

Pengaruh Pemberian Imunisasi Intranasal Epitope Protein RrgB 255-270 *Streptococcus pneumoniae* Terhadap Kadar IL-4

Danang Tejamukti Widiatmaja¹, Diana Chusna Mufida^{1*}, Zahrah Febianti¹

¹Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember, Kabupaten Jember, Jawa Timur, Indonesia
E-mail : chusna.fk@unej.ac.id

Abstrak

Streptococcus pneumoniae atau pneumokokus merupakan penyebab penyakit *community acquired pneumoniae* (CAP). Penularan pneumokokus dapat dicegah oleh vaksin, seperti PPV dan PCV. Vaksin tersebut memiliki beberapa kelemahan seperti terbatas pada strain tertentu dan pemberian yang masih bersifat invasif. Pada penelitian ini dilakukan pengembangan vaksin dari epitope pneumokokus yang diberikan secara intranasal. Salah satu epitope yang dapat digunakan sebagai kandidat vaksin adalah epitope dari protein RrgB penyusun pili, seperti epitope protein RrgB 255-270 dari bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang memiliki komponen antigenik tinggi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian imunisasi intranasal epitope protein RrgB 255-270 *Streptococcus pneumoniae* terhadap kadar IL-4. Kadar IL-4 diukur dengan metode ELISA dari bilasan hidung tikus wistar yang diimunisasi dengan epitope protein RrgB 255-270 *S. pneumoniae* secara intranasal. Bilasan hidung yang didapat akan diproses menggunakan metode ELISA untuk menghitung kadar IL-4. Nilai rata-rata kadar IL-4 pada K1 adalah $28,852 \pm 18$ ng/L, rata-rata kadar IL-4 pada K2 adalah $20,630 \pm 9$ ng/L dan rata-rata pada K3 adalah $18,519 \pm 6$ ng/L. Hasil uji ANOVA *Welch* menunjukkan nilai p sebesar 0,299. Dapat disimpulkan bahwa imunisasi intranasal epitope protein RrgB 255-270 *S. pneumoniae* memberikan perbedaan yang tidak signifikan (dengan $p > 0,05$).

Kata kunci: Epitope, Pili, *S. pneumoniae*, IL-4

Abstract

Effect of Intranasal Immunization Epitope Protein RrgB 255-270 *Streptococcus pneumoniae* to IL-4 Level. *Streptococcus pneumoniae* or pneumococcus is the main cause of community acquired pneumoniae (CAP). Infection of pneumococcal can be prevented by vaccines, like PPV and PCV. Those vaccines have several weaknesses, like, limited to several strain of bacteria and invasive. Nowadays, development of pneumococcal vaccines used the antigenic component of which occur on the bacteria, like epitope. One of the epitopes that can be used as vaccine candidate is epitope from RrgB protein of bacteria's pili. One of the RrgB protein's epitope that has been identified having antigenic property is epitope protein RrgB 255-270 of *Streptococcus pneumoniae* bacteria's pili. That epitope will stimulate immune system to produce antibody against the antigen supported by cytokine, like IL-4. This research aim is to knowing the effect of intranasal immunization epitope protein RrgB 255-270 *Streptococcus pneumoniae* to IL-4 level. Wistar rat's nasal rinse sample IL-4 levels measured by ELISA method. The mean of K1 is $28,852 \pm 18$ ng/L, K2 is 20.630 ± 9 ng/L and K3 is 18.519 ± 6 ng/L. Result of *Welch* ANOVA test shows that p-value of this research is 0.299. That can be concluded that the effect of intranasal immunization epitope protein RrgB 255-270 *S. pneumoniae* give non-significant difference (p-value > 0.05).

Keywords: Epitope, Pili, *S. pneumoniae*, IL-4

1. Pendahuluan

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) atau pneumokokus merupakan salah satu bakteri paling umum penyebab *Community Acquired Pneumonia* (CAP).¹ Pneumokokus menyebabkan berbagai infeksi seperti otitis media, CAP, sepsis, dan meningitis. *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa pada tahun 2015 diperkirakan terdapat 156 juta kasus pneumonia dan sebanyak 2 juta bayi meninggal setiap tahunnya.² Pneumonia merupakan penyakit penyebab kematian bayi terbanyak di dunia pada tahun 2010. Sebanyak 30-50% kasus tersebut disebabkan oleh *S. pneumoniae*. *Streptococcus pneumoni-ae* merupakan bakteri Gram positif yang biasa berkolonisasi di permukaan mukosa saluran pernapasan atas manusia.³

Tahap awal infeksi pneumokokus adalah penempelan bakteri ke sel *host* yang diperantarai oleh protein adhesi dan reseptor sel *host*. Pili memegang peran penting dalam penempelan bakteri pada sel *host* dan didukung oleh protein-protein yang ada pada permukaan bakteri. Bakteri Gram positif memiliki pili yang panjang, tipis dan kuat yang telah dibuktikan juga bahwa pili tersebut dapat membantu kolonisasi bakteri dan pembentukan biofilm.³ Pili pneumokokus tersusun dari protein yaitu RrgA, RrgB dan RrgC yang diikat oleh 3 enzim sortase. Pili *S. pneumoniae* merupakan salah satu faktor virulensi bakteri dalam menyebabkan infeksi pada manusia. Salah satu protein pili yang memiliki komponen antigen tinggi yaitu RrgB. Secara insilico, protein RrgB memiliki 5 epitope dengan susunan asam amino yang memiliki panjang antara 13-23. Komponen tersebut menjadikan protein RrgB sebagai kandidat vaksin yang bisa dikembangkan untuk pencegahan infeksi pneumococcal.³

Vaksin yang digunakan untuk infeksi *S. pneumoniae* saat ini adalah PPV23 (*23-Valent Pneumococcal Polyssacharide Vaccine*) dan PCV13 (*13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine*). Kelemahan vaksin PPV dan PCV yaitu keterbatasan *strain* bakteri pneumokokus yang terdapat dalam kandungan vaksin tersebut. Hanya terdapat 23 strain bakteri yang terkandung dalam PPV dan 13 strain bakteri yang terkandung dalam PCV. Kelemahan lain dari vaksin PPV dan PCV yaitu vaksin PPV dan PCV diberikan secara intramuskular sehingga bersifat invasif. Pengembangan vaksin pneumokokus saat ini menggunakan faktor virulensi bakteri. Faktor virulensi bakteri terdiri dari kapsul, protein fungsional, protein permukaan, dan pili.³

Imunisasi dengan komponen bakteri akan mengaktivasi sistem imun. Sistem imun akan mensekresikan sitokin yang berperan dalam proses infeksi akan disekresikan oleh tubuh. Sitokin ini akan mengaktivasi sel T-helper menjadi Th2 yang kemudian mengakibatkan produksi sitokin lain semakin banyak seperti IL-4.⁴ Interleukin 4 merupakan biomarker penting dalam beberapa penyakit salah satunya pneumonia.⁵ Interleukin 4 akan merangsang sel imun untuk melawan infeksi patogen seperti merangsang sel B limfosit untuk memproduksi antibodi atau merangsang sel T limfosit untuk berdiferensiasi menjadi sel T-helper atau sel T sitotoksik.⁶ Interleukin 4 juga bekerja dengan menekan sitokin proinflamasi yang timbul ketika terdapat infeksi seperti pada penderita pneumonia. Pada penderita pneumonia, peningkatan kadar IL-4 lebih dominan daripada sitokin antiinflamasi lain seperti, IL-17 atau IL-13. Peningkatan kadar IL-4 merupakan respon tubuh untuk menghambat produksi sitokin proinflamasi dan pembersihan patogen penyebab infeksi.⁷

Adanya kelemahan dari vaksin PPV dan PCV, maka perlu dikembangkan vaksin pneumokokus menggunakan protein yang terdapat pada faktor virulensi bakteri (*protein-based vaccine*) dengan mempertimbangkan efektifitas dari vaksin tersebut. Pemberian secara intranasal juga sesuai dengan patogenesis infeksi pneumonia dan tidak bersifat invasif. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh imunisasi intranasal epitope protein RrgB 255-270 *Streptococcus pneumoniae* terhadap IL-4.

2. Metode

Sebanyak 30 Tikus Wistar jantan, usia 12-16 minggu dibagi menjadi 3 kelompok. K1 diberikan imunisasi *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dengan volume total 40 μ L secara intranasal. K2 diberikan imunisasi PBS dengan volume 40 μ L yang mengandung ajuvan saja yaitu 2 μ L CTB (*Cholera Toxin B*) dan K3 diberikan imunisasi dengan volume 40 μ L PBS, 2 μ L CTB dan 20 μ L epitope protein RrgB 255-270 *Streptococcus pneumoniae*. Bahan-bahan tersebut diberikan sebanyak 20 μ L pada setiap lubang hidung tikus secara intranasal. Semua tikus diimunisasi setiap minggu sebanyak 3 kali. Satu minggu setelah imunisasi terakhir, tikus diterminasi dengan menggunakan eter dan dilakukan pembedahan dan pengambilan saluran pernapasan tikus. Isolasi bilasan hidung dilakukan dengan memasukkan 1-2 ml larutan saline steril melalui trakea dan tetesan larutan saline lewat hidung ditampung dengan Eppendorf steril. Setelah isolasi bilasan hidung, kulit kepala tikus dibersihkan, rahang bawah diambil dan dibuang kemudian dilakukan pengambilan jaringan nasofaring.

Kadar IL-4 dari bilasan hidung diukur menggunakan *BioAssay ELISA kit* untuk IL-

4 sesuai dengan prosedur. Sampel sebanyak 40 μ L dan standart sebanyak 50 μ L dimasukkan kedalam setiap *well* dimana 6 *well* pertama berisi standart. Kemudian 10 μ L antibodi IL-4 ditambahkan pada *well* yang berisi sampel. Kemudian 50 μ L HRP-Streptavidin ditambahkan pada semua *well* kecuali standart 0. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Semua *well* di cuci menggunakan *wash buffer* sebanyak 5 kali dengan setiap kali pencucian dilakukan selama 30 detik sampai 1 menit. Setelah diinkubasi, 50 μ L *substrate solution A* dan 50 μ L *substrate solution B* ditambahkan pada semua *well* dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C di tempat gelap. 50 μ L *stop solution* ditambahkan pada setiap *well* untuk menghentikan reaksi antigen antibodi. Hasil ELISA dibaca pada *optical density* (OD) dengan panjang gelombang 450nm.

Analisis statistik dilakukan untuk membandingkan kadar IL-4 bilasan hidung menggunakan ANOVA jika data terdistribusi normal dan bersifat homogen. Batas signifikansi yang digunakan adalah 0,05 ($p > 0,05$). Jika data tidak homogen, maka uji statistik dilakukan dengan menggunakan uji ANOVA *Welch*.

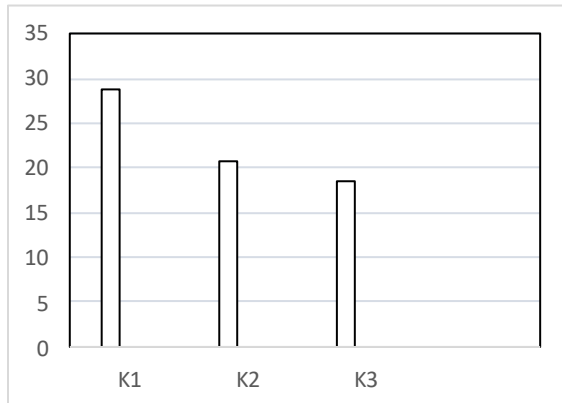
3. Hasil

Hasil pengukuran kadar IL-4 dengan menggunakan metode ELISA dapat dilihat pada Tabel 1. Dan Gambar. 1 dimana kadar IL-4 tertinggi terdapat pada K1 dan kadar IL-4 terendah terdapat pada K3.

Tabel 1. Kadar IL-4 Bilasan Hidung

No	Kelompok	Kadar IL-4 (ng/L)
1	K1	28.852 \pm 18
2	K2	20.630 \pm 9
3	K3	18.519 \pm 6

Gambar 1. Grafik Kadar IL-4 Bilasan Hidung



K1 diberikan imunisasi *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dengan volume total 40 μ L secara intranasal. K2 diberikan imunisasi PBS dengan volume 40 μ L yang mengandung ajuvan saja yaitu 2 μ L CTB (*Cholera Toxin B*) dan K3 diberikan imunisasi dengan volume 40 μ L PBS, 2 μ L CTB dan 20 μ L epitope protein RrgB 255-270 *S. pneumoniae*.

Uji analisis statistik menggunakan uji *Welch ANOVA*. Hasil uji *Welch ANOVA* didapatkan nilai p sebesar 0,299. Nilai p yang lebih besar dari 0,05 menunjukkan pengaruh imunisasi epitope protein RrgB *Streptococcus pneumoniae* memberikan perbedaan yang tidak signifikan terhadap perubahan kadar IL-4.

4. Pembahasan

Pneumonia merupakan salah satu infeksi saluran pernapasan yang diakibatkan oleh bakteri pneumokokus yang dapat dicegah penularannya dan persebarannya dengan menggunakan vaksin. Vaksin pneumokokus yang berkembang saat ini adalah vaksin pneumokokus berbasis epitope.

Epitope merupakan salah satu komponen yang terdapat pada molekul antigen. Epitope dipilih sebagai bahan dasar vaksin karena epitope dapat

mewakili zat antigenik patogen. Penelitian telah dilakukan oleh Kulp dan Schief (2013) dengan mengisolasi salah satu epitope dari Bakteri *Streptococcus* Group B yang kemudian diimunisasikan ke hewan coba tikus. Hasil dari penelitian tersebut adalah hewan coba tikus yang diimunisasikan oleh epitope mensekresikan antibodi spesifik terhadap strain bakteri yang digunakan untuk mengisolasi epitope tersebut. Kelemahan penggunaan epitope dalam pengembangan vaksin yaitu mendapatkan satu epitope cukup sulit, untuk satu epitope setidaknya dibutuhkan 2 atau lebih *protein backbones*.⁸ Hal ini menunjukkan bahwa, respon imun dalam pembentukan antibodi yang dirangsang oleh epitope relatif sama dengan respon imun yang dirangsang oleh protein utuh yang bersifat antigen dari suatu bakteri.

Antigen yang masuk ke dalam tubuh manusia akan dikenali dan tubuh akan memproduksi sitokin sebagai respon untuk melawan antigen. Respon imun mukosa dalam memproduksi antibodi dibantu oleh jaringan limfoid yang ada pada mukosa, pada saluran pernapasan dibantu oleh jaringan limfoid yang ada pada mukosa nasofaring. Interleukin yang di-produksi seperti IL-4 akan membantu diferensiasi sel B limfosit menjadi sel plasma dan sel T limfosit menjadi sel T helper dan sel T sitotoksik. Sel T helper dalam merangsang *germinal center* untuk maturasi sel B limfosit dirangsang oleh IL-4. Maturasi sel B limfosit dan rangsangan IL-4 dalam diferensiasi sel B limfosit sel plasma, mengakibatkan terbentuknya antibodi spesifik dalam melawan antigen. Respon imun pada mukosa memiliki antibodi spesifik yang disekresikan oleh jaringan limfoid yang ada pada mukosa saluran pernapasan yaitu IgA.⁹

Hasil uji analisis data menggunakan metode *Welch* ANOVA dengan data yang didapat dari perhitungan kadar IL-4 dengan ELISA didapatkan nilai p sebesar 0,689. Nilai tersebut lebih besar dari 0,05. Hasil ini menunjukkan bahwa perbedaan yang diakibatkan oleh pemberian perlakuan bersifat tidak signifikan dilihat dari kadar IL-4 pada K1, K2 dan K3. Dari data yang terdapat pada Tabel 1 di atas, menunjukkan bahwa kadar IL-4 pada K1 relatif lebih tinggi daripada K2 dan K3, namun seperti yang kita ketahui K1 merupakan kelompok kontrol. Hal ini berlawanan dengan hipotesis penelitian yang mengharapkan kadar IL-4 pada K1 lebih rendah daripada K2 dan K3.

Hasil di atas dapat dipengaruhi oleh beberapa hal, seperti, respon imun yang berbeda-beda, respon imun yang baik akan lebih cepat mengeliminasi antigen yang ada pada tubuh, dan respon imun yang buruk akan lebih lama mengeliminasi patogen dalam tubuh. Pada teorinya, IL-4 akan merangsang sel B berdiferensiasi menjadi sel plasma yang akan mensekresikan antibodi spesifik terhadap antigen tertentu.¹⁰ Terminasi hewan coba dilakukan 1 minggu setelah pemberian perlakuan terakhir pada minggu ke 3. Pemberian perlakuan dimulai sejak minggu ke 1 setelah aklimatisasi, sehingga respon imun dalam pembentukan antibodi terhadap antigen yang diimunitasikan kepada hewan coba sudah mulai bekerja setelah perlakuan pertama. Terdapat kemungkinan kadar IL-4 pada minggu ke 4 sebelum terminasi sudah mulai rendah, dikarenakan produksi antibodi IgA oleh respon imun mukosa sudah tinggi. Pada pembentukan antibodi dalam melawan antigen, terdapat beberapa komponen yang bekerja secara bersamaan. *Germinal center* (GC) memiliki peran penting dalam regulasi immunoglobulin. *Germinal center*

memiliki peran untuk maturasi sel B limfosit dibantu oleh beberapa sitokin seperti IL-2, IL-4, IL-6, dan IL-10. Peran IL-4 sebagai sitokin antiinflamasi mempengaruhi reaksi GC dalam mengaktivasi sel B dan merangsang diferensiasi sel B limfosit menjadi sel plasma. Diferensiasi sel B limfosit menjadi sel plasma diperlukan untuk produksi antibodi terhadap antigen.⁹ Kadar IL-4 yang tinggi menunjukkan bahwa tubuh sedang melawan suatu antigen tertentu yang masuk ke dalam tubuh. Kadar IL-4 yang rendah atau relatif normal menunjukkan bahwa tubuh dalam keadaan baik-baik saja atau antibodi yang diproduksi oleh tubuh sudah cukup untuk melawan antigen yang ada dalam tubuh.¹¹

Interleukin 4 yang diproduksi membantu tubuh dalam mengaktivasi dan merangsang diferensiasi dari sel B limfosit dan sel T limfosit. Sel B limfosit yang telah berdiferensiasi menjadi sel plasma akan memproduksi antibodi spesifik terhadap patogen. Pada lapisan mukosa, sebagian besar antibodi yang diproduksi adalah immunoglobulin A, yang dapat berinteraksi dan mengeliminasi beberapa mikroorganisme atau antigen yang masuk ke dalam tubuh. IgA yang disekresikan pada lapisan mukosa biasa disebut sIgA. IgA terus diproduksi oleh sel plasma selama patogen atau antigen yang ada pada tubuh belum berhasil dieliminasi.¹² Produksi IgA secara terus menerus dalam melawan penyebab penyakit membuat tubuh juga mensekresikan IL-4 untuk membantu diferensiasi sel B limfosit menjadi sel plasma. Hal ini dapat membuat kadar IL-4 dalam tubuh relatif lebih tinggi daripada ketika tubuh dalam keadaan sehat. Pada penelitian ini, kadar IL-4 yang rendah dapat diakibatkan oleh keadaan dimana kadar IgA yang diproduksi oleh sistem imun tikus dalam melawan antigen yang diimunitasikan

secara intranasal sudah cukup untuk mengeliminasi antigen tersebut. Kadar IgA yang cukup tinggi akan mempengaruhi keseimbangan kadar sitokin dalam tubuh. Hal ini membuat tubuh akan melakukan down regulasi dalam produksi atau sekresi IL-4 sehingga kadar IL-4 dalam tubuh kembali dalam keadaan normal.

Pada tahun 2001, Hodge *et al.*, melakukan penelitian yang sama untuk melihat pengaruh pemberian imunisasi intranasal dari virus influenza dalam pembentukan antibodi spesifik yaitu IgA. Penelitian tersebut menggunakan tikus betina jenis BALB/c dan bahan-bahan yang digunakan adalah antigen yang berasal dari influenza serta *immunomodulator* berupa *cholera toxin*. Hasil penelitian Hodge *et al.*, (2001) menunjukkan bahwa IgA yang diukur dari serum tikus setelah perlakuan menunjukkan peningkatan yang signifikan dibandingkan dengan tikus kontrol produksi IgA tertinggi terdapat pada hari ke 21 setelah imunisasi pertama yang dilakukan.¹³ Hal tersebut mungkin juga terjadi pada penelitian ini, dimana, tikus diterminasi pada minggu ke 4. Kadar IgA pada tikus mulai tinggi sejak minggu ke 3 setelah imunisasi mengakibatkan produksi IL-4 dalam hal membantu produksi IgA mulai diturunkan, sehingga kadar IL-4 pada minggu ke 4 sudah berada pada kadar yang rendah.

Menurut Parkitny *et al.*, (2013), pengukuran kadar IL-4 lebih baik dilakukan dari sampel serum atau plasma, dikarenakan kadar IL-4 yang terdapat dalam serum atau plasma relatif stabil.¹⁴ Pada penelitian ini, pengukuran kadar IL-4 menggunakan sampel bilasan hidung tikus Wistar yang telah diimunisasikan antigen berupa epitope protein RrgB 255-270 *S. pneumoniae*. Pengambilan sampel dilakukan dengan mengalirkan buffer saline melalui trakea tikus yang kemudian

buffer saline yang keluar dari lubang hidung tikus tersebut akan ditampung pada Eppendorf. Terdapat kemungkinan, metode pengambilan sampel ini tidak bisa melarutkan seluruh IL-4 yang terdapat pada saluran pernapasan karena buffer saline hanya dialirkan melalui saluran pernapasan. Hal ini dapat berpengaruh terhadap hasil penelitian karena pengukuran kadar IL-4 yang bagus dilakukan pada bilasan hidung pertama yang diambil dari saluran pernapasan hewan coba.

5. Kesimpulan

Pemberian imunisasi intranasal epitope protein RrgB 255-270 *Streptococcus pneumoniae* memberikan perbedaan yang tidak signifikan terhadap kadar IL-4 tikus

Daftar Pustaka

1. Steel HC, Cockeran R, Anderson R, Feldman C. Overview of community-acquired pneumonia and the role of inflammatory mechanisms in the immunopathogenesis of severe pneumococcal disease. *Mediators Inflamm.* 2013;2013.
2. Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav Z, Mulholland K, Campbell H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bull World Health Organ.* 2008;86:408-416B.
3. Tanımlanması P. Identification of hemagglutinin protein from *Streptococcus pneumoniae* pili as a vaccine candidate by proteomic analysis. *Turk J Immunol.* 2018;6(1):8–15.
4. Hermawati I, Herman H, Agoes R. Uji Validasi Kadar Interleukin-4 (IL-4) Sebagai Alternatif Uji Diagnosis Infeksi Kecacingan. *Maj Kedokt Bandung.* 2016;48(4):211–5.

5. Wang R-S, Jin H-X, Shang S-Q, Liu X-Y, Chen S-J, Jin Z-B. Associations of IL-2 and IL-4 expression and polymorphisms with the risks of mycoplasma pneumoniae infection and asthma in children. *Arch Bronconeumol* (English Ed. 2015;51(11):571–8.
6. Junttila IS. Tuning the cytokine responses: an update on interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes. *Front Immunol*. 2018;9:888.
7. Song Z, Zhang J, Zhang X, Li D, Wang H, Xu X, et al. Interleukin 4 deficiency reverses development of secondary *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia during sepsis-associated immunosuppression. *J Infect Dis*. 2015;211(10):1616–27.
8. Kulp DW, Schief WR. Advances in structure-based vaccine design. *Curr Opin Virol*. 2013;3(3):322–31.
9. Boyaka PN. Inducing mucosal IgA: a challenge for vaccine adjuvants and delivery systems. *J Immunol*. 2017;199(1):9–16.
10. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology 8th edition. California: Saunders; 2014.
11. Jackson DA, ElSawa SF. Factors regulating immunoglobulin production by normal and disease-associated plasma cells. *Biomolecules*. 2015;5(1):20–40.
12. Li Y, Jin L, Chen T. The effects of secretory IgA in the mucosal immune system. *Biomed Res Int*. 2020;2020:1–6.
13. Hodge LM, Marinaro M, Jones HP, McGhee JR, Kiyono H, Simecka JW. Immunoglobulin A (IgA) responses and IgE-associated inflammation along the respiratory tract after mucosal but not systemic immunization. *Infect Immun*. 2001;69(4):2328–38.
14. Parkitny L, McAuley JH, Kelly PJ, Di Pietro F, Cameron B, Moseley GL. Multiplex cytokine concentration measurement: how much do the medium and handling matter? *Mediators Inflamm*. 2013;2013:1–13.