



**EFEK IMUNISASI INTRANASAL EPITOPE PROTEIN RrgB 214-236
Streptococcus pneumoniae TERHADAP KONSENTRASI IL-4**

SKRIPSI

Oleh
Niken Larasati
NIM 1620101037

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2020**



**EFEK IMUNISASI INTRANASAL EPITOPE PROTEIN RrgB 214-236
Streptococcus pneumoniae TERHADAP KONSENTRASI IL-4**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

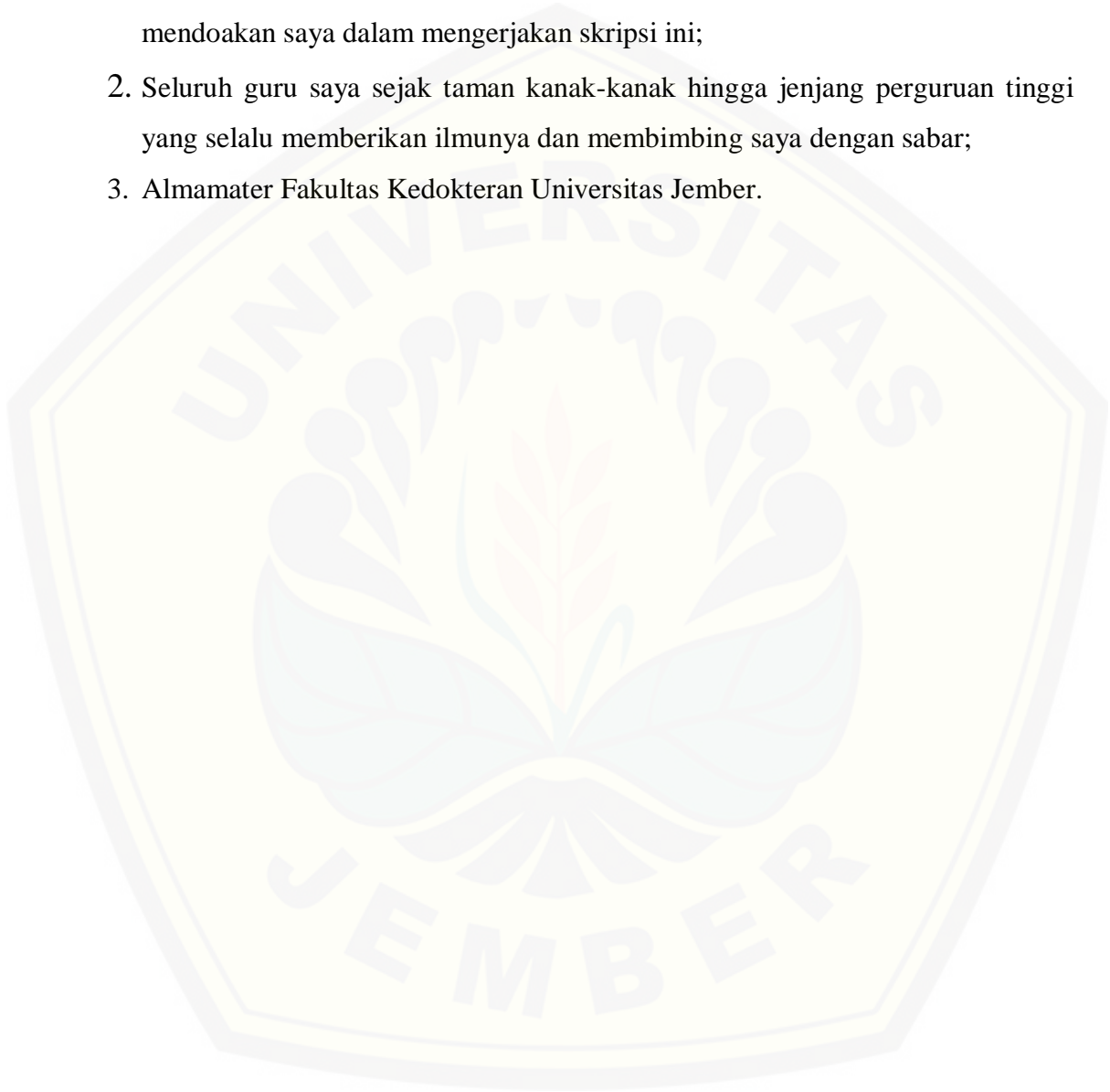
Oleh

**Niken Larasati
NIM 162010101037**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019
PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Orang tua saya, Ibu Sofiah dan Alm. Bapak Basuki serta kakak saya Dian Purwoko dan Danang Setyo Budi Baskoro yang telah mendukung dan mendoakan saya dalam mengerjakan skripsi ini;
2. Seluruh guru saya sejak taman kanak-kanak hingga jenjang perguruan tinggi yang selalu memberikan ilmunya dan membimbing saya dengan sabar;
3. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



MOTO

Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat.
(terjemahan Surat *Al-Mujadalah* ayat 11)^{*)}¹



PERNYATAAN

^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Semarang: PT. Kumudasmoro Grafindo.

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Niken Larasati

NIM : 162010101037

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul "Efek Imunisasi Intranasal Epitope Protein RrgB 214-236 *Streptococcus pneumoniae* terhadap Konsentrasi IL-4" ialah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali beberapa kutipan yang telah saya ambil dan telah saya cantumkan sumbernya, belum pernah diajukan kepada institusi manapun, dan bukan hasil plagiasi. Saya bertanggung jawab atas kebenaran isi karya tulis ilmiah saya dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta saya bersedia mendapatkan sanksi apabila ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember,

Yang menyatakan,

Niken Larasati

NIM 162010101037

SKRIPSI

**EFEK IMUNISASI INTRANASAL EPITOPE PROTEIN RrgB 214-236
Streptococcus pneumoniae TERHADAP KONSENTRASI IL-4**

oleh:

Niken Larasati

162010101037

Pembimbing

Dosen Pembimbing 1 : Dr. dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes.

Dosen Pembimbing 2 : dr. Cholis Abrori, M.Kes.Ked.

PENGESAHAN

Skripsi dengan judul “Efek Imunisasi Intranasal Epitope Protein RrgB 214-236 *Streptococcus pneumoniae* terhadap Konsentrasi IL-4” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat :

Tim Penguji,

Ketua

Anggota I

Dr.rer.biol.humdr. Erma Sulistyaningsih, M.Si
NIP 197702222002122001

dr. Septa Surya Wahyudi, Sp.U
NIP 197802222005011002

Anggota II

Anggota III

Dr. dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes
NIP 197203182003122001

dr. Cholis Abrori, M.Kes., M.Pd.Ked
NIP 19710521198031003

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dr. Supangat, M.Kes., Ph.D., Sp. BA
NIP 197304241999031002

RINGKASAN

Efek Imunisasi Intranasal Epitope Protein RrgB 214-236 *Streptococcus pneumoniae* terhadap Konsentrasi IL-4; Niken Larasati, 162010101037; 2020; 48 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Streptococcus pneumoniae adalah bakteri diplokokus Gram positif yang dapat menjadi patogen bagi manusia dan menyebabkan *invasive pneumococcal disease*. Infeksi *S. pneumoniae* menular melalui droplet udara dan salah satu pencegahannya adalah menggunakan vaksin. Vaksin *S. pneumoniae* yang sedang dikembangkan saat ini berasal dari faktor virulensi bakteri, seperti epitope. Epitope yang digunakan sebagai kandidat vaksin dalam penelitian ini adalah epitope protein RrgB *S. pneumoniae*. Epitope tersebut akan merangsang sistem imun untuk mensekresi antibodi yang diperantarai oleh IL-4. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek imunisasi intranasal epitope protein RrgB 214-236 *S. pneumoniae* terhadap kadar IL-4. .

Penelitian ini merupakan penelitian *true* eksperimental dengan menggunakan 27 ekor tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan, dengan usia 12-16 minggu. Sampel dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol, kelompok adjuvan dan kelompok epitope1+adjuvan. Kelompok kontrol diberikan 20 μ L PBS secara intranasal, kelompok adjuvan diberikan 2 μ L CTB yang dilarutkan dalam 40 μ L PBS, dan kelompok epitope1+adjuvan diberikan 2 μ L CTB, 20 μ L epitope protein RrgB 255-270 *S. pneumoniae* yang dilarutkan dalam 40 μ L PBS. Pengukuran kadar IL-4 menggunakan metode ELISA dan dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Nilai rerata kadar IL-4 pada kelompok kontrol adalah 36.843 ± 25 ng/L, rerata kadar IL-4 pada kelompok adjuvan adalah 27.702 ± 11 ng/L dan rerata pada kelompok epitope1+adjuvan adalah 30.554 ± 15 ng/L. Uji Kruskal-Wallis menunjukkan nilai p sebesar 0,919. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian imunisasi intranasal epitope protein RrgB 255-270 *S. pneumoniae* tidak memberikan perbedaan yang signifikan terhadap kadar IL-4 (dengan $p > 0,05$). Hal ini dapat disebabkan sistem imun menghasikan antibodi mukosa seperti IgA. Produksi antibodi IgA diperantarai oleh IL-4. Tingginya kadar IgA mempengaruhi kadar IL-4 dalam tubuh. Sehingga tubuh akan melakukan *down regulation* dalam produksi atau sekresi IL-4

PRAKATA

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala karunia dan rahmat-Nya sehingga peneliti dapat dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Efek Imunisasi Intranasal Epitope Protein RrgB 214-236 *Streptococcus pneumoniae* terhadap Konsentrasi IL-4”. Karya ilmiah ini disusun guna melengkapi tugas akhir dan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan Pendidikan di Fakultas Kedokteran Universitas Jember (S1).

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih banyak kepada:

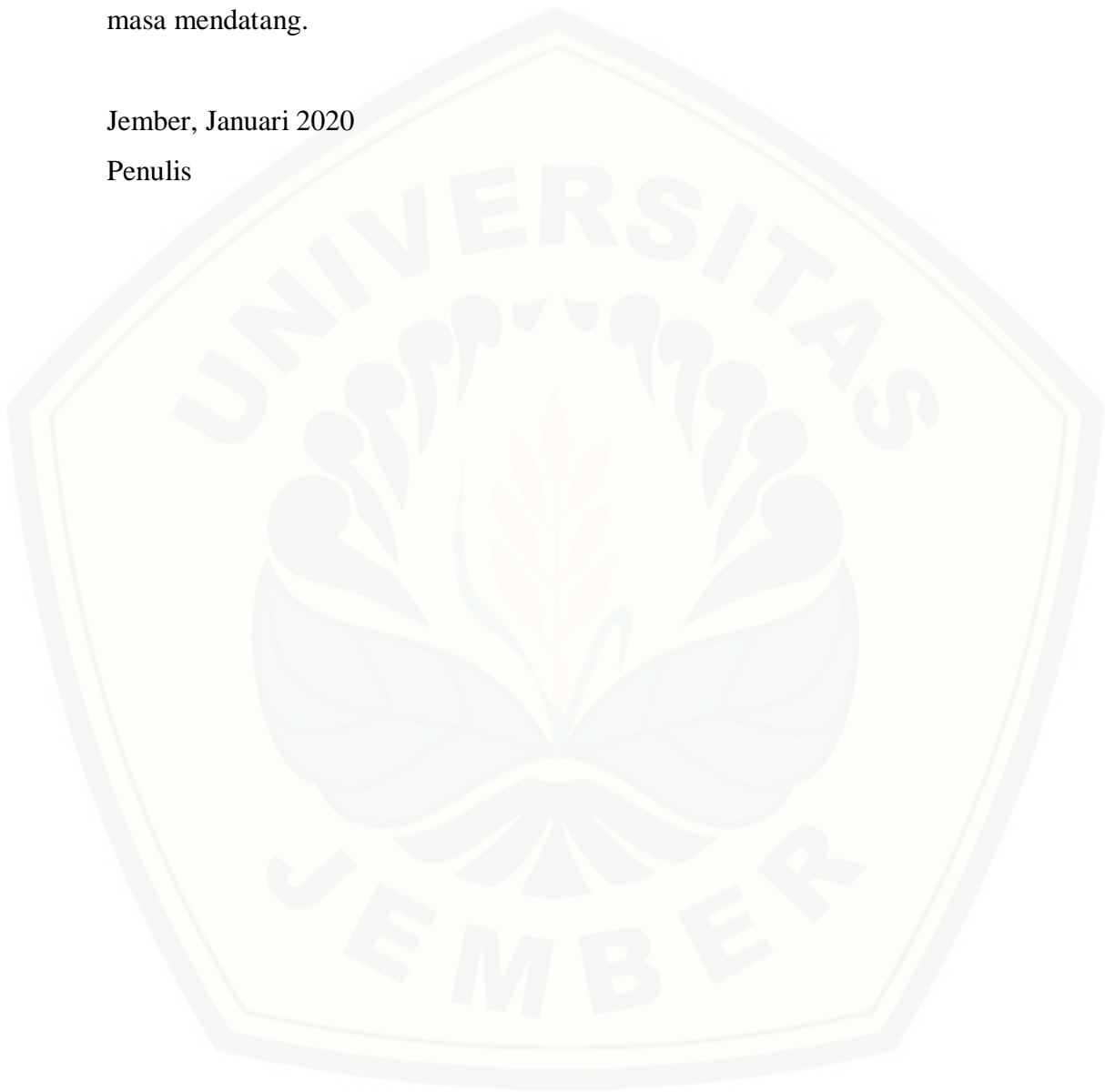
1. dr. Supangat, M.Kes.,Ph.D.,Sp. BA selaku Dekan Fakultas Kedokteran, Universitas Jember;
2. dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes., selaku dosen pembimbing utama, dr. Cholis Abrori, M.Kes.,M.Pd.Ked selaku dosen pembimbing anggota, Dr.rer.biol.humdr. Erma Sulistyaningsih, M.Si selaku dosen penguji utama, dan dr. Septa Surya Wahyudi, Sp.U selaku dosen penguji anggota yang telah meluangkan waktu untuk membimbing dan membina saya dalam mengerjakan skripsi ini;
3. Lilis Lestari, Lilik Maslian, dan Nurul Istinaroh yang telah membantu saya dalam melakukan penelitian ini baik dalam perlakuan maupun penghitungan kadar IL-4 dengan metode ELISA;
4. kedua orang tua saya Bapak Alm. Basuki dan Ibu Sofiah yang senantiasa memberikan dukungan dan merawat serta mendidik saya sampai sekarang;
5. kedua kakak saya Dian Purwoko dan Danang Setyo Budi Baskoro yang senantiasa memberikan doa dan semangat;
6. teman saya Danang Tejamukti W. yang mengerjakan penelitian bersama saya;
7. sahabat saya Nurlita Halisyah, Ajeng Eka Putri, Siti Marisa Aisyah, Sus Faradila, Safira Geta, Lailatis Shofia, Fathihah Ulil yang mendukung dan menyemangati saya dalam menyusun skripsi ini;
8. seluruh teman-teman seangkatan dan seperjuangan 2016 (LIGAMEN);

9. seluruh staf dan karyawan Dekanat Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini, penulis berharap agar tulisan ini dapat bermanfaat di masa mendatang.

Jember, Januari 2020

Penulis





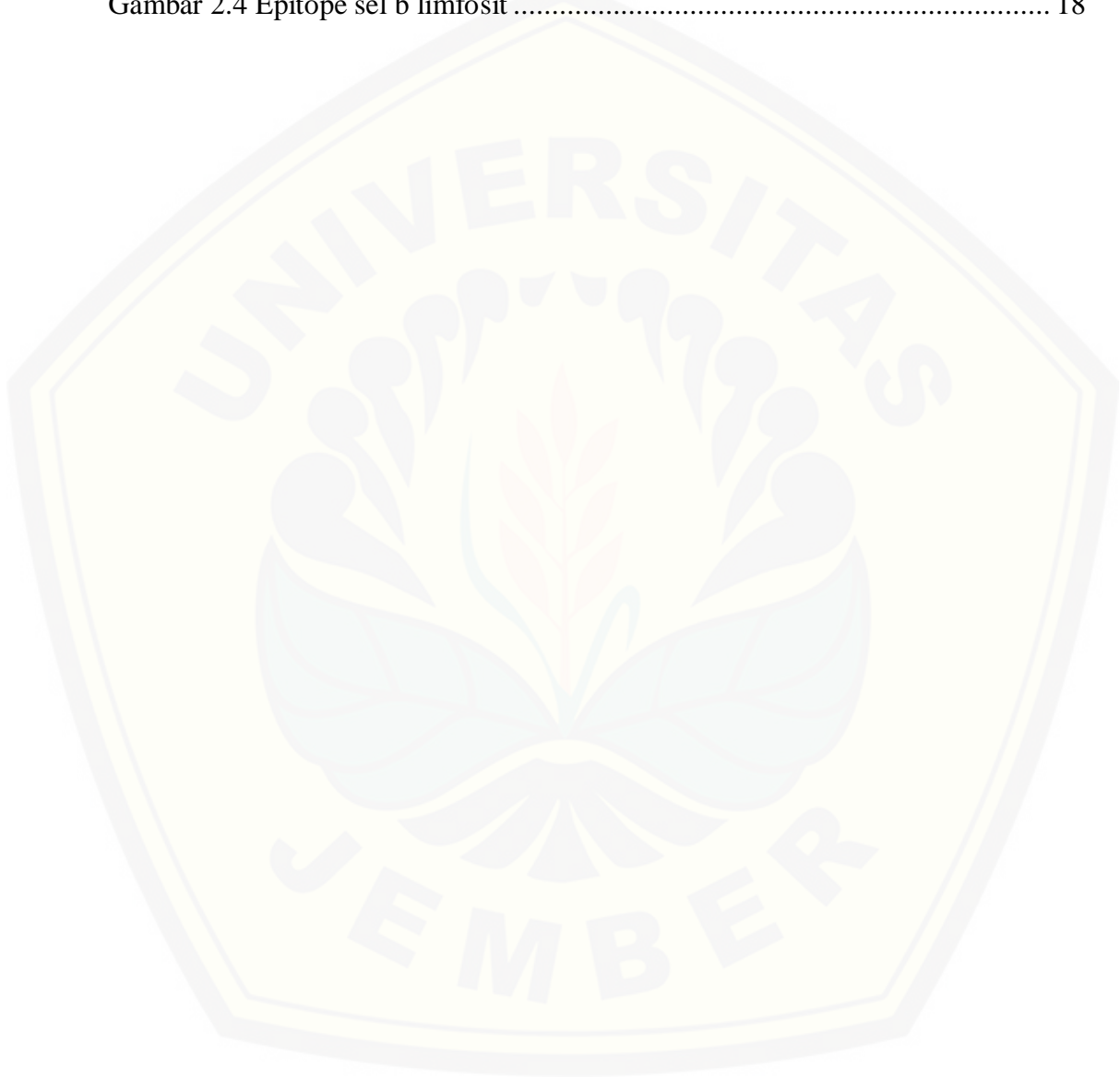
.DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Perbedaan antara PPV-23 dan PVC	Halaman 14
---	---------------



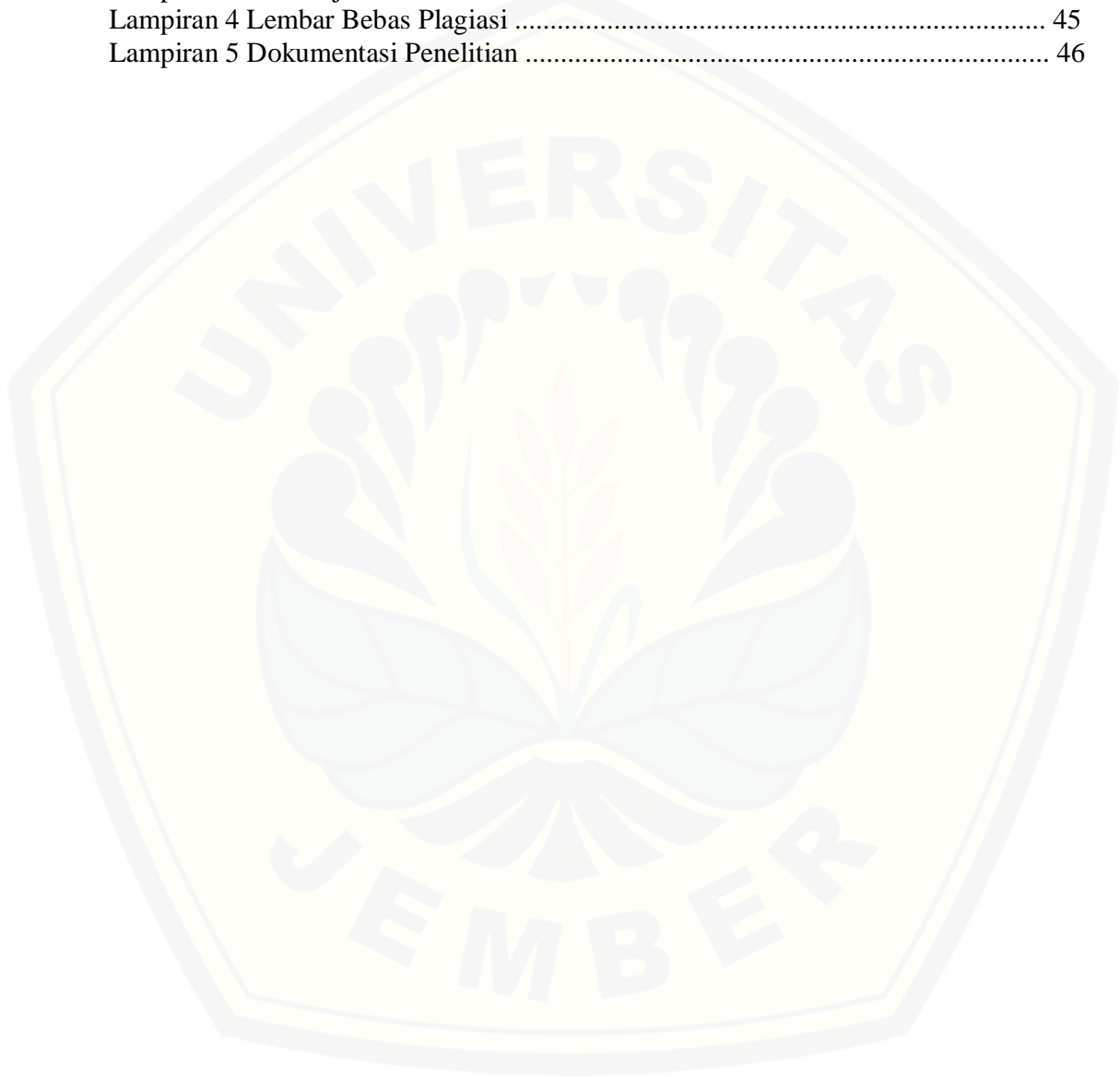
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Morfologi bakteri <i>S. pneumoniae</i>	5
Gambar 2.2 Struktur pili bakteri <i>S. pneumoniae</i>	10
Gambar 2.3 Ilustrasi pili-1.	10
Gambar 2.4 Epitope sel b limfosit	18



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 <i>Ethical Clearance</i>	40
Lampiran 2 Surat Ijin Penelitian	43
Lampiran 3 Hasil Uji Statistik	44
Lampiran 4 Lembar Bebas Plagiasi	45
Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian	46



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) atau *Pneumococcus* adalah bakteri diplokokus Gram positif yang merupakan flora normal pada nasofaring dan mempunyai lebih dari 90 serotipe. *S. pneumoniae* dapat menjadi patogen bagi manusia dan menyebabkan *invasive pneumococcal disease*, yaitu sekelompok penyakit seperti pneumonia, sinusitis akut, otitis media akut, konjungtivitis, meningitis, osteomyelitis, septic arthritis, endocarditis, peritonitis, selulitis, dan abses otak. Pneumonia memiliki angka mortalitas dan morbiditas tinggi di negara berkembang. *World Health Organization* (WHO) melaporkan bahwa *S. pneumoniae* setiap tahunnya menyebabkan kematian 1.612.000 anak di dunia dan 716.000 anak diantaranya berusia di bawah lima tahun. Dua puluh enam persen kematian tersebut diperkirakan terjadi di negara Asia Pasifik dan Asia Tenggara. (Kadioglu *et al.*, 2008; Pletz *et al.*, 2008; Khoeri, *et al.*, 2016).

Infeksi *S. pneumoniae* menular melalui droplet di udara. Keadaan kering dan dingin mempercepat penularan infeksi *S. pneumoniae*. Tahap awal infeksi *S. pneumoniae* adalah dengan menempelnya bakteri ke sel inang yang diperantarai oleh protein adhesi dan reseptor. Pili memegang peran penting dalam penempelan bakteri pada sel inang dan didukung oleh protein-protein yang ada pada bakteri. Pili *S. pneumoniae* terdiri atas tiga protein, yaitu RrgA, RrgB, RrgC yang dipolimerisasi oleh tiga enzim sortase (SrtC1, SrtC2, dan SrtC3) melalui pembentukan antarmolekul kovalen ikatan isopeptida. Masing-masing protein tersebut memiliki fungsi yang berbeda. RrgA berfungsi sebagai jangkar atau dasar pili, RrgB sebagai badan pili, dan RrgC sebagai ujung pili. RrgB memiliki komponen antigen yang lebih tinggi daripada RrgA dan RrgC. Struktur RrgB terdiri dari D1, D2, D3, D4 (Gentile *et al.*, 2011; Mufida *et al.*, 2018; Weiser *et al.*, 2018).

Pada penelitian terdahulu menyebutkan bahwa protein 54 kDa merupakan protein hemagglutinin. Protein tersebut dapat meningkatkan imunitas mukosa saluran pernafasan melalui peningkatan kadar sIgA. Secara *in silico* protein

54 kDa identik dengan *chain α structure of pilus from S. pneumoniae* (RrgB). Protein RrgB *S. pneumoniae* memiliki 5 epitope dengan panjang asam amino 13, 14, 19, 16, 23. Susunan rantai peptida dan 5 asam amino yang terdapat pada pili tersebut yaitu DRAVAAYNALTAQ, PKVVITYGKKFVKVN, TFDLVNAQAGKVVQTVTLT, TVKVTVDDVALEAGDY, dan VNHQVGDVVEYEIVTKIPALANY. Epitop protein RrgB memiliki kemampuan antigenik yang tinggi sehingga berpotensi besar untuk digunakan sebagai vaksin (Mufida *et al.*, 2018).

Vaksin yang telah digunakan untuk melawan bakteri *S. pneumoniae* saat ini adalah *Pneumococcal Polysaccharide Vaccine* (PPV) 23 valen dan *Pneumococcal Conjugates Vaccine* (PCV). Vaksin PPV 23 merupakan subunit vaksin yang menginduksi respon imun melalui *T independent*, sehingga tidak bisa digunakan pada usia anak kurang dari 2 tahun karena respon imun *T independent* pada anak usia tersebut belum matur. Kelemahan vaksin ini dapat diatasi dengan menggunakan *Pneumococcal Polysaccharide Conjugate Vaccine* (PCV). *Pneumococcal Polysaccharide Conjugate Vaccine* memiliki potensi yang tinggi (88,4%) dalam mencegah IPD. Namun, PCV hanya melindungi dari beberapa serotipe *S. pneumoniae*. Sehingga perlu dikembangkan vaksin menggunakan salah satu faktor virulensi bakteri yaitu epitope protein hemaglutinin pili (*epitope-based vaccine*). Epitope protein hemaglutinin pili diharapkan lebih efektif sebagai kandidat antigen vaksin karena epitope merupakan bagian dari protein yang berinteraksi dengan antibodi. Epitope protein hemaglutinin pili juga lebih efektif melindungi terhadap semua serotipe bakteri. (Hicks., 2007; Mufida *et al.*, 2018).

Mekanisme pertahanan tubuh melawan infeksi bakteri *S. pneumoniae* adalah dengan meningkatkan respon imun. Respon imun dapat diperantarai oleh antibodi (humoral), sel (selular), atau keduanya. Ketika manusia diinfeksi oleh suatu patogen, maka tubuh akan mensekresikan sitokin proinflamasi. Sitokin ini yang akan mengaktifkan sel *T-Helper* menjadi Th2 yang kemudian mengakibatkan produksi sitokin proinflamasi lain seperti IL-4 semakin tinggi. Peningkatan kadar IL-4 pada penderita pneumonia lebih dominan daripada sitokin

antiinflamasi lain seperti, IL-17 atau IL-13 (Douglas *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2015; Junttila., 2018)

Berdasarkan latar belakang di atas, didapatkan bahwa protein RrgB memiliki susunan asam amino dengan panjang yang berbeda dan memiliki komponen antigenik tinggi sehingga dapat digunakan sebagai kandidat vaksin. Salah satu asam amino yang dimiliki oleh *S. pneumoniae* adalah asam amino dengan panjang 23, daerah susunan asam amino nomor 214-236 dengan susunan VNHQVGDVVEYEIVTKIPALANY. Oleh karena itu peneliti ingin melakukan penelitian untuk mengetahui “Efek Imunisasi Intranasal Epitope Protein RrgB 214-236 *S. pneumoniae* terhadap konsentrasi IL-4.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, rumusan masalah dari penelitian ini yaitu apakah ada efek pemberian imunisasi intranasal epitope protein RrgB 214-236 *S. pneumoniae* terhadap konsentrasi IL-4?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian imunisasi intranasal epitope protein RrgB 214-236 *S. pneumoniae* terhadap konsentrasi IL-4.

1.4 Manfaat Penelitian

Beberapa manfaat penelitian ini, yaitu:

- a. Dapat memberikan pengetahuan umum kepada masyarakat mengenai penyakit pneumonia.
- b. Dapat memberikan pengetahuan mengenai peran pili dan protein penyusun pili *S. pneumoniae*.
- c. Dapat memberikan pengetahuan tentang vaksin dan pentingnya vaksin untuk pencegahan terhadap infeksi *S. pneumoniae*.
- d. Hasil dari penelitian ini dapat dijadikan acuan untuk mengembangkan vaksin *S. pneumoniae*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

2.1.1 Klasifikasi Bakteri

Klasifikasi bakteri *Streptococcus pneumoniae* adalah sebagai berikut

(Klein dan Chester, 1980):

Domain	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Cocci
Ordo	: Lactobacillales
Famili	: Streptococcaceae
Genus	: Streptococcus
Spesies	: <i>S. pneumoniae</i>

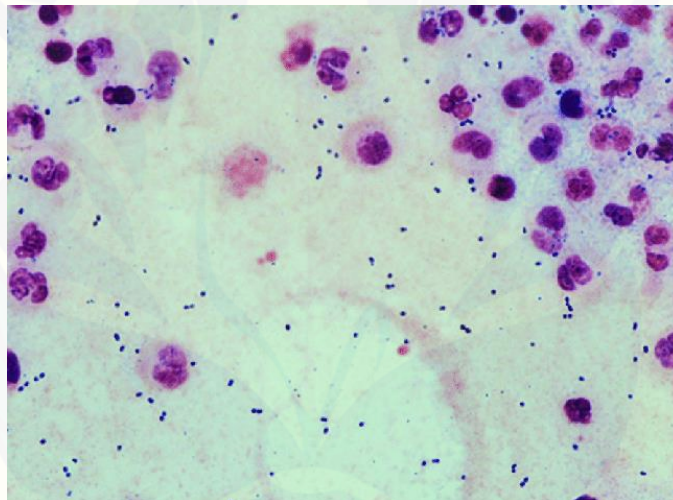
2.1.2 Morfologi Bakteri

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) adalah bakteri diplokokus Gram-positif yang merupakan flora normal pada nasofaring dan mempunyai lebih dari 90 serotipe. *S. pneumoniae* berbentuk bulat hingga lanset, pada nanah atau dahak terlihat sebagai kokus tunggal atau rantai. Bakteri ini mempunyai simpai polisakarida yang mempermudah penentuan tipe dengan antiserum spesifik. Panjang rantai bervariasi dan sebagian besar ditentukan oleh faktor lingkungan. Rantai panjang akan muncul bila ditanam dalam perbenihan yang hanya sedikit mengandung magnesium. *S. pneumoniae* mudah dilisiskan oleh zat aktif permukaan, seperti garam-garam empedu. Zat aktif permukaan mungkin menonaktifkan penghambat autolisis dinding sel (Ernest *et al.*, 1996).

Streptococcus pneumoniae membuat koloni bulat kecil, awalnya berbentuk kubah kemudian timbul lekukan di tengah dengan pinggiran yang meninggi dan α -hemolisis pada agar darah. Karbon dioksida (CO₂) dengan kadar 5-10% dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri. *S. pneumoniae* tumbuh paling baik pada suhu 37°C. Energi utama diperoleh dari penggunaan glukosa. Pembentukan asam laktat yang cepat dapat menghambat atau membatasi pertumbuhan. Apabila

pada selang waktu tertentu dilakukan netralisasi dengan basa maka akan terjadi pertumbuhan yang masif (Ernest *et al.*, 1996).

Streptococcus pneumoniae dapat menjadi patogen bagi manusia dan menyebabkan *invasive pneumococcal disease*, yaitu sekelompok penyakit seperti pneumonia, sinusitis akut, otitis media akut, konjungtivitis, meningitis, osteomyelitis, septic arthritis, endocarditis, peritonitis, selulitis, dan abses otak. *S. pneumoniae* dengan serotipe 1 sampai 8 menyebabkan pneumonia pada 75% orang dewasa sedangkan tipe 1, 14, 6, dan 9 banyak ditemukan pada anak-anak (Kadioglu *et al.*, 2008; Khoeri *et al.*, 2016). Morfologi *S. pneumoniae* dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Morfologi *S. pneumoniae* pada cairan perikardium (Donald *et al.*, 2016)

2.1.3 Epidemiologi Bakteri

Streptococcus pneumoniae merupakan bagian dari flora normal saluran napas atas manusia sehat, khususnya pada anak. Bakteri ini disebarkan dari manusia ke manusia lain melalui udara. Diperkirakan laju pertumbuhan bakteri ini di nasofaring dewasa berkisar antara 5%-30%, pada anak sehat 20%-50%, dan 25%-75% pada bayi. Faktor risiko untuk kolonisasi adalah: bayi tanpa ASI, infeksi saluran napas atas, perokok pasif, dan manusia yang tinggal di negara 4 musim pada musim dingin. Beberapa faktor yang meningkatkan risiko

penularan bakteri di lingkungan keluarga, yaitu kepadatan hunian, cuaca, adanya pasien infeksi saluran napas atas, pneumonia, dan otitis media (Ranuh *et al.*, 2011).

2.1.4 Faktor Virulensi Bakteri

Streptococcus pneumoniae memproduksi beberapa toxin dan protein permukaan yang berbahaya untuk manusia dan berkoloni di nasofaring manusia selama beberapa bulan pertama kehidupannya. Efektifitas dari infeksi bakteri ini bergantung pada sistem imun pejamu. Prinsip kerja faktor virulensi pada *S. pneumoniae* adalah dengan menghindari sistem imun pejamu, sedangkan jalan nafas pejamu mempunyai banyak mekanisme untuk melindungi dari kolonisasi dan infeksi *S. pneumoniae*. Kemampuan bakteri untuk memperoleh materi genetik baru melalui transformasi dan rekombinasi membuat faktor virulensi dari *S. pneumoniae* berkembang. Beberapa faktor virulensi *S. pneumoniae* adalah sebagai berikut:

a. Kapsul Polisakarida

Kapsul polisakarida *S. pneumoniae* merupakan salah satu faktor virulensi yang berperan penting yang letaknya di ekstraseluler. Kapsul polisakarida berfungsi sebagai perantara bakteri menempel pada sel inang dan sebagai perlindungan dari sistem kekebalan inang. Kapsul polisakarida juga akan menghambat fagositosis dari sel imun, mencegah penangkapan bakteri oleh reseptor inang dan komplemen, serta menghindari neutrofil. Kapsul juga berperan dalam memberikan perlindungan dengan interaksi antar jaringan dan sel sekitar seperti manipulasi dari immunoglobulin untuk pengenalan bakteri serta penghambatan mekanisme pertahanan sel inang. Beberapa serotipe kapsul *S. pneumoniae* memiliki kemampuan patogen yang berbeda, misalnya serotipe 1 ditemukan infeksi invasif dengan angka kematian lebih rendah sedangkan serotipe 3 dikaitkan dengan kolonisasi nasofaring dan infeksi serius yang dapat menyebabkan kematian (Brooks *et al.*, 2018).

b. Komponen Dinding Sel Bakteri

Dinding sel bakteri *S. pneumoniae* memiliki peran penting dalam

perlindungan dan pembentukan sel. Komponen dinding sel terdiri atas peptidoglikan, *wall teichoic acid* (WTA), dan *lipoteichoic acids* (LTAs). Modifikasi rantai glikan pada peptidoglikan membantu virulensi *S. pneumoniae* dengan membuat sel tahan terhadap lisozim. WTA, LTAs, dan peptidoglikan berhubungan dengan *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) yang berperan dalam peradangan pada sel inang (Brooks *et al.*, 2018).

c. Pneumolysin

Pneumolisin merupakan toksin yang dikeluarkan oleh *S. pneumoniae* sebagai hasil lisis dari sel yang dapat memberikan efek toksik pada sel inang. Pneumolisin juga berperan dalam pembentukan biofilm yang dapat mengganggu sistem kekebalan tubuh inang. Penelitian sebelumnya juga menjelaskan bahwa pneumolisin dapat menyebabkan kerusakan DNA dengan menginduksi pemisahan DNA untai ganda (Rai *et al.*, 2016; Brooks *et al.*, 2018).

d. Autolysin

Enzim autolysin terlibat dalam autolisis bakteri dengan melepaskan pneumolisin, asam teikoat, dan komponen lain dari intraseluler. Misalnya, lytic amidase (*choline-binding amidase*) dapat mendegradasi peptidoglikan sehingga menyebabkan sel lisis. Autolysin juga menyebabkan peningkatan kolonisasi pada sel nasofaring dikarenakan oleh pelepasan toksin (pneumolisin) selama degradasi dinding sel (Brooks *et al.*, 2018).

e. Protein Permukaan

Streptococcus pneumoniae memiliki beragam protein permukaan yang membantu patogenesis pneumonia dengan bertindak sebagai adhesin dan menghambat sistem kekebalan inang, khususnya komplemen. Protein permukaan *S. pneumoniae* dikategorikan ke dalam empat kelompok, yaitu; CBPs, lipoprotein, non-classical protein, dan protein yang memiliki motif LPXTG (X mewakili asam amino apa saja) dan dapat berikatan secara kovalen melalui motif pembelahan sortase (Brooks *et al.*, 2018). Keempat kelompok tersebut adalah:

1) CBPs

Dinding sel pneumokokus mengandung berbagai protein permukaan yang berbeda, salah satunya adalah *choline-binding proteins* (CBPs). Protein ini

ditemukan di semua jenis pneumokokus dan jumlahnya bervariasi dari 13 hingga 16. CBPs berperan dalam memengaruhi sistem komplemen manusia dan mengurangi kemampuan imunoglobulin untuk menghilangkan patogen. Beberapa protein CBPs juga dapat memodifikasi permukaan sel inang untuk memungkinkan pneumokokus berikatan dengan reseptor sel inang. Beberapa jenis protein yang termasuk kedalam kelompok CBPs, yaitu *Pneumococcal Surface Protein A* (PspA), *Pneumococcal Surface Protein C* (PspC), dan LytA (Brooks *et al.*, 2018).

2) Lipoprotein

Protein ini diperlukan sebagai pengangkut substrat. Ada sekitar 50 lipoprotein yang sudah teridentifikasi. Empat lipoprotein utama adalah *Pneumococcal surface Adhesin A* (PsaA), *Pneumococcal iron acquisition A* (PiaA), *Pneumococcal iron uptake A* (PiuA), dan *Pneumococcal iron transporter A* (PitA). Keempat protein ini adalah protein pengikat logam yang bergabung dengan kompleks transporter *ATP-binding cassette* (ABC). Transporter ABC mengangkut substrat melintasi membran dengan memanfaatkan energi yang dihasilkan dari ikatan ATP dan hidrolisis. PsaA terlibat dalam pengangkutan magnesium dan seng ke dalam sel. PiaA, PiuA, dan PitA terlibat dalam mengatur penyerapan zat besi (Brooks *et al.*, 2018).

3) Non-Classical Protein

Non-Classical Surface Proteins (NCSPs) ditemukan pada permukaan bakteri *S. pneumoniae*. Protein ini juga dikenal sebagai protein penerang cahaya karena memiliki banyak fungsi. NCSPs berfungsi sebagai adhesin yang mampu mengikat molekul inang dan mendorong invasi sel inang pada *S. pneumoniae*. Terdapat dua NCSP utama, yaitu: faktor virulensi pneumokokus A (PavA) dan enzim glikolitik (enolase dan GAPDH) (Brooks *et al.*, 2018).

4) LPXTG

Protein LPXTG akan menempel pada dinding sel inang setelah dikenali dan di modifikasi oleh sortase. Salah satu contoh protein LPXTG yang diekskresikan oleh pneumokokus adalah neuroaminidase. Protein tersebut berperan dalam menghambat bakterisida laktoferin dengan cara penghilangan asam sialat dari

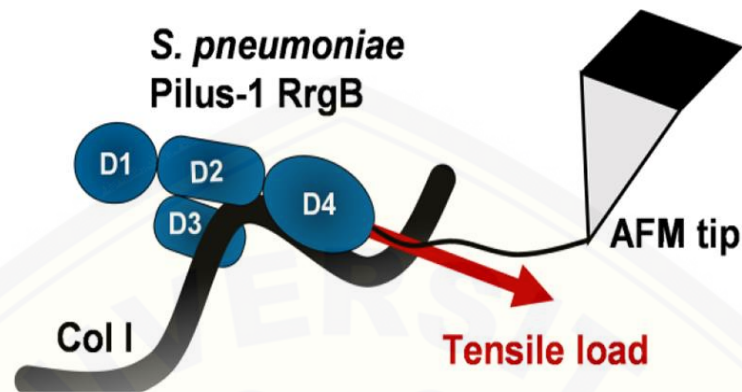
laktoferin. Selain itu, protein ini juga terlibat dalam kolonisasi dan penempelan bakteri pada sel inang.

f. Pili Bakteri

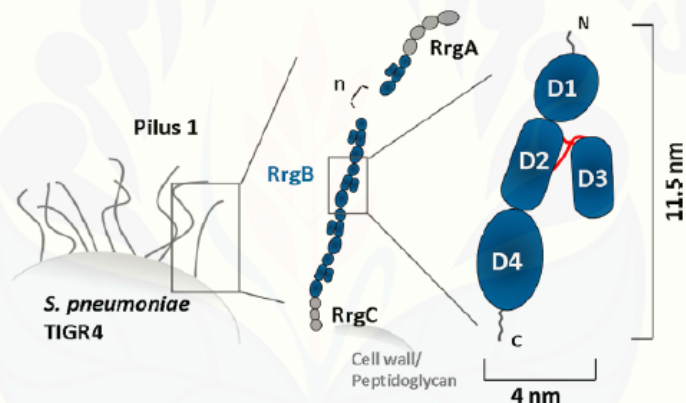
Streptococcus pneumoniae merupakan bakteri Gram positif yang biasa berkolonisasi di permukaan mukosa saluran pernapasan atas manusia. Salah satu faktor virulensi pada *S. pneumoniae* membentuk suatu komponen pada permukaan membran dengan bentuk filamen panjang yang disebut pili. Terdapat perbedaan antara pili yang diekspresikan oleh bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Pili bakteri Gram positif disusun oleh polimer yang berikatan secara kovalen, panjang dan tipis, dengan panjang 1-5 μm dan lebar antara 30-60 nm. Meskipun tipis, pili ini sangat kuat dan integritasnya dijaga oleh rangkaian yang berikatan silang secara kovalen dan membentuk ikatan isopeptida (Paterson and Baker, 2011).

Pili *S. pneumoniae* memiliki fungsi untuk memberikan dan meningkatkan kemampuan bakteri dalam menempel pada epitel saluran napas manusia. Pili *S. pneumoniae* merupakan struktur multimerik yang terdiri dari tiga protein, yaitu RrgA, RrgB, RrgC yang dipolimerisasi oleh tiga enzim sortase (SrtC1, SrtC2, dan SrtC3) melalui pembentukan antarmolekul kovalen ikatan isopeptida. Masing-masing protein tersebut memiliki fungsi yang berbeda. RrgA berfungsi sebagai jangkar atau dasar pili yang kontak langsung dengan epitel saluran napas manusia, RrgB sebagai badan atau penyangga utama pada pili, sedangkan RrgC sebagai ujung atau jangkar yang digunakan sebagai pengait pili pada permukaan membran bakteri. RrgB memiliki komponen antigen yang lebih tinggi daripada RrgA dan RrgC. Struktur RrgB terdiri dari D1, D2, D3, D4 seperti tampak pada Gambar 2.3 dan Gambar 2.4. RrgB D1 merupakan kandidat vaksin yang paling baik diantara ketiga lainnya karena memberikan perlindungan paling ampuh terhadap resiko infeksi pneumokokus. Protein RrgB juga memiliki 5 epitope dengan panjang susunan asam amino yang berbeda. Susunan 5 epitope tersebut menjadi komponen antigen pada protein RrgB pili bakteri *S. pneumoniae*. Dari penjelasan di atas menjadikan pili bakteri pneumokokus sebagai kandidat *protein-based vaccine* untuk mencegah infeksi *S. pneumoniae* (Gentile *et al.*, 2011;

Mufida *et al.*, 2018).



Gambar 2.2 Struktur pili bakteri *S. pneumoniae* (Sumber: Becke *et al.*, 2019)



Gambar 2.3 Ilustrasi pili-1 yang terdiri dari protein RrgA, RrgB, RrgC (Sumber: Becke *et al.*, 2019)

g. Biofilm

Biofilm adalah komunitas terstruktur yang terdiri dari agregat sel mikroba dan dikelilingi oleh matriks ekstraseluler polisakarida yang menempel pada permukaan. Matriks ekstraseluler memberikan perlindungan dan meningkatkan virulensi dari bakteri *S. pneumoniae*. Biofilm sendiri dibentuk sebagai respon terhadap stres dan kondisi yang keras untuk meningkatkan kelangsungan hidup bakteri. Dalam beberapa literatur menyebutkan bahwa biofilm dari *S. pneumoniae* tidak efektif dihilangkan selama perawatan antimikroba karena meningkatkan resistensi. Selain itu, biofilm *S. pneumoniae* mampu melarikan diri dari respon imun inang seperti *mucociliary clearance* (Brooks *et al.*, 2018).

2.2 Patogenesis Pneumonia

Pneumonia adalah peradangan yang mengenai parenkim paru, distal dari bronkiolus terminalis yang mencakup bronkiolus respiratorius, dan alveoli, serta menimbulkan konsolidasi jaringan paru dan gangguan pertukaran gas setempat. Penyebab pneumonia adalah bakteri, virus, jamur, pajanan bahan kimia atau kerusakan fisik dari paru-paru, maupun pengaruh dari penyakit lain. Bakteri yang biasa menyebabkan pneumonia adalah *Streptococcus* dan *Mycoplasma pneumonia* (Anwar *et al.*, 2014; Dahlan, 2014).

Proses patogenesis pneumonia dikaitkan dengan tiga faktor, yaitu keadaan (imunitas) *host*, mikroorganisme yang menyerang *host* dan lingkungan yang berinteraksi satu sama lain. Cara penularan berkaitan dengan jenis kuman, misalnya infeksi melalui droplet sering disebabkan *S. pneumoniae*, melalui selang infus oleh *Staphylococcus aureus* sedangkan infeksi pada pemakaian ventilator oleh *P.aeruginous* dan *Enterobacter*. Kolonisasi *S. pneumoniae* pada nasofaring merupakan faktor utama dalam patogenesis penyakit *invasive pneumococcal disease*. Koloni *S.pneumoniae* didapatkan pada 5%-10% orang dewasa sehat, sedangkan pada anak-anak yang sehat prevalensinya lebih tinggi yaitu 20%-40% (Musher, 2005; Dahlan, 2009; Dahlan, 2014).

Infeksi *S. pneumoniae* diawali dengan masuknya bakteri pneumokokus ke dalam sistem pernapasan atas manusia. Kemudian, bakteri patogen akan masuk ke saluran napas bagian bawah dan mengalami kolonisasi setelah dapat melewati hambatan mekanisme pertahanan inang berupa daya tahan mekanik (epitel silia dan mukus), humoral (antibodi dan komplemen), dan selular (leukosit polinuklir, makrofag, limfosit dan sitokinnya). Bakteri akan berkolonisasi pada lapisan sel epitel mukosa saluran napas bawah dan membentuk lapisan biofilm yang berfungsi dalam mempertahankan bakteri dari mekanisme pertahanan sistem inum *host* dan memperpanjang masa hidup patogen. Bakteri patogen kemudian akan menyebar dan melakukan invasi pada organ-organ pernapasan *host*. Infeksi *S. pneumoniae* ini menimbulkan gejala seperti demam, batuk kering maupun basah dengan dahak berwarna kuning kehijauan, lemas, mual, muntah, nyeri ketika menarik napas atau batuk, dan sesak napas (Setiati *et*

al., 2014; Dahlan, 2014).

2.3 Vaksin *Streptococcus pneumoniae*

Pengobatan infeksi *S. pneumoniae* melibatkan penggunaan antibiotik. Permasalahan saat ini adalah meningkatnya resistensi bakteri pada antibiotik, yang membuat pencegahan infeksi *S. pneumoniae* menjadi penting. Salah satu cara pencegahan yang paling efektif adalah dengan vaksinasi. Pengembangan vaksin untuk bakteri *S. pneumoniae* terus mengalami pengembangan hingga kini. Prinsip kerja vaksin dalam mengurangi infeksi *S. pneumoniae* menggunakan reaksi antigen-antibodi sehingga memberikan proteksi pada infeksi yang akan datang (Ranuh *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2017).

Vaksin yang telah digunakan untuk melawan bakteri *S. pneumoniae* saat ini adalah *Pneumococcal Polysaccharide Vaccine* (PPV) 23 valen dan *Pneumococcal Conjugates Vaccine* (PCV). *Pneumococcal Polysaccharide Vaccine* (PPV) 23 valen memberikan proteksi terhadap 23 serotipe bakteri *S. pneumoniae* yaitu serotipe 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, dan 33F. Vaksin ini bertanggung jawab terhadap 85%-95% IPD pada anak dan dewasa di Amerika. Vaksin PPV 23 yang tersedia di Indonesia adalah *Pneumo-23®. Pneumococcal Polysaccharide Vaccine* (PPV) 23 valen termasuk subunit vaksin yang menginduksi respon imun melalui *T independent*, sehingga tidak bisa digunakan pada anak usia kurang dari 2 tahun, karena respon imun *T independent* pada anak usia kurang dari 2 tahun belum matur. Vaksin PPV 23 ini tidak dapat merangsang respon imunologik pada anak usia kurang dari 2 tahun sehingga tidak mampu menghasilkan respon booster. Kelemahan vaksin ini dapat diatasi dengan menggunakan *Pneumococcal Polysaccharide Conjugate Vaccine* (PCV) (Ranuh *et al.*, 2011).

Vaksin PCV pertama berisi 7-valen dan hanya melindungi dari infeksi bakteri *S. pneumoniae* pada serotipe 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, dan 23F. Ketujuh tipe PCV menyebabkan IPD pada 90% anak usia muda di Amerika Serikat dan Canada serta 75% anak di Eropa. Vaksin PCV7 yang tersedia di Indonesia adalah *Prevenar®*. Vaksin ini dapat diberikan mulai usia 2 bulan ke atas. Hasil

penelitian Pvia dkk menunjukkan bahwa PCV7 sangat efektif untuk mencegah serotipe IPD yang tercakup dalam vaksin (89%) dan untuk semua serotipe sebesar 63%-74%. Hal ini karena serotipe yang beredar cocok dengan yang ada dalam vaksin dan adanya *cross reactions* dari antibodi yang terbentuk dengan serotipe lain. Vaksin PCV yang baru dipasarkan di Eropa sejak tahun 2008 dengan nama PhiD-CV sedangkan di Indonesia baru beredar tahun 2010 yaitu Synflorix berisi 10 serotipe yaitu: 4, 6B, 9V, 12A, 18C, 19F, 23F, 1, 5, dan 7F. Vaksin ini dapat diberikan pada bayi 2 bulan-2 tahun. Pada tahun 2011 PCV7 telah digantikan oleh PCV-13 yang mengandung serotipe 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F, 3 6A, dan 19A. Terdapat beberapa perbedaan antara *Pneumococcal Polysaccharide Vaccine* (PPV) 23 dengan *Pneumococcal Polysaccharide Conjugate Vaccine* (PCV) seperti yang dijelaskan dalam Tabel 2.1. (Ranuh *et al.*, 2011).

Tabel 2.1. Perbedaan antara PPV dan PCV

Kandungan Vaksin	PPV-23	PCV
Polisakarida	Polisakarida bakteri	Pemberian paparan protein RrgB 214-236 bakteri <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Antigen	<i>T-independent antigen</i>	<i>T dependent</i>
Immunogenicity	Tidak imunogenik pada anak < 2 tahun	Imunogenik pada anak > 2 tahun
Serotipe	PPV-23 mengandung 23 serotipe	PCV-7 mengandung 7 serotipe PCV-10 mengandung 10 serotipe PCV-13 mengandung 13 serotipe

Pili bakteri *S. pneumoniae* juga dapat digunakan sebagai vaksin seperti pada vaksin DPT yang menggunakan protein hemaglutinasi dari fimbriae bakteri *Bordetella pertussis*. Pili *S. pneumoniae* yang tersusun dari 3 protein, yaitu RrgA, RrgB, dan RrgC menjadi kandidat yang berpotensi untuk dijadikan vaksin antipneumokokus. Protein RrgB yang merupakan kerangka utama penyusun pili bakteri *S. pneumoniae* memiliki komponen antigenik yang tinggi. Hasil yang

ditunjukkan dari reaksi antara protein hemaglutinasi bakteri *S. pneumoniae* dan IgG yang diambil dari antibodi poliklonal sama dengan reaksi antara pili bakteri *S. pneumoniae* dan IgG tersebut. Protein hemaglutinasi yang ada pada pili bakteri *S. pneumoniae* dijadikan sebagai kandidat vaksin yang dapat mencegah infeksi pneumokokus (Mufida *et al.*, 2018).

Epitope-based vaccine saat ini banyak dikembangkan karena dinilai memiliki banyak kelebihan. Vaksin berbasis epitope memiliki spesifisitas tinggi dalam menginduksi sistem imun, memiliki kapasitas yang tinggi dalam hal produksi, dan lebih efektif serta murah dalam biaya produksi. Peptida yang mengandung epitope lebih mudah disintesis, dimurnikan, disimpan, dan dikendalikan. Vaksin berbasis epitope memiliki sifat patogenisitas yang lebih rendah sehingga lebih aman bagi peneliti dan subjek penelitian. Selain itu vaksin berbasis epitope juga memiliki jangkauan yang luas dalam hal memberikan perlindungan terhadap infeksi *strain* bakteri *S. pneumoniae*. Vaksin berbasis epitope juga dianggap lebih aman daripada vaksin pneumokokus lama dan saat ini sudah mulai untuk dilakukan uji klinik (Zahroh *et al.*, 2016).

2.4 Sistem Imun Manusia

Sistem imun manusia merupakan gabungan atau kumpulan dari sel, jaringan, dan organ yang bekerja sama untuk melawan benda asing yang menyerang tubuh. Benda asing tersebut adalah mikroorganisme primer seperti virus, bakteri, jamur, dan parasit. Manusia menyediakan lingkungan yang ideal sehingga membuat mikroba mencoba masuk dan berkembang biak di dalamnya. Sistem imun bertugas untuk mencari dan menghancurkan mereka. Sistem imun terdiri atas sistem imun non spesifik (*innate*) dan spesifik (*adaptive*). Baik sistem imun non spesifik maupun spesifik memiliki peran masing-masing, keduanya memiliki kelebihan dan kekurangan namun sebenarnya ke dua sistem tersebut memiliki kerja sama yang erat. Mekanisme sistem imun non spesifik atau *innate* selalu ada pada setiap manusia dengan memberikan perlindungan segera terhadap mikroorganisme penyebab infeksi. Imunitas non spesifik menghambat invasi mikroba melalui pertahanan epitel dengan menghancurkan berbagai

mikroba yang masuk ke dalam tubuh. Resistensi pada imunitas non spesifik tidak diperoleh melalui kontak dengan suatu antigen. Imunitas ini dapat berubah-ubah sesuai umur dan aktivitas hormonal atau metabolik. Imunitas spesifik atau adaptif berkembang lebih lambat namun perlindungannya lebih khusus terhadap infeksi. Imunitas ini terjadi setelah pemaparan terhadap agen infeksius dan diperantarai oleh antibodi atau sel limfoid. Terdapat dua jenis imunitas adaptif, yaitu imunitas seluler dan imunitas humoral yang diperantarai oleh sel dan molekul yang berbeda dengan fungsi untuk memberikan pertahanan terhadap mikroba ekstraseluler dan intraseluler. Imunitas seluler adalah imunitas terhadap mikroba intraseluler karena dalam prosesnya diperantarai oleh sel limfosit T. Limfosit T mengaktifasi fagosit untuk menghancurkan mikroba yang telah dimakannya. Limfosit T juga membunuh sel inang yang terinfeksi mikroba di dalam sitoplasmanya. Imunitas humoral diperantarai oleh antibodi yang diproduksi oleh limfosit B. Fungsi antibodi adalah menghentikan mikroba yang berada dalam permukaan mukosa dan darah tidak dapat menuju sel inang dan membentuk koloni di dalamnya. Melalui cara ini antibodi mencegah infeksi berkembang. Antibodi merupakan protein terlarut yang termasuk kelas protein globulin karena struktur globularnya akan berinteraksi spesifik dengan antigen. Sekitar 20% protein plasma terdiri dari antibodi. Antibodi dengan molekul yang heterogen dan besar disebut imunoglobulin. Lima jenis imunoglobulin memiliki fungsi yang berbeda karena perbedaan struktur masing-masing, seperti:

- a. Ig M merupakan antibodi paling efisien dalam mengaglutinasi bakteri dan mengaktifkan komplemen karena memiliki 10 potential antigen-binding site. Naiknya kadar Ig M berkaitan dengan adanya infeksi baru.
- b. Ig D dijumpai di permukaan sel B limfosit sebagai molekul reseptor.
- c. Ig G merupakan penyusun antibodi terbanyak dalam serum (75%) dan antibodi yang paling lama berada dalam serum.
- d. IgA merupakan imunoglobulin yang paling banyak dijumpai dalam cairan sekret, seperti saliva, air mata, intestinal mucus, bronchial secretoris, susu, dan prostatic fluid.

- e. IgE berperan sangat penting dalam proses terjadinya alergi meskipun dalam keadaan normal dijumpai sangat sedikit dalam serum, sekitar 0,004%.

2.4.1 Sistem Imun Mukosa Saluran Pernapasan

Membran mukosa dalam saluran pernapasan dilapisi oleh mukus yang secara konstan bergerak ke atas membawa bakteri yang menempel dan dibantu oleh sel-sel bersilia. Dimana mukus dan air mata mengandung lisozim dan beberapa zat lain yang bersifat antimikroba. Langkah awal infeksi pada beberapa mikroba pelekatnya pada sel-sel epitel permukaan melalui protein permukaan bakteri yang bersifat adhesif. Pelekatan tersebut dapat dicegah apabila di atas permukaannya terdapat antibodi Ig A. Apabila mikroba masuk ke dalam tubuh melalui membran mukosa maka akan ditangkap oleh fagosit dan diangkut ke dalam saluran limfatik regional yang membawanya ke kelenjar getah bening. Organ mukosiliar yang digunakan untuk mengeradikasi bakteri dalam saluran napas dibantu oleh makofag paru. Sedangkan mekanisme perlindungan khusus dalam sistem saluran napas mencakup rambut pada lubang hidung dan refleks batuk yang mencegah aspirasi (Wiradharma *et al.*, 2016).

Protein *occludin* dan *claudin* mengikat beberapa lapisan epitel yang berikatan satu sama lain untuk melindungi lumen saluran pernapasan manusia. Sel epitel saluran pernapasan manusia juga mempunyai silia yang menghasilkan mukus. Mukus tersebut terusun atas polisakarida seperti mucin (MUC) yaitu MUC2, MUC5AC, MUC5B, dan MUC19. Protein MUC5AC dan MUC5B yang disekresi berlebihan dapat menyebabkan penyakit asma dan penyakit paru obstruksi kronis. Pergerakan silia dapat membantu mengeluarkan benda asing yang sampai ke saluran pernapasan bawah dan biasanya dibantu dengan mekanisme batuk. Benda asing atau mikroorganisme pada saluran pernapasan bawah akan merespon pengeluaran sel B limfosit dan sel T limfosit yang berusaha mengeliminasi patogen tersebut. Sitokin-sitokoin proinflamasi seperti IL-2 akan dihasilkan di dalam tubuh untuk merangsang sistem imun sehingga memproduksi sel T limfosit (Sato dan Kiyono, 2012; Hermawati *et al.*, 2016; Abbas *et al.*,

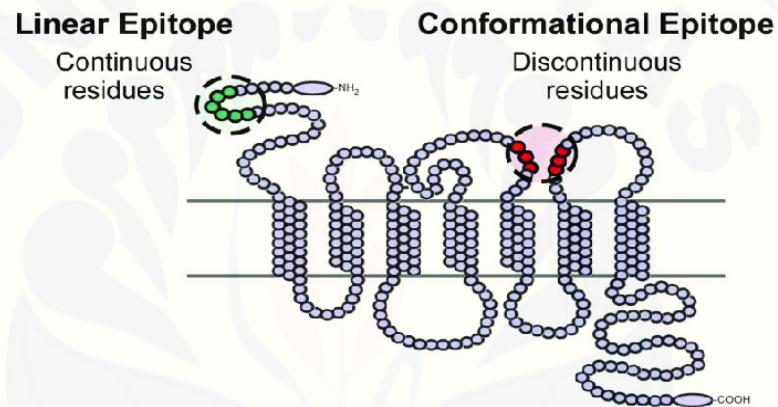
2014).

Sistem imun mukosa berdasarkan susunan anatomi dan fungsinya terbagi menjadi dua, yaitu *inductive* dan *effector site*. Kunci respon imun pada saluran pernapasan, pencernaan, dan reproduksi terdapat pada pergerakan sel imun dari *mucosal inductive* menuju ke daerah efektor. Produksi IgA, sel T, dan sel B dari sel plasma merupakan sel yang sensitif dan spesifik terhadap suatu antigen pada efektor mukosa saluran pernapasan, pencernaan, dan reproduksi. Respon imun adaptif pada mukosa dimulai ketika CD4⁺ membantu perkembangan dan persebaran sel plasma. Reseptor yang akan berikatan dengan immunoglobulin pada sel epitel disebut *Polymeric Immunoglobulin Receptor* (pIgR). pIgR berada pada daerah basal atau dasar dari sel epitel. Produksi *Polymeric Immunoglobulin A* (pIgA) pada sel plasma dirangsang oleh antigen dan akan berikatan dengan pIgR pada sel epitel. Ikatan pIgA dengan pIgR menyebabkan dikeluarkannya antibodi *Secretory Immunoglobulin A* (sIgA) yang memiliki berbagai spesifisitas terhadap antigen yang ada pada daerah induktif di mukosa (McGhee *et al.*, 2012).

2.5 Epitope

Epitope adalah deretan/sekuens peptida (asam amino) yang khusus terdapat di permukaan antigen tertentu, yang berikatan dengan antibodi atau penerima sel T. Epitope yang berikatan dengan antibodi disebut epitope sel B, sedangkan yang berikatan dengan penerima sel T disebut epitope sel T. Epitope sel B akan berfungsi dalam memfasilitasi produksi antibodi spesifik terhadap antigen yang masuk ke dalam tubuh. Epitope sel B dibagi menjadi 2 kelompok yaitu *Linear B-Cell Epitope* dan *Conformational B-Cell Epitope* seperti tampak pada Gambar 2.4. *Linear B-Cell Epitope* terdiri dari susunan peptida yang tersusun secara berurutan, sedangkan *Conformational B-Cell Epitope* tersusun tidak berurutan. Sel B akan mengenali antigen yang masuk melalui reseptor yang dimilikinya yaitu *B-Cell Receptor* (BCR). Ketika reseptor tersebut aktif, sel B akan berdiferensiasi dan mensekresikan antibodi (Nugraha, 2011; Sanchez-Trincado *et al.*, 2017).

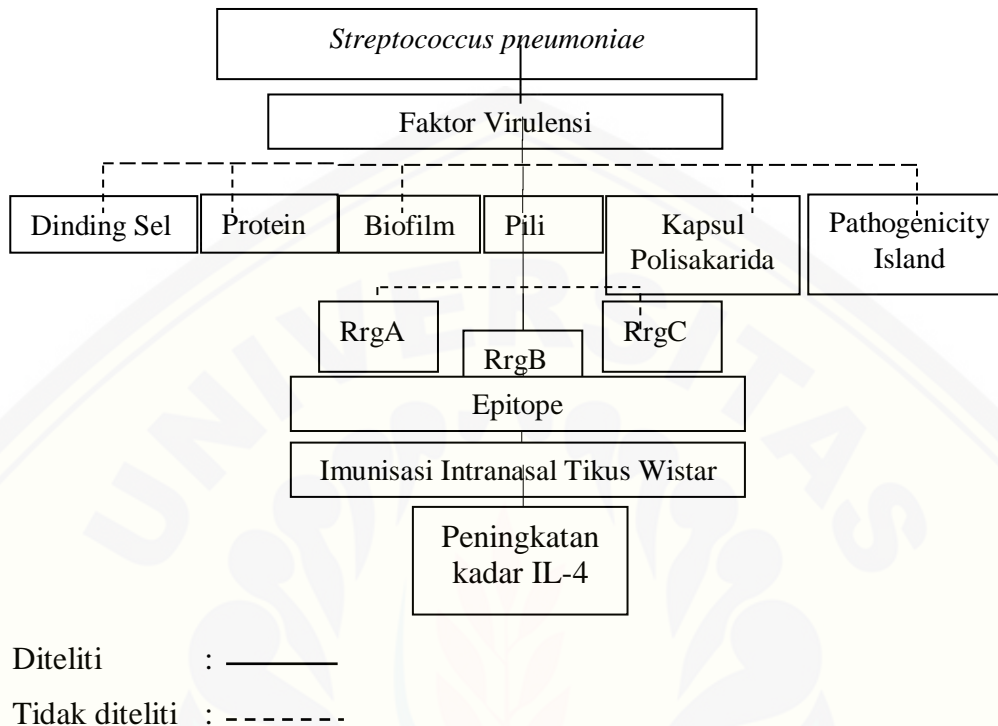
Epitop sel T adalah pecahan peptida dari protein yang telah diolah dalam *antigen presenting cell* (APC) dan bersama-sama dengan molekul protein dari *major histocompatibility complex* (MHC) yang dikenal oleh penerima sel T. Epitope sel T berfungsi dalam mengidentifikasi peptida terpendek yang dimiliki antigen yang mampu menstimulasi CD4 atau CD8. Reseptor sel T terdiri dari 2 macam yaitu reseptor MHC 1 dan reseptor MHC 2 dimana ketika reseptor tersebut berikatan dengan antigen akan mengaktivasi dari sel T CD8 dan sel T CD4 menjadi sel T sitotoksik dan sel T-helper (Nugraha, 2011; Sanchez-Trincado *et al.*, 2017).



Gambar 2.4 Epitope sel B limfosit (Deng *et al.*, 2017)

2.6 Kerangka Konsep

Kerangka konsep dalam penelitian ini dijelaskan dalam Gambar 2.5



Gambar 2.5 Kerangka konsep penelitian

Streptococcus pneumoniae merupakan bakteri Gram positif yang memiliki dinding sel, protein, pili, biofilm, kapsul polisakarida, dan *pathogenicity island* sebagai faktor-faktor yang membantu dalam mekanisme virulensi. Diantara keenam faktor diatas, salah satu faktor yang penting ialah pili. Pili memegang peran penting dalam penempelan bakteri pada sel inang dan didukung oleh protein-protein yang ada pada bakteri. Pili *S. pneumoniae* terdiri atas tiga protein, yaitu RrgA, RrgB, RrgC. RrgB memiliki komponen antigen yang lebih tinggi daripada RrgA dan RrgC. Protein RrgB *S. pneumoniae* mempunyai 5 epitope dengan panjang asam amino yang berbeda. Untuk mengetahui peran dari epitope protein RrgB tersebut, dilakukan imunisasi intranasal pada tikus Wistar. Dari imunisasi tersebut diharapkan terjadi peningkatan kadar IL-4.

2.7 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah pemberian imunisasi intranasal epitope RrgB 214-236 bakteri *S. pneumoniae* dapat meningkatkan kadar IL-4.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan ialah penelitian *true* eksperimental. Penelitian ini dilakukan dengan cara memberikan imunisasi intranasal epitope protein RrgB 214-236 *S. pneumoniae*, kemudian mengukur kadar IL-4. Tahapan penelitian ini terdiri dari:

a. Tahap Imunisasi Hewan Coba

Tahap ini dilakukan untuk menstimulasi respon imun mukosa hewan coba terhadap pemberian epitope protein RrgB 214-236 *S. pneumoniae* yang dilakukan secara intranasal.

b. Tahap Isolasi Sampel

Tujuh hari setelah imunisasi terakhir hewan coba diterminasi untuk diambil bilasan hidung yang akan digunakan sebagai sampel.

c. Tahap Pengukuran Kadar IL-4 secara ELISA

Tahap ini dilakukan untuk mengetahui kadar IL-4 dari bilasan hidung hewan coba dengan menggunakan ELISA *reader*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Biokimia dan rumah perawatan hewan coba Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penelitian dilakukan selama tiga bulan, yaitu pada bulan Oktober 2019 sampai dengan Desember 2019.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Uji Kelayakan Etik

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus yang dalam pelaksanaannya harus mendapat sertifikasi kelayakan etik sehingga perlu diajukan kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Prosedur ini bertujuan untuk menjamin keamanan bagi peneliti dan hewan coba selama melakukan penelitian serta memperjelas tujuan dan kewajiban

peneliti.

3.3.2 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah tikus Wistar yang berusia 12-16 minggu.

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel yang diambil merupakan bilasan hidung tikus Wistar yang sudah diberikan imunisasi intranasal epitope protein RrgB 214-236 *Pneumococcus* dengan panjang peptida 23. Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus Federer, dengan rumus dan penghitungan sebagai berikut:

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

t : jumlah pengulangan

n : jumlah perlakuan

$$(t-1)(3-1) \geq 15$$

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

$$t-1 \geq 7,5$$

$$t \geq 8,5$$

Hewan coba yang digunakan berdasarkan penghitungan diatas lebih besar sama dengan dari 9 ekor. Jadi besar sampel yang digunakan pada tiap kelompok berjumlah 9 ekor tikus Wistar.

3.4 Instrumen Penelitian

3.4.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu pipet tetes, sterilisator, *object glass*, *cover glass*, tabung elenmeyer, spuit 3 cc, spuit 5 cc, spuit 10 cc, gelas ukur, gunting, inkubator, tabung *Eppendorf* mikropipet, dan *ELISA kit*.

3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu:

- a. Protein: epitope protein RrgB 214-236 *S. pneumoniae*.
- b. Hewan coba: tikus strain wistar usia 12-16 minggu.
- c. Reagen kimia: *Phosphate Buffered Saline* (PBS), *Cholera Toxin B*(CTB), *eter*, *natrium chloride* (NaCl), HRP-streptavidin, *Coated plates*, *Sample diluents*, *Controls*, *Wash Concentrate*, *Conjugate*, *Substrate*, dan *Stop solution*.

3.5 Batasan Operasional

3.5.1 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini, yaitu:

- a. Variabel independen : paparan epitope protein RrgB 214-236 *S. pneumoniae* dengan panjang peptida 23.
- b. Variabel dependen : kadar IL-4.

3.5.2 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Nama Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Jenis Data
1	Paparan epitope protein RrgB 214-236 bakteri <i>S. pneumoniae</i>	Pemberian paparan protein RrgB 214-236 bakteri <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Mikropipet	Diteteskan	a. Epitope – b. Epitope – dan adjuvan c. Epitope + dan adjuvan	Ordinal
2	Kadar IL-4	Jumlah IL-4 dalam satuan pg/ml	ELISA reader	Membaca absorbansi pada ELISA reader	pg/ml	Rasio

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Imunisasi Hewan Coba

Tikus Wistar usia 12-16 minggu dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol, kelompok adjuvan dan kelompok epitope1+adjuvan. Kelompok tikus kontrol diberikan imunisasi PBS sebanyak 40 μ L secara intranasal. Pada kelompok adjuvan diberikan imunisasi PBS sebanyak 40 μ L yang mengandung ajuvan saja yaitu 2 μ g CTB (*Cholera Toxin B*), kelompok

epitope1+adjuvan diberikan imunisasi dengan 40 μL PBS, 2 μg CTB dan 20 μg epitope protein pili RrgB 214-236 *Streptococcus pneumoniae*. Vaksin diberikan sebanyak 20 μL per lubang hidung tikus secara intranasal. Semua tikus diimunisasi seminggu sekali sebanyak 3 kali dan 1 minggu setelah imunisasi terakhir dilakukan isolasi bilasan cairan lubang hidung.

3.6.2 Isolasi Sampel

Satu minggu setelah imunisasi terakhir, tikus diterminasi dengan menggunakan klorofom dan dilakukan isolasi bilasan hidung dengan memasukkan 1-2 ml larutan saline steril melalui trakea dan tetesan larutan saline lewat hidung ditampung dengan *Eppendorf* steril.

3.6.3 Pengukuran Kadar IL-4

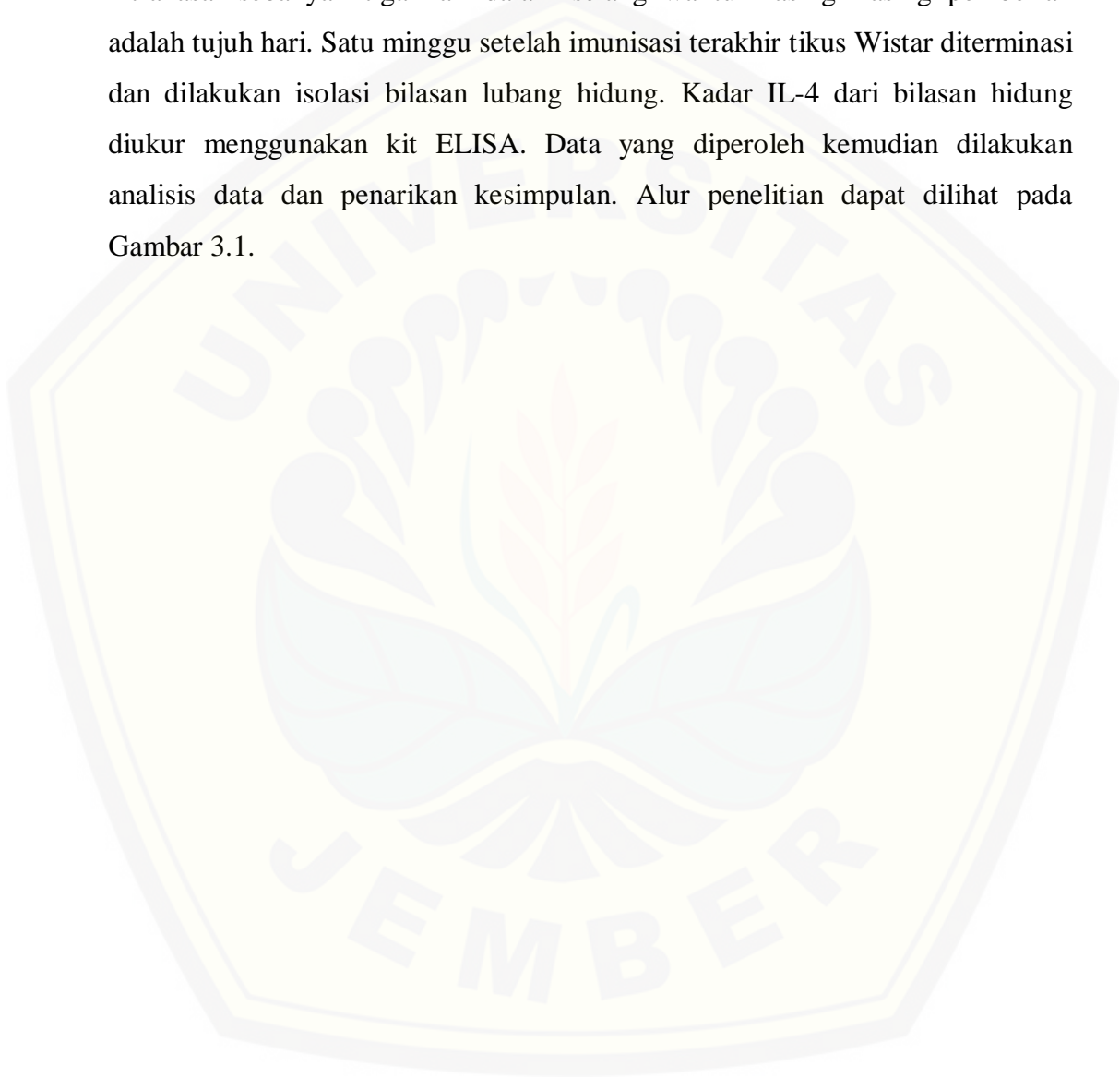
Kadar IL-4 dari bilasan hidung diukur menggunakan kit ELISA komersial untuk IL-4 sesuai dengan prosedur. Sampel dimasukkan kedalam *well* dan diinkubasi selama 2 jam. Setelah antigen diadsorpsi, *plate* dicuci dengan *washing solution*, selanjutnya ditambah dengan 100 μL antibodi terhadap IL-4, lalu diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah 1 jam, *plate* dicuci dengan *washing solution* dan ditambah dengan 100 μL larutan HRP-Streptavidin. Inkubasi *plate* selama 45 menit kemudian cuci dengan *washing solution* kembali. Tambahkan 100 μL subtrat TMB, inkubasi selama 30 menit kemudian ditambah dengan 50 μL *stop solution*. Warna yang muncul diukur pada panjang gelombang 405 nm menggunakan ELISA *reader*.

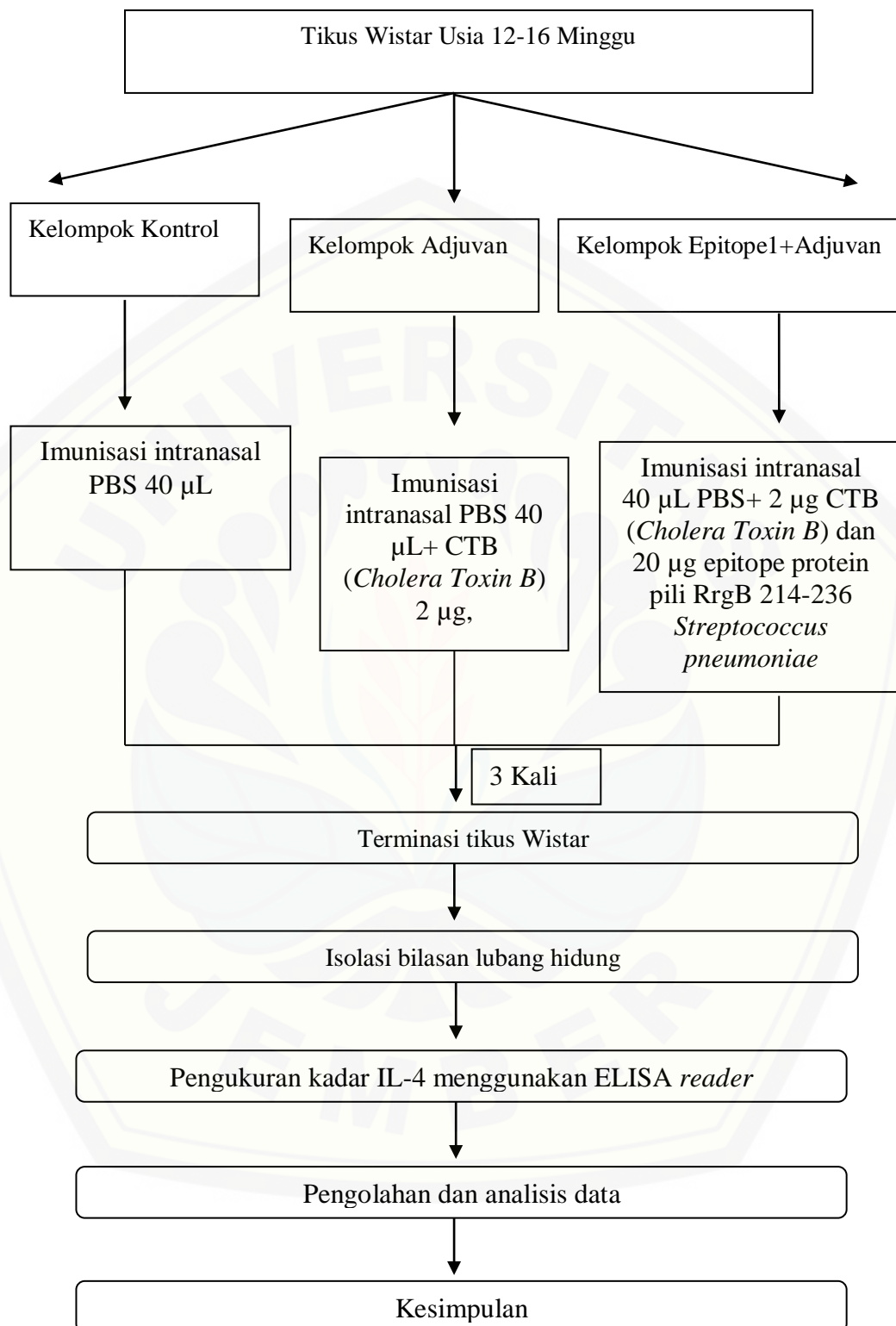
3.7 Analisis Data

Analisis statistik dilakukan untuk membandingkan kadar IL-4 bilasan hidung diantara 3 kelompok. Apabila distribusi data normal dapat menggunakan uji statistik *One-Way* ANOVA, namun apabila distribusi data yang didapatkan tidak normal maka uji statistik dilakukan dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis. Batas signifikansi yang digunakan adalah 0,05 ($p < 0,05$).

3.8 Alur Penelitian

Penelitian ini dimulai dari mempersiapkan tikus Wistar dengan usia 12-16 minggu. Kemudian dibagi menjadi tiga kelompok. Satu kelompok kontrol dan dua kelompok perlakuan. Lalu tikus wistar tersebut diberikan imunisasi intranasal sebanyak tiga kali dalam selang waktu masing-masing pemberian adalah tujuh hari. Satu minggu setelah imunisasi terakhir tikus Wistar diterminasi dan dilakukan isolasi bilasan lubang hidung. Kadar IL-4 dari bilasan hidung diukur menggunakan kit ELISA. Data yang diperoleh kemudian dilakukan analisis data dan penarikan kesimpulan. Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.





Gambar 3.1 Alur penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang efek imunisasi intranasal epitope protein RrgB 214-236 *S. pneumoniae* terhadap konsentrasi IL-4 pada hewan coba tikus Wistar yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa: tidak ada efek pemberian imunisasi intranasal epitope protein RrgB 214-236 terhadap konsentrasi IL-4 bilasan hidung.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan oleh peneliti dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Sebaiknya sampel yang digunakan untuk pengukuran kadar IL-4 diambil melalui serum atau plasma sehingga diharapkan hasilnya akan lebih valid.
- b. Peneliti selanjutnya dapat memanfaatkan penelitian ini sebagai dasar penelitian lebih lanjut untuk pembuatan *epitope-based vaccine*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, Abul, Andrew H. Lichtman, dan Shiv Pillai. 2014. *Cellular and Molecular Immunology*. 8th Ed. California: Saunders.
- Becke, T. D., S. Ness, B. K. Kaufmann, B. Hartmann, A. F. Schilling, S. Sudhop, *et al.* 2019. Pilus-1 Backbone Protein RrgB of *S. pneumoniae* Binds Collagen in A Force-Dependent Way. *ACS Nano*. 13(6):7155–7165.
- Boyaka, P. N. 2017. Inducing mucosal IgA: A Challenge for Vaccine Adjuvants and Delivery Systems. *The Journal of Immunology*. 199(1):9–16.
- Brooks, L. R. K. dan G. I. Mias. 2018. *Streptococcus pneumoniae*'s Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Frontiers in Immunology*. 9:1366.
- Deng, X., U. Storz, dan B. J. Doranz. 2018. Enhancing Antibody Patent Protection Using Epitope Mapping Information. *MAbs*. 10(2):204–209.
- Donald, A. M., Y. Tovpeko, dan B. Junqin. 2016. Competence for Genetic Transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal Of Bacteriology*. 198:2370–2378.
- Douglas, L. J. 2003. Candida Biofilms and Their Role in infection. *Trends in Microbiology*. 11, 30-36
- Ernest, M. A. dan G. B. Sergio. 1996. Molecular Architecture of *Streptococcus pneumoniae* Surface Thioredoxin-Fold Lipoproteins Crucial for Extracellular Oxidative Stress Resistance and Maintenance of Virulence. *EMBO Mol Med*. 5(12): 1852–1870
- Gentile, M. A., S. Melchiorre, C. Emolo, M. Moschioni, C. Gianfaldoni, L. Pancotto, *et al.* Masignani. 2011. Structural and Functional Characterization of The *S. pneumoniae* RrgB Pilus Backbone D1 Domain. *Journal of Biological Chemistry*. 286(16):14588–14597..
- Hermawati I., H. Herman, Departemen Orthopaedi dan Traumatologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin, R. Agoes, dan Departemen Ilmu Kesehatan Masyarakat Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran. 2016. Uji Validasi Kadar Interleukin-4 (IL-4) Sebagai Alternatif Uji Diagnosis Infeksi Kecacingan. *Majalah Kedokteran Bandung*. 48(4):211–215.
- Hicks, L. A., L. H. Harrison, B. Flannery, J. L. Hadler, W. Schaffner, A. S. Craig, D. Jackson, A. Thomas, B. Beabell, R. Lynfield, A. Rengold, M. M. Farley, dan C. G. Whitney. 2007. Incidence of Pneumococcal Disease Due to Non-Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV7) Serotypes in the United States During the Era of Widespread PCV7 Vaccination. *J Infect Dis*. 196(9):1346-54.
- Hodge, L. M., M. Marinaro, H. P. Jones, J. R. McGhee, H. Kiyono, dan J. W. Simecka. 2001. Immunoglobulin a (IgA) Responses and IgE-Associated Inflammation Along the Respiratory Tract After Mucosal but Not Systemic Immunization. *Infection and*

Immunity. 69(4):2328–2338.

- Islam, S. M. T., Zaman, S., Khan, M. K., Uddin, M. I., Chakraborty S., dan Nishat, N. S. 2018. Multi Epitope Cluster Ep85B within the Mycobacterial Protein Ag85B Elicits Cel-Mediated and Humoral Responses in Mice. *Turkish Journal of Immunology*. 6(3):108-117
- Junttila, I. S. 2018. Tuning the Cytokine Responses: An Update on IL-4 and IL-13 Receptor Complexes. *Frontiers in Immunology*. 9:888.
- Kadioglu, A., J. N. Weiser, J. C. Paton, dan P. W. Andrew. 2008. The Role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*.6(4):288-301.
- Koeri, M. J., G. G. Djelantik, N. E. Dewi, S. A. K. Indriyani, Z. Muttaqin, S. Mudaliana, dan D. Safari. 2008. Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Healthy Children Under Five Years Old in Central Lombok Regency, Indonesia. *Scopus*. 47(9):485-493.
- Kulp, D. W. dan W. R. Schief. 2013. Advances in Structure-Based Vaccine Design. *Current Opinion in Virology*. 3(3):322–331.
- Li, Y., L. Jin, dan T. Chen. 2020. The Effects of Secretory IgA in the Mucosal Immune System. *BioMed Research International*. 2020:1–6.
- Luzina, I. G., A. D. Keegan, N. M. Heller, G. A. W. Rook, T. Shea-Donohue, dan S. P. Atamas. 2012. Regulation of Inflammation by Interleukin-4: A Review of “Alternatives”. *Journal of Leukocyte Biology*. 92(4):753–764.
- McGhee, J. R. dan K. Fujihashi. 2012. Inside the Mucosal Immune System. *PLoS Biology*. 10(9): e1001397.
- Mufida, D. C., K. Handono, S. R. Prawiro, dan S. Santoso. 2018. Identification of Hemagglutinin Protein from *S. pneumoniae* Pili as A Vaccine Candidate by Proteomic Analysis. *Turkish Journal of Immunology*. 6(1).
- Muschiol, S., S. Erlendsson, M.-S. Aschtgen, V. Oliveira, P. Schmieder, C. de Lichtenberg, *et al.* 2017. Structure of The Competence Pilus Major Pilin Comgc in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*. 292(34):14134–14146.
- Musher, D. M., J. G. Gardner, dan A. M. Rueda. 2005. Acute Onset of Pneumococcal Pneumonia Following Instrumentation of the Respiratory Tract. *Open Forum Infectious Disease*. 5(4): ofy047
- Nuccitelli A, Cozzi R, Gourlay LJ, Donnarumma D, Necchi F, Norais N, Telford JL, Rappuoli R, Bolognesi M, Maione D, et al. 2011. Structure-Based Approach to Rationally Design a Chimeric Protein For an Effective Vaccine Against Group B *Streptococcus* infections. *PNAS*. 108:10278–10283.
- Nugraha, J. 2011. Pemetaan Epitop dan Aplikasi Klinisnya. *Indonesian Journal of*

Clinical Pathology and Medical Laboratory. 17(3): 166-170.

Paats, M. S., I. M. Bergen, W. E. J. J. Hanselaar, E. C. Groeninx van Zoelen, H. C. Hoogsteden, R. W. Hendriks, dan M. M. van der Eerden. 2013. Local and Systemic Cytokine Profiles in Non-severe and Severe Community-Acquired Pneumonia. *European Respiratory Journal*. 41(6):1378–1385.

Parkitny, L., J. H. McAuley, P. J. Kelly, F. Di Pietro, B. Cameron, dan G. L. Moseley. 2013. Multiplex Cytokine Concentration Measurement: How Much Do the Medium and Handling Matter? *Mediators of Inflammation*. 2013:1–13.

Paterson, N. G., dan E. N. Baker. 2011. Structure of the Full-Length Major Pilin from *Streptococcus pneumoniae*. *PloS One*. 6(7): e22095

Pletz, M. W., U. Maus, N. Krug, T. Welte, dan H. Lode. 2008. Pneumococcal Vaccines: Mechanism of Action, Impact On epidemiology and Adaption of the Species. *Int J Antimicrob Agents*. 32(3):199-206

Ranuh, I. G. N., H. Suyitno, S. R. S. Hadinegoro, C. B. Kartasmita dan Soejatmiko. 2011. *Pedoman Imunisasi di Indonesia*. Edisi Empat. Jakarta: Satgas Imunisasi IDAI

Sanchez-Trincado, J. L., M. Gomez-Perosanz, dan P. A. Reche. 2017. Fundamentals and Methods for T- and B-cell Epitope Prediction. *Journal of Immunology Research*.

Sato, S. dan H. Kiyono. 2012. The Mucosal Immune System of The Respiratory Tract. *Current Opinion in Virology*. 2(3):225–232.

Setiati, Siti, Idrus Alwi, Aru W. Sudoyo, Marcellus Simadibrata K., Bambang Setiyohadi, dan Ari Fahrlal Syam. *Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi 6. Jakarta: Interna Publishing. 2014.

Song, Z., J. Zhang, X. Zhang, D. Li, H. Wang, X. Xu, *et al.* 2015. Interleukin 4 Deficiency Reverses Development of Secondary *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia During Sepsis-Associated Immunosuppression. *Journal of Infectious Diseases*. 211(10):1616–1627.

Weiser, J. N., D. M. Ferreira, dan J. C. Paton. 2018. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nature Reviews Microbiology*. 16(6):355–367.

Zahroh, H., A. Ma'rup, U. S. F. Tambunan, dan A. A. Parikesit. 2016. Immunoinformatics Approach in Designing Epitope-Based Vaccine Against Meningitis-Inducing Bacteria (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, and *Haemophilus influenzae* type b). *Drug Target Insights*. 10: DTL.S38458.

LAMPIRAN 1 *Ethical Clearance*





Lampiran 2 Surat Ijin Penelitian



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jl Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121
Email : fk@unej.ac.id Website : http://www.fk.unej.ac.id

Nomor : 2401/UN25.1.11/LT/2019
Perihal : Permohonan Ijin Penelitian

14 OCT 2019

Yth. 1. Kepala Laboratorium Mikrobiologi
2. Divisi Hewan Coba
Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Dalam rangka pelaksanaan penelitian Kelompok Riset Mikrobiologi oleh dokter dan mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember, sebagaimana tersebut di bawah ini:

No.	Nama	NIP / NIM
1.	Dr. dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes	197203182003122001
2.	dr. Dini Agustina, M.Biomed	198308012008122003
3.	Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes	197406042001122002
4.	Danang Tejamukti W.	162010101030
5.	Niken Larasati	162010101037

Judul Penelitian : Epitop Protein Pili Sebagai Antigen Vaksin Untuk Mencegah Infeksi
Streptococcus pneumoniae

Waktu Pelaksanaan : Oktober - Desember 2019

Dengan ini kami mengajukan permohonan dapatnya dokter dan mahasiswa tersebut diatas di ijinakan melakukan penelitian dan pengambilan data di Laboratorium Mikrobiologi dan Rumah Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Demikian, atas perhatian dan kerjasamanya disampaikan terima kasih.

Wakil Dekan I,

dr. Ancah Caesarina N.M., Ph.D.
NIP. 19820309 200812 2 002

Tembusan

1. Analis Lab Mikrobiologi FK UNEJ
2. Kasubag Keuangan dan Kepegawaian FK UNEJ

Lampiran 3 Hasil Uji Statistik

UJI NORMALITAS

Tests of Normality

Faktor		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IL-4 asli	Kontrol	.320	9	.008	.730	9	.003
	Ajuvan	.206	9	.200*	.897	9	.234
	Epitope1	.206	9	.200*	.831	9	.045

a. Lilliefors Significance Correction

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

UJI NORMALITAS DATA TRANSFORMASI

Tests of Normality

Faktor		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IL-4 transform	Kontrol	.336	9	.004	.756	9	.006
	Ajuvan	.193	9	.200*	.909	9	.307
	Epitope1	.158	9	.200*	.917	9	.367

a. Lilliefors Significance Correction

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

UJI ANALISIS KRUSKAL-WALLIS

Test Statistics^{a,b}

	IL-4 asli
Chi-Square	.169
df	2
Asymp. Sig.	.919

a. Kruskal Wallis Test

Lampiran 4 Lembar Bebas Plagiasi



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN
Alamat : Jalan Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto, Kota Jember 68121
Telp/Fax : (0331) 337877 - 324446 *Faksimili (0331) 337877
E mail : fk@unej.ac.id / www.fk.unej.ac.id

SURAT REKOMENDASI BEBAS PLAGIASI

Nomor : 761 /UN25.1.11/PT/2020

Komisi Bimbingan KTI dan Publikasi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya peningkatan kualitas dan originalitas karya tulis ilmiah mahasiswa berupa skripsi, telah melakukan pemeriksaan plagiasi atas skripsi mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember di bawah ini:


Nama : Niken Larasati
NIM. : 162010101037
Angkatan : 2016

Judul Skripsi : **Efek Imunisasi Intranasal Epitope Protein Rrgb 214-236
Streptococcus Pneumoniae terhadap Konsentrasi II-4**

Bersama ini kami merekomendasikan dan menyatakan “ Bebas Plagiasi “


Demikian surat rekomendasi ini, atas perhatian saudara kami mengucapkan terima kasih.

Mengetahui,
Wakil Dekan I


dr. Ancah Caesarina Novi M. Ph.D
NIP. 19820309 200812 2 002

28 FEB 2020

Komisi Bimbingan KTI & Publikasi
Ketua,


Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes
NIP. 19740604 200112 2 002

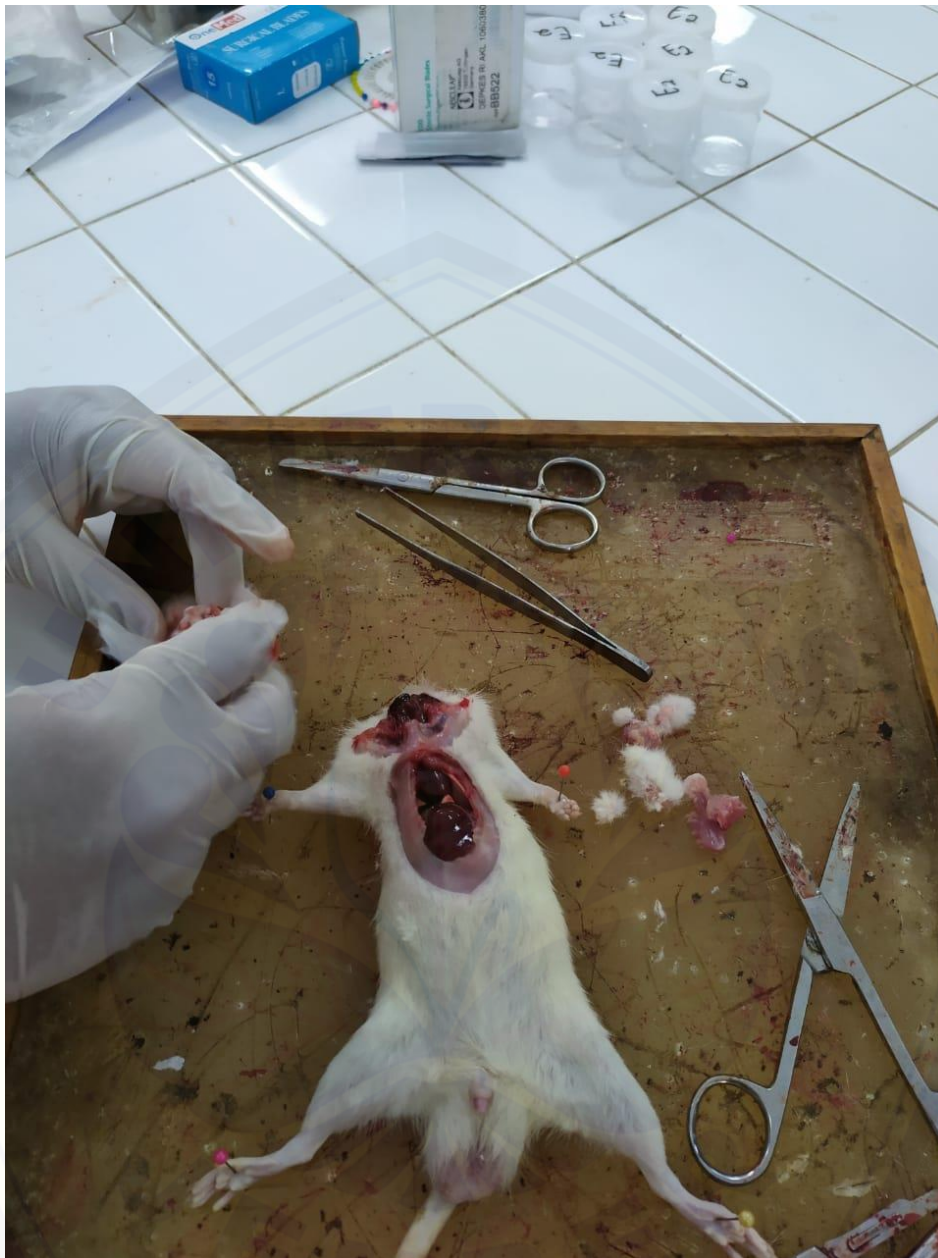
Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian



Proses imunisasi intranasal



Proses imunisasi intranasal bersama analis



Proses terminasi hewan coba



Proses terminasi hewan coba bersama analis



Proses pengambilan bilasan hidung



Sampel bilasan hidung hewan coba



Pengukuran Kadar IL-4 secara ELISA