

Respon Immunogenitas Antibodi Poliklonal IgY terhadap Protein Adhesi Pili 95 kDa *Shigella dysenteriae*

(Immunogenicity Response of IgY Polyclonal Antibody on 95 kDa Pili Adhesion Protein of *Shigella dysenteriae*)

Asihanti Rosita Ferdiana, Enny Suswati, Kristianningrum Dian Sofiana
Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail: asihantirositaferdiana@yahoo.com

Abstract

Shigella dysenteriae is the most frequently cause of deaths of dysentery cases in infants and toddlers. *Shigella dysenteriae* has a pili that act as an adhesin molecule and will detect in human body as antigens which is involved in producing antibodies. This study was conducted to prove that *Shigella dysenteriae* pili adhesion protein 95 kDa is immunogenic. This was an experimental laboratory study with quasy experimental design in vitro. The study began with mice erythrocyte cell isolation, IgY polyclonal antibodies isolation, mice intestinal enterocytes cell isolation, hemagglutination inhibition test, and adhesion inhibition test. The haemagglutination inhibition test showed that the pili adhesion protein 95 kDa of *S. dysenteriae* able to inhibit the haemagglutination of erythrocytes mice Balb/C up to ½ dilution. While, the adhesion inhibition test revealed that the fewer of antibody concentration on enterocytes, the greater bacteria attached. According to the linear regression test results, the index adhesion value increased along with the decreased of antibody concentration. In conclusion, pili adhesion protein 95 kDa from *S. dysenteriae* was immunogenic and could inhibit the hemagglutination and adhesion between *S. dysenteriae* and mice enterocytes cells.

Keywords: immunogenicity, IgY polyclonal antibody, *Shigella dysenteriae*, pili adhesion protein.

Abstrak

Shigella dysenteriae merupakan penyebab kematian paling banyak pada kasus disentri pada bayi dan balita. *Shigella dysenteriae* memiliki pili yang berperan sebagai molekul adhesin yang dideteksi tubuh sebagai antigen, sehingga berperan dalam menghasilkan antibodi. Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan bahwa protein adhesi pili *Shigella dysenteriae* 95 kDa bersifat imunogenik. Jenis penelitian ini adalah eksperimen laboratorium dan menggunakan desain eksperimen semu (*quasy experimental design*) secara *in vitro*. Tahapan penelitian dimulai dengan isolasi sel eritrosit mencit Balb/c, isolasi antibodi poliklonal IgY, isolasi sel enterosit usus mencit Balb/c, uji hambat hemaglutinasi, dan uji hambat adhesi. Hasil uji hambat hemaglutinasi didapatkan bahwa antibodi poliklonal IgY mampu menghambat hemaglutinasi sampai kadar pengenceran ½. Sedangkan pada uji hambat adhesi didapatkan hasil bahwa, semakin sedikit jumlah antibodi poliklonal yang diberikan pada sel enterosit, maka akan semakin banyak bakteri yang menempel. Hal ini sesuai dengan hasil uji statistika regresi linier bahwa nilai indeks adhesi meningkat sesuai dengan penurunan konsentrasi antibodi yang diberikan. Kesimpulan dari penelitian ini adalah protein adhesi pili 95 kDa dari *S. dysenteriae* bersifat imunogenik yang mampu menghambat hemaglutinasi dan menghambat adhesi antara bakteri *S. dysenteriae* pada sel enterosit mencit.

Kata kunci: imunogenitas, antibodi poliklonal IgY, *Shigella dysenteriae*, protein adhesi pili.

Pendahuluan

Diare merupakan penyebab utama kematian bayi dan balita di Negara berkembang. Sekitar 15% dari seluruh kasus kematian balita akibat diare di seluruh dunia adalah disentri yang disebabkan oleh *Shigella sp.*[1]. Di Indonesia, *surveillance* yang pernah dilaksanakan di Jakarta periode Februari 2005 sampai September 2007 pada anak usia 0-14 tahun menemukan bahwa 63,2% pasien diare adalah akibat infeksi *Shigella sp. (Shigellosis)* [2]. Invasi bakteri *Shigella* pada epitel usus dapat diperantarai oleh pili yang ada pada permukaan dinding bakteri. Bakteri kemudian menempel dan membuat koloni pada epitel usus yang akhirnya akan menimbulkan manifestasi klinis pada penderita. Untuk mengkonfirmasi hal tersebut diperlukan adanya pembuktian bahwa protein sub-unit pili bakteri *Shigella dysenteriae* merupakan molekul adhesin dari bakteri. Protein adhesi dideteksi tubuh sebagai antigen dan akan berperan dalam menginduksi respon imun untuk menghasilkan antibodi.

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan bahwa protein adhesi pili *Shigella dysenteriae* dengan berat molekul 95 kDa bersifat imunogenik yakni mampu menginduksi pembentukan antibodi setelah terpapar antigen. Dalam penelitian ini digunakan ayam petelur jenis Lohmann sebagai penghasil antibodi poliklonal IgY dengan cara menyuntikkan protein adhesi pili *Shigella dysenteriae* secara subkutan. Antibodi poliklonal yang telah terbentuk selanjutnya dideteksi melalui kuning telur ayam dan diuji hambat hemaglutinasi serta uji hambat adhesi bakteri *Shigella dysenteriae*.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *quasy eksperimental design* yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Tahapan penelitian dimulai dengan isolasi antibodi poliklonal IgY dari kuning telur ayam yang telah disuntikkan antigen pili *S. dysenteriae* secara subkutan pada sayap ayam bawah sebanyak 120 µl. Suntikan yang pertama dicampur dengan *complete Freud's adjuvant*. Suntikan kedua dan selanjutnya dicampur dengan *incomplete Freud's adjuvant* dengan selang waktu satu minggu. Telur dipanen setelah suntikan *booster* yang keempat pada hari kelima sampai hari ketujuh belas [3].

Metode selanjutnya adalah isolasi eritrosit mencit Balb/c. Eritrosit didapatkan dari vena jantung tikus yang kemudian disentrifugasi dan ditambahkan PBS untuk mendapatkan eritrosit murni [4].

Selanjutnya, dilakukan isolasi sel enterosit mencit Balb/c yang diambil dari bagian usus halus tikus [5]. Sel eritrosit yang telah diisolasi kemudian akan diuji hambat hemaglutinasinya [6], sedangkan sel enterosit usus mencit Balb/c yang telah diisolasi akan diuji hambat adhesi [7]. Pada uji hambat hemaglutinasi dan uji hambat adhesi masing-masing ditambahkan isolasi protein antibodi poliklonal dengan konsentrasi bertingkat. Data dari uji indeks adhesi ini kemudian akan dianalisa menggunakan metode regresi linier.

Hasil Penelitian

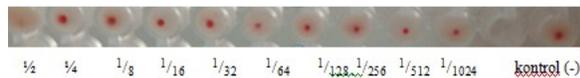
Uji hambat hemaglutinasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan antibodi poliklonal IgY pili *Shigella dysenteriae* 95 kDa dalam menghambat proses hemaglutinasi eritrosit. Pada penelitian ini digunakan sampel eritrosit mencit galur Balb/c yang kemudian diuji dalam mikroplate V. Hasil uji hambat hemaglutinasi dinyatakan positif jika tidak terbentuk endapan berupa dot (titik) pada ujung mikroplate setelah diinkubasi dalam waktu tertentu. Adapun hasil uji hambat hemaglutinasi disajikan dalam Tabel 1 berikut.

Tabel 1. Hasil uji hambat hemaglutinasi antibodi poliklonal IgY protein adhesi pili 95 kDa *Shigella dysenteriae*

	Pengenceran antibodi poliklonal IgY									
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
Hambat Hemaglutinasi	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan:
 (+): hambat hemaglutinasi positif (tidak terjadi hemaglutinasi)
 (-): hambat hemaglutinasi negatif (terjadi hemaglutinasi)

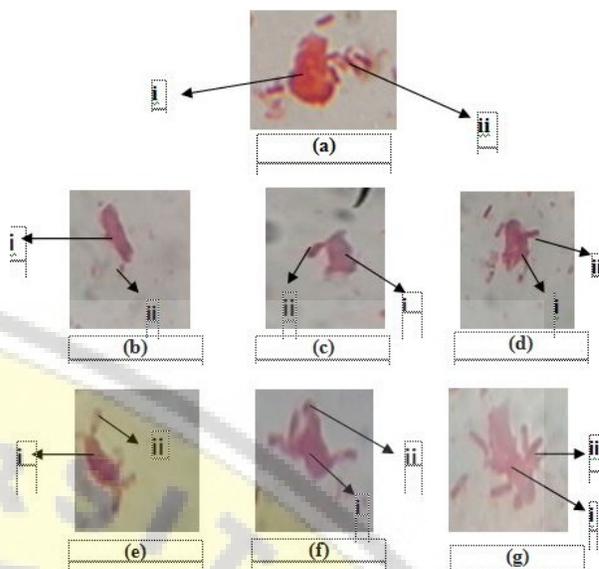
Dari tabel 1 dapat diketahui bahwa protein adhesi pili 95 kDa mampu menghambat proses hemaglutinasi eritrosit mencit Balb/c sampai pada pengenceran $\frac{1}{2}$ seperti juga terlihat pada Gambar 1 berikut.



Gambar 1. Hasil Uji Hambat Hemaglutinasi Eritrosit Mencit

Uji hambat adhesi merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan antibodi poliklonal IgY pili *Shigella dysenteriae* 95 kDa dalam menghambat proses adhesi antara bakteri *Shigella dysenteriae* dengan sel enterosit mencit Balb/c. Dalam penelitian ini, protein antibodi poliklonal dicampurkan dengan enterosit mencit galur Balb/c yang sebelumnya telah diisolasi. Antibodi ini diberikan dengan dosis bertingkat mulai konsentrasi 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, dan $\frac{1}{32}$ serta dosis 0 (tanpa protein antibodi) sebagai kontrol negatif. Hasil dinyatakan dalam indeks adhesi yaitu jumlah rata-rata bakteri yang melekat pada sel enterosit yang dihitung dalam 100 sel dengan tiga kali pengulangan.

Adapun gambaran uji hambat adhesi dimulai dari konsentrasi 0 sebagai kontrol negatif, tampak pada Gambar 2(a) dan dilanjutkan dengan konsentrasi terbesar antibodi sampai konsentrasi terkecil ditampilkan pada Gambar 2(b) sampai 2(g) sebagai berikut.



(i) sel enterosit ; (ii) bakteri *S.dysenteriae*

(a) Hambat Adhesi dengan konsentrasi antibodi poliklonal IgY 0 (kontrol (-))

(b) Hambat Adhesi dengan konsentrasi antibodi poliklonal IgY 1

(c) Hambat Adhesi dengan konsentrasi antibodi poliklonal IgY $\frac{1}{2}$

(d) Hambat Adhesi dengan konsentrasi antibodi poliklonal IgY $\frac{1}{4}$

(e) Hambat Adhesi dengan konsentrasi antibodi poliklonal IgY $\frac{1}{8}$

(f) Hambat Adhesi dengan konsentrasi antibodi poliklonal IgY $\frac{1}{16}$

(g) Hambat Adhesi dengan konsentrasi antibodi poliklonal IgY $\frac{1}{32}$

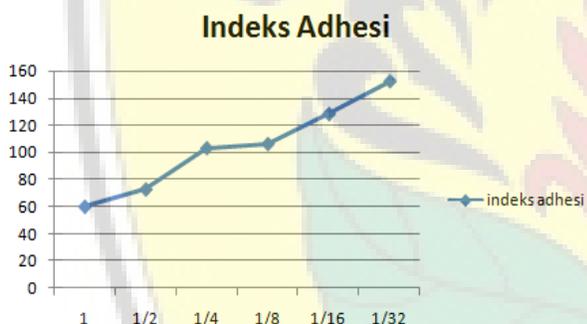
Gambar 2. Uji Hambat Adhesi *S.dysenteriae* pada Sel Enterosit Mencit Perbesaran 1000 kali

Peranan antibodi poliklonal yang berasal dari pili *S. dysenteriae* 95 kDa dalam menghambat perlekatan bakteri terlihat pada gambar diatas. Tidak adanya perlekatan bakteri pada sel enterosit mencit galur Balb/c setelah diberikan protein antibodi poliklonal menunjukkan bahwa antibodi tersebut mampu menghambat bakteri untuk melakukan perlekatan. Sementara itu, hasil perhitungan indeks adhesi bakteri *S. dysenteriae* dapat dilihat pada Tabel 2 berikut.

Tabel 2. Hasil perhitungan indeks adhesi *S. dysenteriae* pada enterosit mencit galur Balb/c dengan menggunakan protein pili berat molekul 95 kDa.

Indeks Adhesi							
Konsentrasi	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	0
Ulangan I	72	87	107	112	136	166	183
Ulangan II	42	58	82	98	110	128	191
Ulangan III	66	73	98	100	120	138	176
Rata-rata	60	72,67	102,5	106	128	152	183,3

Dari hasil penghitungan indeks adhesi diperoleh data bahwa semakin kecil konsentrasi antibodi poliklonal yang diberikan, maka semakin banyak jumlah bakteri *S. dysenteriae* yang melekat, dengan kata lain indeks adhesi meningkat, demikian sebaliknya. Hubungan ini dapat dilihat melalui grafik pada Gambar 3 berikut.



Gambar 3. Diagram Indeks Adhesi *S. dysenteriae* pada Sel Epitel Usus Mencit dengan Menggunakan Protein Pili 95 kDa

Selanjutnya, untuk mengetahui tingkat kekuatan hubungan antara antibodi poliklonal dengan indeks adhesi dilakukan analisis menggunakan regresi linier. Berdasarkan analisis regresi linier, didapatkan nilai *R square* sebesar 0,783. Sementara pada analisis dengan uji Anova^b untuk mengetahui bentuk hubungan kedua variabelnya didapatkan nilai Sig. = 0.019.

Pembahasan

Hasil uji hambat hemaglutinasi menunjukkan bahwa antibodi poliklonal IgY

yang terbentuk mampu menghambat hemaglutinasi sampai pengenceran 1/2, sementara pada pengenceran selanjutnya dimana konsentrasi antibodi poliklonal semakin kecil menunjukkan hasil negatif yang berarti bahwa terjadi hemaglutinasi pada eritrosit.

Eritrosit memiliki protein hemaglutinin yang berfungsi mengikat eritrosit dengan eritrosit yang lainnya sehingga terjadi hemaglutinasi. Pada uji hambat hemaglutinasi, proses terhambatnya hemaglutinasi ini diperantarai oleh antibodi poliklonal yang berperan mengikat protein hemaglutinin sehingga antara eritrosit satu dengan lainnya tidak mampu berikatan. Uji ini merupakan langkah awal sebelum melakukan uji hambat adhesi. Hasil positif dari uji ini membuktikan bahwa di dalam kuning telur terdapat antibodi yang berasal dari protein adhesi pili 95 kDa *S. dysenteriae*. Antibodi inilah yang akan diuji lebih lanjut mengenai kemampuannya dalam menghambat proses adhesi (perlekatan) antara sel enterosit dan bakteri *S. dysenteriae*.

Sementara itu, pada uji hambat adhesi yang dilakukan terbagi menjadi tujuh perlakuan konsentrasi antibodi yaitu pengenceran 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, serta kelompok kontrol negatif dengan konsentrasi antibodi sebesar 0 (tanpa protein antibodi). Antibodi yang digunakan dalam kelompok kontrol negatif merupakan isolasi kuning telur ayam yang belum disuntikkan antigen pili *S. dysenteriae* 95 kDa atau disebut juga sebagai antibodi preimun. Sementara itu, antibodi yang digunakan dalam kelompok perlakuan merupakan antibodi yang dihasilkan dari kuning telur ayam setelah disuntikkan antigen pili *S. dysenteriae* 95 kDa.

Dari seluruh antibodi yang terbentuk, baik kelompok kontrol negatif maupun perlakuan, selanjutnya akan ditambahkan pada sel enterosit mencit Balb/c yang telah diisolasi. Selanjutnya, campuran antara sel enterosit dan antibodi ini direaksikan dengan bakteri *S. dysenteriae*. Dari perlakuan ini, diharapkan akan terjadi hambatan ikatan antara reseptor bakteri *S. dysenteriae* dengan reseptor sel enterosit. Hal ini dikarenakan antibodi yang diberikan akan mengikat bakteri *S. dysenteriae* sehingga menghalangi perlekatan pada sel enterosit sehingga menyebabkan proses adhesi yang merupakan proses awal infeksi *S. dysenteriae* tidak terjadi. Mekanisme inilah yang kemudian mendasari dilakukannya uji hambat adhesi, dimana ikatan antigen antibodi yang terbentuk

merupakan mekanisme utama dalam pengujian ini.

Pada Gambar 2(a) yang merupakan perlakuan kontrol negatif dengan konsentrasi antibodi 0, karena berasal dari isolasi kuning telur ayam yang belum diimunisasi oleh antigen *S. dysenteriae*, tampak bahwa jumlah bakteri yang melekat lebih banyak daripada kelompok perlakuan yang mendapatkan tambahan antibodi. Hal ini terjadi dikarenakan belum terbentuknya antibodi poliklonal terhadap bakteri *S. dysenteriae* oleh karena tidak diimunisasi dengan antigen pili *S. dysenteriae* 95 kDa sehingga tidak ada yang melindungi sel enterosit terhadap paparan bakteri, dan bakteri dapat menempel semuanya pada enterosit. Dari gambar tersebut dapat diamati pula bahwa bakteri melekat hampir merata pada semua sisi sel enterosit yang merupakan tempat interaksi reseptor bakteri.

Sementara itu, pada perlakuan dengan pemberian konsentrasi antibodi poliklonal secara bertingkat seperti tampak pada Gambar 2(b) sampai Gambar 2(g) menunjukkan bahwa jumlah bakteri yang melekat semakin meningkat sesuai dengan penurunan konsentrasi antibodi yang diberikan. Pada Gambar 2(b) yang merupakan perlakuan dengan pemberian konsentrasi antibodi terbesar menunjukkan bahwa jumlah bakteri yang melekat paling sedikit jika dibandingkan dengan perlakuan yang lainnya. Hal ini dikarenakan banyaknya jumlah antibodi yang mengikat bakteri *S. dysenteriae* sehingga ketika sel enterosit direaksikan dengan bakteri *S. dysenteriae* maka jumlah bakteri yang dapat melekat adalah sebanding dengan jumlah bakteri tersisa yang belum diikat oleh antibodi.

Data indeks adhesi ini kemudian diolah dengan menggunakan regresi linier dan didapatkan nilai R square sebesar 0,783. Hal ini berarti sebesar 78,3% dari nilai indeks adhesi dipengaruhi oleh variabel besarnya konsentrasi protein antibodi poliklonal yang diberikan, sedangkan sisanya dipengaruhi oleh faktor lain diluar konsentrasi protein antibodi poliklonal. Sementara pada analisis dengan uji Anova^b didapatkan nilai Sig. = 0.019 yang menunjukkan bahwa terdapat hubungan signifikan antara besarnya konsentrasi antibodi poliklonal IgY dari protein adhesi pili 95 kDa *S. dysenteriae* dengan indeks adhesi bakteri *S. dysenteriae* pada sel enterosit.

Simpulan dan Saran

Protein adhesi pili dengan berat molekul 95 kDa dari *S. dysenteriae* bersifat imunogenik yang berperan dalam menghasilkan antibodi poliklonal IgY dan terbukti dapat menghambat hemaglutinasi eritrosit mencit Balb/c serta menghambat adhesi bakteri *S. dysenteriae* pada sel enterosit mencit Balb/c.

Perlu penelitian lanjutan tentang potensi imunogenik antibodi poliklonal IgY dari protein adhesi pili dengan berat molekul 95 kDa *S. dysenteriae* dengan metode *western blotting*, serta diperlukan uji secara *in vivo* untuk mengetahui potensi imunogenik dari protein adhesi pili 95 kDa *S. dysenteriae*.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi sebagai institusi penyanggah dana dalam penelitian ini.

Daftar Pustaka

- [1] World Health Organization. Guidelines for the control of shigellosis. Geneva: World Health Organization. 2005.
- [2] Herwana E, Surjawidjaja J E, Salim OC, Indriani N, Bukitwetan P, Lesmana M. Shigella-associated diarrhea in children in South Jakarta, Indonesia. Southeast Asian J Trop Med Publ Health [Internet]. 2010 [cited 2013 Jul 17];41(2): 418-95. Available from: <http://www.tmmahidol.ac.th/seameo/20-41-2/20-4601>.
- [3] Chung S S, Yu JH, Bai DH, Hester PH. Antibodies to Alfa Subunit of Insulin Receptor from Eggs of Immunized Hens. J Immune 1985; 135: 3354-3359.
- [4] Li X, Johnson ED, Mobley TLH. Requirement of MrpH for Mannosa Resistent Proteus Like Fimbriae Mediated Hemagglutination by Proteus Mirabilis. Infection and Immunity 1999; 67: 2822-2833.
- [5] Nagayama K, Oguchi T, Arita M, Honda T. Purification and characterization of a cell-associated hemagglutinin of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect Immun 1995; 63 (5):1987-1992.
- [6] Satwikaputra BD. Respon Imunogenitas Poliklonal Antibodi IgY Terhadap Protein

Adhesi Pili 45 kDa *Proteus Mirabilis*. Tidak Dipublikasikan. Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember. 2010.

[7] Sumarno. Karakterisasi Molekuler Protein Adhesi *Vibrio Cholera* 01 M094V

dan Protein Reseptornya pada Sel Epitel Usus Halus Tikus Putih, Studi Patogenitas *V. cholera* 01 M094V. Surabaya: Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. 2000.

