Nelson Textbook of Pediatrics)*. Alih bahasa oleh Wahab Samik. Vol 2. ECG. 974-976

Bland D., Barrera C., and Reyes V. 2006. *Gastrointestinal Mucosal Immunology*. Mucosal Immunology and Virology. London: Springer.

Blaschitz C & Raffatelu M. 2010. *The 17 cytokines and the gut mucosal barrier*. J Clin Immunol. 30. 196-203

Blocker, A., P. Gounon, E. Larquet, K. Niebuhr, V et al. 1999. *The tripartite type III secretin of Shigella flexneri inserts IpaB and IpaC into host membranes*. J. Cell Biol. 147:683-693.

Bopp CA., Brenner FW., Fields PJ., Wells JG., Strockbine NA., Murray PR., Baron EJ., Jorgensen JH., Pfaller MA., Tenover FC., Tenover RH. 2003. *Escherichia, Shigella, and Salmonella. Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; p. 654-71.

Boullier, S., M. Tanguy, K.A. Kadaoui, C. Caubet, P. Sansonetti, B. Corthésy and Armelle, Phalipon, 2009. *Prevents Intestinal Tissue Destruction by Secretory IgA-Mediated Neutralization of Shigella flexneri Prevents Intestinal Tissue Destruction by Down-Regulating Inflammatory Circuits*. J Immunol, 183;5879-5885.

Brandtzaeg Per. 2010. *Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease*. Current opinion in gastroenterology.26.554-563

Baratawijaya & Rengganis. 2014. *Imunologi Dasar*. Edisi ke-11. FKUI Jakarta.

Brooks GF., Carroll KC., Butel JS., Morse SA., Mietzner TA. 2014. *Mikrobiologi Kedokteran*. Alih bahasa oleh Aryandhito WN & Adisti A. Jakarta: EGC

- Buchrieser, C., P. Glaser, C. Rusniok, *et al.* 2000. *The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of Shigella flexneri*. Mol. Microbiol. 38:760-771.
- Cabral J P S. 2010. *Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water*. Int. J. Environ. Res. Public Health. 7: 3657-3703
- Cao AT., Yao Suxio., Gong Bin., Elson CO., Cong Yingzi. 2012. *Th17 Cells Upregulate Polymeric Ig Receptor and Intestinal*. The Journal of Immunology. 10.4049. (1-8)
- Campbell, N.A., Reece, J.B., Mitchell, L.G. 2003. Biologi. Edisi Kelima. Jilid II. Erlangga. Jakarta
- Cerda & Cossart. 2006. *Bacterial adhesion and entry into host*. Cells. 124 (715-727).
- Cherla R, Lee S, Vernon T. 2003. *Shiga toxins and apoptosis*. FEMS microbiology letters. 228. 159 -66
- Chen Zhi & O'Shea JJ. 2008. *Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells*. Immunol Res. 41(2):87-102
- Ciesla WP, Guerrant RL, Wilson WR, *et al.* 2003. *Current Diagnosis and Treatment in Infectious Disease*. Lange Medical Books, 225 - 268.
- Cossart P and Sansonetti P.J. 2004. *Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens*. Science . 303. 242-248
- Coutte L., Alonso S., Reveneau N., Willery E., Quatannens B., Loch C., Jacob-Dubuisson. 2003. *Role of Adhesin Release for Mucosal Colonization by a Bacterial Pathogen*. J.exp.Med. 197(6). 735-742
- Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan Pemukiman (Ditjen PPM & PLP). 1999. *Tatalaksana Kasus Diare Bermasalah*. Departemen

Kesehatan RI; Badan Koordinasi Gastroenterologi Anak
Indonesia

- Dong C. 2009. *Differentiation and function of pro-inflammatory Th17 cells*. *Microbes and Infection*. 11: 584-588
- Duguid, J. P., I. W. Smith, G. Dempster, *et al.* 1955. *Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in Bacterium coli*. *J Pathol Bacteriol* 70(2). 335-48.
- Dutta, S., Dutta, D., Dutta, P., Matsushita, S., Bhattacharya, S. K., and Yoshida. 2003. *Shigella dysenteriae* Serotype 1, Kolkata. *India Emerging Infectious Diseases*. www.cdc.gov/eid . 9 (11): 1471-1474
- Ericson Charles D, Dupont Herbert L, Steffen Robert. 2003. *Travelers Diarrhea*. Hamilton. 17 – 183
- Externest D., Meckelein B., Schmidt AM and Frey A. 2000. *Correlations between antibody immune responses at different mucosal effector sites are controlled by antigen type and dosage*. *Infect immun*. 68: 3830-3839
- Faisal, Sumarno, Handono K. 2010. *Susu Kuda Sumbawa Terfermentasi sebagai Immunostimulant untuk 37.8 kda V. cholerae Vaccine*. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*
- Fritz , J.H. , R.L. Ferrero , D.J. Philpott , and S.E. Girardin . 2006 . *Nodlike proteins in immunity, inflammation and disease*. *Nat. Immunol*. 7 : 1250 – 1257
- Forest C., Faucher S.P., Poirier K., Houle S., Dozois C.M., and Daigle F. 2007. *Contribution of the Fimbrial Operon of Salmonella enteric. Serovar Typhi during Interaction with Human Cells*. *Infect. Immun*. 75 (11) : 5264-5271
- Fries, L.F., Montemarano, A.D., Mallet, C.P., Taylor, D.N., Hale, T.L. and Lowell, G.H. 2001. *Safety and immunogenicity of a proteosome-Shigella flexneri 2a lipopolysaccharide vaccine administered intranasally to healthy adults*. *Infect. Immun*. 69.4545–4553

- Fujihashi K., Mcghee J., Mestecky J., Strober W., Bienenstock J., Mayer L. 2005. *Th1Th2/Th3 cells for regulation of mucosal immunity, tolerance and inflammation*. Mucosal Immunology. Edisi ketiga. London: Elsevier Academic
- Gbarah, A., D. Mirelman, P. J. Sansonetti, R. Verdon, *et al.* 1993. *Shigella flexneri transformants expressing type 1 (mannose-specific) fimbriae bind to, activate, and are killed by phagocytic cells*. Infect Immun 61(5). 1687-1693.
- Geddes, K. *et al.* 2011. *Identification of an innate T helper type 17 response to intestinal bacterial pathogens*. Nat. Med. 17, 837-844
- Girardin, S. E., I. G. Boneca, L. A. Carneiro, *et al.* 2003. *Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan*. Science 300:1584-1587.
- Goldsby R., Kindt T., and Osborne B. 2000. *Immune System*. Immunology. Edisi keempat. New York: WH Freeman and Company
- Gomez, H.F., Ochoa, T.J., Carlin, L.G. and Cleary, T.G. 2003. *Human lactoferrin impairs virulence of Shigella flexneri*. J. Infect. Dis. 187. 87-95
- Guhathakurta, B., D. Sasmal, A. N. Ghosh, C. R. *et al.* 1996. *Purification of a cell-associated hemagglutinin from Shigella dysenteriae type 1*. FEMS Immunol Med Microbiol 14(2-3). 63-66.
- Hale, T. L. 1991. *Genetic basis of virulence in Shigella species*. Microbiol Rev 55 (2). 206-224.
- Hahn, E., P. Wild, U. Hermanns, P. Sebbel, R. *et al.* 2002. *Exploring the 3D molecular architecture of Escherichia coli type 1 pili*. J Mol Biol 323(5). 845-857.
- Hadioetomo RS. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama

- Hathaway, L.J., Griffin, G.E., Sansonetti, P.J. and Edgeworth, J.D. 2002. *Human monocytes kill Shigella flexneri but then die by apoptosis associated with suppression of proinflammatory cytokine production*. Infect. Immun. 70. 3833–3842
- Herwana E., Surjawidjaja JE., Salim OC., Indriani N., Bukitwetan P., Lesmana M. 2010. *Shigella-Associated Diarrhea in children in South Jakarta-Indonesia*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 41(2). 418-425
- Honda K and Takeda K. 2009. *Regulatory mechanism of immune responses to intestinal bacteria*. Mucosa Immunology. 2. 187-196
- Islam, D. and Christensson, B. 2000. *Disease dependant changes in T-cell populations in patients with shigellosis*. APMIS. 108. 251–260
- Ivanov II., McKenzie B.S., Zhou L. *et al.* 2006. *The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell. 126. 1121-33.
- Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, *et al.* 2009. *Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria*. Cell. 139. 485–98.
- Jawetz, Melnick dan Adelberg. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 23. Jakarta: EGC
- Jennison, A.V and Verma, N.K. 2004. *Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development*. FEMS Microbiology Reviews 28 : 43–58
- Jiang, Y., F. Yang, X. Zhang, *et al.* 2005. *The complete sequence and analysis of the large virulence plasmid pSS of Shigella sonnei*. Plasmid 54:149–159.
- Jones, C. H., J. S. Pinkner, R. Roth, J. *et al.* 1995. *FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae*. Proc Natl Acad Sci U S A 92(6). 2081-2085.

- Johnson, A.G., Ziegler, R.J., Hawley, L. 2011. *Esential Mikrobiologi dan Immunologi*. Binarupa Aksara. Tangerang
- Kane, C. D., R. Schuch, W. A. Day, *et al.* 2002. *MxiE regulates intracellular expression of factors secreted by the Shigella flexneri 2a type III secretion system*. J. Bacteriol. 184:4409–4419
- Kasper Dennis L, Fauci Anthony S. 2010. *Infectious Diseases*. 17edition. New York : Medical. 531 - 535
- Kotloff K, Winnickoff JP, Ivanof B. *et al.* 1999. *Global Burden of Shigella Infections: Implications for Vaccine Development and Implementation of Control Strategies*. Buletin of the World Health Organization. 77 (8). 651-666
- Kotloff, K.L., Noriega, F.R., Samandari, T., Sztein, M.B., Losonsky, G.A., Nataro, J.P., Picking, W.D., Barry, E.M. and Levine, M.M. 2000. *Shigella flexneri 2a strain CVD 1207, with specific deletions in virG, sen, set and guaBA, is highly attenuated in humans*. Infect Immun. 68. 1034–1039
- Kraehenbuhl J and Neutra M. 2004. *Molecular and celular basis of immune protection of mucosal surface*. Am Physiol Society. 72. 853-879
- Kresno SB. 2010. *Immunologi : Diagnosis dan prosedur laboratorium*. Edisi kelima. Jakarta: FKUI. 4-16
- Lamps Laura W. 2009. *Surgical Pathology of the Gastrointestinal system : Bacterial, Fungal, Viral, and Parasitic Infections*. Springer. 33 – 36
- Law, B. 2004. *Deadly Deseases and Epidemics. Campylobacteriosis*. Chealse House Publisher. United States of America
- Le-Barillec, K., J. G. Magalhaes, E. Corcuff, *et al.* 2005. *Roles for T and NK cells in the innate immune response to Shigella flexneri*. J. Immunol. 175:1735–1740.
- Li, H., H. Xu, Y. Zhou, *et al.* 2007. *The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family*. Science 315:1000–1003.

- Li, Y., Cao, B., Liu, B., Liu, D., Ga, Q., Peng, X., Wu, J., Bastin, D. A., Feng L., and Wang, L. 2009. *Molecular detection of all 34 distinct O-antigen forms of Shigella*. Journal of Medical Microbiology. 58: 69–81
- Levine Myron M, Kotloff Karenl, Barry Eileen. 2007. *Pandemic of Shiga dysentery*. Nature Reviews Microbiology
- Longo Dan L, Fauci Anthony S. 2010. *Gastroenterology and Hepatology*. McGraw-Hill. 228-237
- Lung E, Friedman SL, McQuaid KR, et al. 2003. *Current Diagnosis and Treatment in Gastroenterology*. 2nd edition. Lange Medical Books, 131 - 150.
- Macdonald T. 2003. *The mucosal immune system*. Parasite Immunol. 25. 235-246
- Macdonald T., Monteleone G. 2005. *Human gut-associated lymphoid tissues*. Mucosal immunology. Edisi ketiga. London : Elsevier Academic
- Mandic-Mulec, I., Weiss, J. and Zychlinsky, A. 1997. *Shigella flexneri is trapped in polymorphonuclear leukocyte vacuoles and efficiently killed*. Infect. Immun. 65. 110–115.
- Mansjoer A, Akbar P. 2000. *Shigellosis*. Medical Jurnal. 2(3)
- Manatsathit S, Dupont HL, Farthing MJG, et al. 2002. *Guideline for the Management of acute diarrhea in adults*. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 17. 54-71
- Mavris, M., A. L. Page, R. Tournebize, et al. 2002. *Regulation of transcription by the activity of the Shigella flexneri type III secretion apparatus*. Mol. Microbiol. 43:1543–1553
- Menard, R., P. Sansonetti, and C. Parsot. 1994. *The secretion of the Shigella flexneri Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD*. EMBO J. 13:5293–5302.

- Molinaro, A., Silipo, A., Cristina D C., Sturiale, L., Nigro, G., Garozzo, D., Bernardini, M.L., Lanzetta, R., and Michelangelo, P.. 2008. Full structural characterization of *Shigella flexneri* M90T serotype 5 wild-type R-LPS and its *galU* mutant: glycine residue location in the inner core of the lipopolysaccharide. *Glycobiology*, **18** (3) pp. 260–269
- Munasir Zakiudin. 2001. *Respon Imun Terhadap Infeksi Bakteri*. Sari Pediatrik. 2 (4). 193-197
- Murray,P.R., Baron,E.J., Pfaller,M.A., Tenover,F.C. and Tenover,F.C. and Tenover,F.C. and Yolken,R.H. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D.C: ASM Press
- Nathania, D. 2008. *Shigella dysenteriae* <http://mikrobia.files.wordpress.com>. Di akses Agustus 2011.
- Nawrocka Agnieszka., Owczarek Witold.,Pilus Agnieszka. 2011. *The17 cells and TH17-cytokines in the pathogenesis of inflammatory diseases*. Int Rev Allergol Clin Immunol. 17(1-2). 27-31
- Niyogi S. 2005. *Shigellosis*. The journal of microbiology. 43. 133 –43
- Neurath M., Finotto S and Glimcher L. 2002. *The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity*. Nature Medicine. 8(1). 567-573
- Nymu, T., 2008. *Use attach to the Small Intestine, Back To-Kidney*, Taiwan. <http://www.igem.org>. Diakses tanggal 28 Juni 2012
- Ogawa M, Handa Y, Ashida H et al. 2008. *The versatility of Shigella effectors*. Nat. Rev. Microbiol. 6, 11-16
- Ogra PL., Faden H., Welliver RC. 2001. *Vaccination strategies for mucosal immune responses*. Clin Microbiol Rev. 14 (2): 432-438
- Parslow TG., Daniel P., Abba I., Jhon B., Imoden. 2001. *Medical Immunology* . MC Graw-Hill Companies.

- Parsot, C., E. Ageron, C. Penno, *et al.* 2005. *A secreted anti-activator, OspD1, and its chaperone, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in Shigella flexneri.* Mol. Microbiol. 56:1627–1635.
- Parsot, C., C. Hamiaux, and A. L. Page. 2003. *The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems.* Curr. Opin. Microbiol. 6:7–14
- Parker James N, Parker Philip M. 2002. *The 2002 Official patients Sourcebook on Shigellosis.* ICON Health Publication. 9-15
- Passwell, J.H., Harlev, E., Ashkenazi, S., Chu, C., Miron, D., Ramon, R., Farzan, N., Shiloach, J., Bryla, D.A., Majadly, F., Roberson, R., Robbins, J.R. and Schneerson, R. 2001. *Safety and immunogenicity of improved Shigella O-specific polysaccharide- protein conjugate vaccines in adults in Israel.* Infect Immun. 69.1351–1357.
- Perdigon G., Fuller R and Raya R., 2001. *Lactic acid bacteria and their effect on the immune system.* Curr Issues Intest Immunol. 2 (1). 27-42
- Pedron, T., C. Thibault, and P. J. Sansonetti. 2003. *The invasive phenotype of Shigella flexneri directs a distinct gene expression pattern in the human intestinal epithelial cell line Caco-2.* J. Biol. Chem. 278:33878–33886.
- Phalipon, A., Cardona, A., Kraehenbuhl, J.P., Edelman, L., Sansonetti, P.J. and Cortes, B. 2002. *Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo.* Immunity .17.107–115.
- Philpott, D. J., S. Yamaoka, A. Israel, *et al.* 2000. *Invasive Shigella flexneri activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells.* J. Immunol. 165:903–914.
- Philpott Danaj, Jonathan D, Edgeworth, *et al.* 2000. *The pathogenesis of Shigella flexneri infection: Lessons from in vitro and in vivo studies.* The royal Society . 575-586

- Pilette C., Durham SR, Vaerman J., Sibille Y. 2004. *Mucosal immunity in Asthma and chronic obstructive pulmonary disease a role for immunoglobulin A*. Proc Am Thorac Soc 1: 125-135
- Ploeg, VD., Vinas., Terragno., Bruno., Binsztein. 2010. *Laboratory Protocol: "Serotyping of Shigella spp."* WHO Global Foodborne Infections Network
- Prabowo Avanita. 2011. *Partial Characterization of Adhesion Pili on Shigella dysenteriae*. Thesis. Diterbitkan. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang.
- Proft, T. and E. N. Baker. 2009. *Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease*. Cell Mol Life Sci 66(4). 613-635.
- Raqib, R., Qadri, F., Sarker, P., Mia, S.M., Sansonetti, P.J., Albert, M.J. and Andersson, J. 2002. *Delayed and reduced adaptive humoral immune responses in children with shigellosis compared with in adults*. Scand J Immunol. 55. 414-423
- Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, Winter SE, et al. 2008. *Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes Salmonella dissemination from the gut*. Nat Med. 14. 421-8.
- Reis RS & Horn F. 2010. *Enteropathogenic Escherichia coli, Samonella, Shigella and Yersinia: cellular aspects of hostbacteria interactions in enteric diseases*. Gut Pathogens. 2(8). 1-12
- Ryan Kenneth J, Ray George. 2004. *Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious disease*. 4th edition. McGraw-Hill. 358 - 362
- Roitt I., Brostoff J and Male D. 2001. *Immunology*. Edisi keenam. Edinburgh: Mosby
- Rubino SJ., Geddes K., Girardin SE., 2012. *Innate IL-17 and IL-22 responses to enteric bacterial pathogens*. Trends in immunology. 33(3). 112-117

- Salzman, N.H., Ghosh, D., Huttner, K.M., Paterson, Y. and Bevins, C.L. 2003. *Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin*. Nature. 422. 522–526.
- Salzman, N.H. *et al.* 2010 *Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology*. Nat. Immunol. 11, 76–83
- Santo R.D, Santana. 2005. *Epidemiological and Microbiological Aspects of Acute Bacterial Diarrhea in Children from Salvador*. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 9(1): 77 – 83
- Santoso S. 2002. *Protein Adhesin Salmonell Typhi Sebagai Faktor Virulensi Berpotensi Imunogenik Terhadap Produksi slgA Protektif*. Disertasi Program Doktor universitas Airlangga Surabaya.
- Sakaguchi, T., H. Kohler, X. Gu, *et al.* 2002. *Shigella flexneri regulates tight junction-associated proteins in human intestinal epithelial cells*. Cell. Microbiol. 4:367–381.
- Salyers, A.A; and Whitt D.D. 2002. *Bacterial Pathogenesis: a Molecular Approach*. 2nd ed. American Society for Microbiology Press. Washington DC., 93-94, 115-126
- Sasakawa Chihiro. 2010. *A new paradigm of bacteria-gut interplay brought through the study of Shigella*. The Japan Academy. 86 (3). 229-238
- Sansonetti, P. J., J. Arondel, M. Huerre, *et al.* 1999. *Interleukin-8 controls bacterial transepithelial translocation at the cost of epithelial destruction in experimental shigellosis*. Infect. Immun. 67:1471–1480.
- Sansonetti, P. J. 2001. *Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by Shigella, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks*. FEMS Microbiol. Rev. 25:3–14.

- Sansonetti Philippe. 2001. *Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis*. American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology. 280 (3). 319-323
- Sansonetti, P. J. 2004. *War and peace at mucosal surfaces*. Nat. Rev. Immunol. 4:953–964.
- Schrijver, K D., Bertrand, S., Garitano, G., Branden, D.V., Schaeren, J. 2011. Outbreak of *Shigella sonnei* infections in the Orthodox Jewish community of Antwerp, Belgium, April to August 2008. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?urlId=19838>.
- Seidlein Lorenz, Kim Deok, Ali Mohammad, *et al.* 2006. *A Multicentre Study of Shigella diarrhea in Six Asian Countries: Disease Burden, Clinical Manifestations, and Microbiology*. Plos Medicine. 3. 1556-1566
- Sethabutr Orntipa, Venkatesan Malabi, Yam Sylvia, *et al.* 2000. *Detection of PCR Product of ipaH gene from shigella & enteroinvasive escherichia Coli by enzyme linked Immunosorbent assay*. Diagnostic Microbiology & Infection Disease. 37(1). 11-16
- Sharon, N. 1987. *Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease*. FEBS Lett 217(2). 145-57
- Schroeder G N. and Hilbi H. 2008. *Molecular Pathogenesis of Shigella spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion*. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS. 21 (1) :134–156
- Schilling JD., Mattew., Mulvey., Hultgren. 2001. *Structure and Function of Escherichia coli Type 1 Pili: New Insight into the Pathogenesis of Urinary Tract Infections*. The Journal of Infectious Diseases. 183 (36-40).
- Sellge G , Phalipon A., Bandeira, James P. Di Santo, Phillippe J. Sansonetti, Fritz, Pabon WS, Antonio GE, Magalhaes JG. 2010. *Th17 Cells Are the Dominant T Cell Subtype Primed by S. flexneri Mediating Protective Immunity*. J Immunol. 184 : 2076-2085

- Shin DM., Kyeong Jo E. 2011. *Antimicrobial peptides in innate immunity against mycobacteria*. *Immune network*. 11(5). 245-252
- Shim Doo Hee, Suzuki Tishihiko, Chang Sun Young, *et al.* 2007. *New Animal model of Shigellosis in the Guinea Pig : Its Usefulness for Protective Efficacy Studies*. *The Journal of Immunology*. 178. 2478-2482
- Simanjuntak. 1991. *Epidemiologi Disentri*. Cermin Dunia Kedokteran. 72. 18-20
- Sonnenberg, G.F. *et al.* 2011. *Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22*. *Nat. Immunol.* 12, 383–390
- Song, X. *et al.* 2011. *IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens*. *Nat. Immunol.* 12, 1151–1158
- Sperandio B., Guo J, Zhang., Sansonetti PJ., Pédrón T. 2008. *Virulent S. flexneri subverts the host innate immune response through manipulation of antimicrobial peptide gene expression*. *JEM* vol. 205 no. 5 1121-1132
- Snellings, N. J., B. D. Tall and M. M. Venkatesan. 1997. *Characterization of Shigella type 1 fimbriae: expression, FimA sequence, and phase variation*. *Infect Immun* 65(6). 2462-2467.
- Starks, A.M., Froenlich, B.J., Jones, T.N., and Scott, J.R. 2006. *Assembly of Csi Pili: The Role of Specific Residues of the Mayor pilin*. *J. Bacteriol.* 188(1): 231-239
- Setyorini D., Utami Y., Widjayanto E., Winarsih S., Noorhamdani AS., Sumarno. 2013. *Protectivity of adhesion molecules pili 49,8 kDa Shigella desenteriae conjugated with ISCOM against bacterial colonization and colonic epithelial cells damage in mice*. *Inj J Trop Med.* 8(1). 19-26

- Sumarno, Noorhamdani A, Samsul I, Sjoeker M and Ichinose Y, 1991. *Purifikasi Protein hambatan aglutinasi Vibrio cholerae El Tor T79-6*. Majalah Kedokteran Univ. Brawijaya Malang. p. 11-14.
- Sumarno. 2000. *Karakterisasi Molekuler Protein adhesi Vibrio cholera 01 dan Protein Reseptornya pada Sel Epitel usus halus Tikus Putih (Wistar)*. Studi pathogenesis *Vibrio cholera 01*. Disertasi Program Pasca sarjana Univ. Airlangga Surabaya
- Sumarno., Susanto A., Ismanoe G., 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: 154-160
- Sumarno., Yanuar U., Winarsih S., Islam S & Santoso S. 2012. *Detection of molecule adhesion sub-unit pili 48 kDa Salmonella Typhi by immuno cytochemistry method using sera patients suffering from typhoid fever*. J.Basic. Applied Scient. Res. 2: 8527-8532
- Surjawidjaja, J.E., Salim, O.C., Bukitwetan P., dan Lesmana, M. 2007. *Perbandingan agar MacConkey, Salmonella-Shigella, dan xylose lysine deoxycholate untuk isolasi Shigella dari usap dubur penderita diare*. Universa Medicina, 26 (2): 57-63
- Taylor DN, Trofa AC, Sadoff J, et al. 1993. *Synthesis, characterization, and clinical evaluation of conjugate vaccines composed of the O specific polysaccharides of Shigella dysenteriae type 1, Shigella flexneri type 2a, and Shigella sonnei (Plesiomonas shigelloides) bound to bacterial toxoids*. Infect Immun. 61. 3678-3687
- Tandya S. 2006. *Pperan protein adhesin mycobacterium tuberculosis dalam menginduksi usus dan bronkhiolus mencit Balb/c*. Disertasi. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang (Unplished)
- Talukder, K.A, et al. 2001. *Altering Trends in the Dominance of Shigella flexneri Serotypes and Emergence of Serologically*

Atypical *S. flexneri* Strains in Dhaka, Bangladesh. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, **39** (10): p. 3757–3759

- Todar K. 2012. *Shigella and Shigellosis*. www.textbookofbacteriology.net. Diakses Oktober 2012
- Tortora Gerard J, Funke Berdell R, Case Christine L. 2010. *Microbiology an Introduction*. Tenth edition. Benjamin Cummings
- Torres, A. G. 2004. *Current aspects of Shigella pathogenesis*. Rev Latinoam Microbiol 46(3-4) 89-97.
- Tu G, Cui C, Wang J, Fu B, Zhang W, et al. 1999. *Double-blind field trial of oral live F2a-sonnei (FS) dysentery vaccine*. J Biol Prod. 12. 178–180
- Turbyfill, K.R., Hartman, A.B. and Oaks, E.V. 2000. *Isolation and characterization of a Shigella flexneri invasin complex subunit vaccine*. Infect Immun. 68. 6624–6632.
- Vandepitte J.,and Vorhaegen J.2011. *Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology*, ed 2. Jakarta: EGC
- Veldhoen M., Hirota K., Westendorf A.M. et al. *The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins*. Nature, 2008. 453. 106-9
- Venkatesan Malabi, Hartman Antoine, John N, et al. 2002. *Construction, Characterization, and Animal testing of WRSd1 a Shigella dysenteriae 1 Vaccine*. Infection and Immunity. 70(6). 2950-2958
- Walker W. 2002. *Development of the intestinal mucosal barrier*. J Pediatric gastroenterol Nutr. 34. 33-39
- Wang KX., Denhardt DT. 2008. *Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses*. Cytokine & Growth factor reviews. 19 (5-6). 333-345

- Wang Le, Cao Boyang, Liu Bin, *et al.* 2009. *Molecular detection of all 34 distinct O-antigen forms of shigella.* Journal of Medical Microbiology, 58, 69–81
- WHO. 2005. *Pocket Book of Hospital Care for Children: guidelines for the management of common illnesses with limited resources.* Guidelines
- WHO. 2011. *Diarrhoeal Diseases* .
http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal. di akses pada tanggal 20 Oktober 2011
- Witowski J., Ksiazek K., Jorres A. 2003. *Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses.* CMLS Cell Mol Life Sci. 61. 567-579
- Wilson, J W., Schurr, M.J., LeBlanc, C.L., Ramamurthy, R., Buchanan, K.L., Nickerson, C.A. 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad Med J*; **78**:216–224
- Wilson, M. 2005. *Microbial Inhabitants of Human: Their Ecology and Role in Health and Disease.* Cambridge University Press, United Kingdom.
- Winarsih ., Sumarno., Roekistiningsih.1998. *Fungsi dan sifat immunogenitas protein hemaglutinin 32 kD dan 20 kD pada helicobacter pylori.* Majalah kedokteran Unibraw Malang. 13. 135-141
- Wizemann TM., Adamou JE., Langermann S. 1999. *Adhesins as a target for vaccine development.* Emerg infect Dis. 5 (3). 396-398
- Yang , D. , A. Biragyn , D.M. Hoover , J. Lubkowski , and J.J. Oppenheim . 2004 . *Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense.* Annu. Rev. Immunol. 22 : 181 – 215
- Yang, F., J. Yang, X. Zhang, *et al.* 2005. *Genome dynamics and diversity of Shigella species, the etiologic agents of bacillary dysentery.* Nucleic Acids Res. 33. 6445–6458

- Yoshikawa M. 1999. *Dr. Kiyoshi Shiga: discovery of the dysentery bacillus*. Clin. Infect. Dis. 29. 1303-1306
- Yoshida, Y., Okamura, N., Kato, J., and Watanabe, H. 1991. Molecular cloning and characterization of form I antigen genes of *Shigella sonnei*. *Journal of General Microbiology*, 137: 867-874. Printed in Great Britain
- Yoshida, S., Katayama, E., Kuwae, A. et al. 2002. *Shigella deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization*. EMBO J. 21.2923-2935
- Yoshida, S., Handa, Y., Suzuki, T. et al. 2006. *Microtubulesevering activity of Shigella is pivotal for intercellular spreading*. Science. 314. 985-989
- Yuan Q and Walker W. 2004. *Innate immunity of the gut: mucosal defence in health and disease*. J Pediatric gastroenterol Nutr. 38. 463-472
- Yuliati. 2010. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Propolis Lebah Madu Kelulut (Trigona melina) Asal Kebun Raya Universitas Mulawarman Samarinda (KRUS) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Salmonella typhi dan Klebsiella pneumoniae*. Skripsi Sarjana Universitas Mulawarman Samarinda
- Zasloff, M. 2002. *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. Nature Microbes Infect. 415 : 389 – 395.
- Zhang, Z., M. Zheng, J. Bindas, P. Schwarzenberger, and J. K. Kolls. 2006. *Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis*. Inflamm. Bowel Dis. 12: 382–388.
- Zhou L and Littman DR, 2009. *Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation*. Curr Opin Immunol. 21(2). 146-52
- Zurawski D. V., Mitsuhata K. L, Mummy, B. A, et al. 2006. *OspF and OspC1 are Shigella flexneri type III secretion system effectors that are required for postinvasion aspects of virulence*. Infect. Immun. 74:5964–5976

PATOMEKANISME INFEKSI SHIGELLA

Sebagai Dasar Pengembangan Vaksin Shigellosis

Shigellosis adalah infeksi saluran cerna yang ditandai dengan adanya nyeri pada bagian perut, diare dengan feses disertai darah dan lendir, yang disebabkan oleh bakteri Shigella. Bakteri ini mampu menginvasi epitel sel mukosa usus halus dan berkembang biak di daerah tersebut. Invasi bakteri menyebabkan terjadi infiltrasi sel-sel polimorfonuklear dan menyebabkan matinya sel-sel epitel tersebut, sehingga terjadi tukak-tukak kecil di daerah invasi. Shigellosis sering di temui di negara berkembang seperti Indonesia. Wabah penyakit ini sering kali terjadi di pemukiman yang padat penduduk dan daerah yang kebersihan lingkungannya kurang terjaga.

Patogenesis Shigella merupakan mekanisme yang kompleks. Pada tingkat seluler, invasi bakteri dan penyebaran infeksi dibagi menjadi 4 tahap yaitu 1). invasi sel, 2). multiplikasi intraseluler, 3). penyebaran intraseluler dan interseluler, 4). Penghancuran sel inang. Bakteri masuk ke dalam sel M dengan menginduksi endositosis. Shigella menerobos endocytic vakuola dan menggunakan aktin sitoskeleton sel untuk menyebar dari sel ke sel lainnya, kemudian menyerang sel-sel epitel dan makrofag. Tahap pertama dari inflamasi disebabkan oleh apoptosis makrofag. Dalam sitoplasma Shigella berkembang biak dan menyebabkan kematian sel berikutnya hingga epitelial terinfeksi.

Resistensi *multidrug* merupakan masalah serius dalam pengobatan Shigellosis karena dapat meningkatkan risiko epidemi. Saat ini *World Health Organization* (WHO) memprioritaskan pengembangan vaksin yang efektif dan aman untuk membantu pengendalian Shigellosis terutama di negara-negara berkembang. Buku ini menyampaikan beberapa konsep patomekanisme maupun respon imun Shigella yang dapat menjadi dasar pengembangan vaksin Shigellosis.

ISBN 978-602-750-064-1



9 786024 328689



UB Press

Jl. Veteran No. 10-11 Malang 65145 Indonesia
Gedung INBIS Lt. 3
Telp: (0341) 9081255, 0811 3653 899
Email: ubpress@ub.ac.id, ubpress@gmail.com
Website: <http://ubpress.ub.ac.id/>

*Penerbit Perguruan Tinggi
Terbaik Kelas Dunia*