

Susu Kuda Sumbawa Terfermentasi sebagai *Immunostimulant* untuk 37.8 kDa *V. Cholerae Vaccine*

Sumbawa Fermented Horse Milk as Immunostimulants for 37.8 kDa V. Cholerae Vaccine

Faisal¹, Sumarno², Kusworini Handono³

¹ Akademi Analisis Kesehatan Malang

²Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

³Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRAK

Protein adhesi subunit pili berat molekul 37,8 kDa *V.cholerae* 01 merupakan salah satu faktor diare. Protein tersebut mempunyai potensi menginduksi respon imun mukosal sehingga dapat menjadi kandidat vaksin yang poten. Tujuan penelitian adalah membuktikan bahwa susu kuda Sumbawa terfermentasi dapat meningkatkan potensi protein adhesi subunit pili berat molekul 37,8 kDa *V.cholerae* 01 yang dikonjugasi dengan toksin kolera subunit B dalam menginduksi respon imun mukosal s-IgA dan mencegah sekresi cairan pada usus mencit. Metode penelitian ini adalah studi eksperimental dengan menggunakan mencit Balb/c. Isolasi protein adhesi subunit pili berat molekul 37,8 kDa bertingkat dengan menggunakan *pili cutter*, dilanjutkan SDS-PAGE. Susu kuda Sumbawa terfermentasi diberikan setiap hari dengan dosis 0.4 ml/20gr BB mencit. Imunisasi dilakukan dengan memberikan protein adhesi berat molekul 37,8 kDa yang dikonjugasi dengan toksin kolera sub unit B. Pengukuran kadar s-IgA menggunakan metode ELISA. Uji protektifitas menggunakan usus imunisasi dengan paparan susu kuda Sumbawa terfermentasi yang diberi bakteri *V.cholerae* 01. Di hitung volume akhir cairan sebagai indikator berat usus. Analisis data menggunakan ANOVA dan *Tukey's test*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar s-IgA pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi susu kuda dan protein 37,8 kDa konjugasi CTB ($p=0.00$). Pada uji protektifitas juga menunjukkan perbedaan berat usus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberikan susu kuda dan protein 37,8 kDa konjugasi CTB ($p=0.02$). Dapat disimpulkan, pemberian peroral susu kuda Sumbawa terfermentasi dapat meningkatkan potensi protein adhesi *Vibrio cholera* 01 subunit pili berat molekul 37,8 kDa yang dikonjugasi dengan toksin kolera subunit B dalam menginduksi respon imun S-IgA secara bermakna dan bersifat protektif mencegah sekresi cairan pada usus mencit Balb/C.

Kata Kunci: *Cholera toxin subunit B*, protein adhesi 37,8 kDa *V.cholerae* 01, susu kuda Sumbawa terfermentasi, s-IgA, usus mencit Balb/C

ABSTRACT

The adhesion protein subunit molecular weight of 37.8 kDa pili V.cholerae 01 is a diarrhea factor. This protein has the potential activity in inducing mucosal immune responses which can be a potent vaccine candidate. The purpose of this research was to prove that Sumbawa fermented horse milk can increase the potential activity of adhesion protein subunit molecular weight of 37.8 kDa pili V.cholerae 01 that conjugated with cholera toxin B subunit inducing immune responses of mucosal s-IgA and preventing the secretion of fluid in the intestine of mice. This research method was an experimental study using mice Balb /c. Isolation of protein adhesion pili subunit molecular weight of 37.8 kDa was done using pili cutter, followed by SDS-PAGE. Sumbawa horse milk fermented given daily at a dose of 0.4 ml/20gr BB mice. Immunization was done using adhesion proteins of molecular weight 37.8 kDa that conjugated with cholera toxin subunit B. Measurement of s-IgA levels using ELISA method. Gut protectivity test was performed using intestine that has been immunized with fermented milk exposed with V.cholerae 01. Final volume of fluid was used as an indicator of intestinal weight. Data analysis is done using ANOVA and Tukey's test. The results showed that there was a difference in level of s-IgA between the control group and treatment group ($p = 0.00$). Protectiveness test also showed a difference in bowel weight between the control group and treatment group ($p = 0.02$). It can be concluded, oral administration of Sumbawa fermented horse milk can increase the potential activity for adhesion of Vibrio cholerae 01 protein subunit molecular weight of 37.8 kDa pili when conjugated with cholera toxin B subunit inducing an immune response of S-IgA and was significantly protect and prevent the secretion of fluid in the intestine of mice Balb /C.

Keywords: Balb/C mice's intestine, cholera toxin subunit B, fermented Sumbawa Horse's milk, protein adhesion 37,8 kDa *V.cholerae* 01, s-IgA

PENDAHULUAN

Diare akut sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan, tidak saja di negara berkembang tetapi juga di negara maju. Penyakit diare sering menimbulkan Kejadian Luar Biasa (KLB) dengan angka kematian yang masih tinggi. Angka kejadian diare di negara berkembang menyebabkan kematian sekitar tiga juta penduduk tiap tahunnya. Di Indonesia dari 2.812 pasien diare yang datang ke rumah sakit di beberapa propinsi di Indonesia yang dianalisis dari tahun 1995 sampai dengan 2001 penyebab terbanyak adalah infeksi oleh bakteri (1).

Terjadinya infeksi *V.cholera* 01 pada manusia disebabkan oleh masuknya bakteri ini ke dalam saluran pencernaan melalui makanan dan minuman. Masa inkubasi tergantung pada jumlah kuman yang masuk dan daya tahan tubuh. Pada umumnya terjadi antara 12 jam dan 72 jam. Apabila dibandingkan dengan bakteri patogen yang lain jumlah bakteri yang masuk untuk menimbulkan penyakit relatif besar. Hal ini disebabkan karena *V.cholera* 01 sangat tidak tahan terhadap suasana asam lambun (2).

Terjadinya diare pada penderita kolera disebabkan adanya kenaikan sekresi aktif klorida dan bikarbonat dalam lumen usus dan sebaliknya terjadi penurunan reabsorpsi NaCl. Kedua kejadian tersebut disebabkan oleh toksin kolera sub unit A yang berfungsi meningkatkan aktifitas *enzym adenilate cyclase* untuk memecah ATP menjadi cAMP. cAMP merupakan *second messenger* untuk menghambat absorpsi NaCl dan meningkatkan sekresi NaCl serta bikarbonat pada lumen usus yang akan disertai dengan H₂O sehingga timbul diare (3).

Patogenesis kolera dapat dibagi dalam dua tahap. Tahap awal adalah masuknya *V.cholera* 01 dalam saluran pencernaan dengan mengadakan perlekatan pada epitel usus halus. Tahap kedua bakteri akan memiliki kemampuan dalam memperbanyak diri. Selama kejadian tahap yang kedua *V.cholera* akan mampu memproduksi bahan hasil metabolisme, di antara bahan tersebut dapat menyebabkan diare. Contoh dari bahan tersebut adalah *toxin, haemolysin, neuraminidase, dan protease* (4).

Salah satu usaha untuk mengatasi permasalahan penyakit kolera adalah dengan melakukan vaksinasi. Vaksin kolera yang diharapkan antara lain: mengandung molekul toksin kolera subunit B dan molekul adhesi, dapat diberikan peroral, tidak menimbulkan diare, dan kekebalannya dapat dipertahankan dalam jangka waktu yang lama (5). Penelitian sebelumnya ditemukan kandidat vaksin yang merupakan gabungan dari molekul adhesi sub unit pili 37,8 kDa dan toksin sub unit B *V.cholerae* dapat menghambat keluarnya cairan usus (diare) pada mencit yang diimunisasi dengan kandidat vaksin tersebut (6).

Respon imun *mukosal* paling berperan pada usus adalah Imunoglobulin A (sIgA). Imunoglobulin A banyak ditemukan pada permukaan saluran cerna dan saluran napas. Fungsi utama sIgA adalah mencegah melekatnya kuman patogen (*Vibrio cholerae*) pada dinding saluran cerna dan menghambat perkembangbiakan kuman di dalam saluran cerna (7).

Salah satu cara meningkatkan respon imun adalah peningkatan kemampuan fagositosis sel-sel fagosit terhadap benda asing yang masuk ke dalam tubuh, di

antaranya dengan menggunakan produk pangan, baik dari tanaman maupun hewan yang berfungsi sebagai pangan kesehatan dan obat (*nutraceuticals*). Susu mempunyai komponen aktif sebagai pangan kesehatan dan obat (*nutraceuticals*) karena kaya akan nutrisi yang berpengaruh terhadap aktivitas biologis, diantaranya pencegahan dan pengobatan penyakit diare, penyerapan mineral yang kurang sempurna dan immunodefisiensi. Selain itu, *whhey* protein susu kuda Sumbawa mengandung *laktoferin, laktoperoksidase, lizozim* dan *immunoglobulin* yang sering disebut sebagai protein antimikroba (8).

Hasil penelitian secara *in vitro* susu kuda Sumbawa mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Shigella flexineri, Vibrio cholerae*. Susu kuda Sumbawa dilaporkan mempunyai aktivitas anti mikrobal dengan spektrum yang cukup luas. Tetapi penghambatan yang didapatkan berasal dari komponen bahan aktif hasil ekstraksi langsung dari susu kuda Sumbawa. Penghambatan bakteri asam laktat terhadap patogen melalui produksi asam laktat serta asam organik lainnya seperti asetat serta adanya hidrogen peroksida (9).

Beberapa kajian menyebutkan susu kuda Sumbawa terfermentasi sebagai *immunomodulatory* mengandung *Lacto bacillus*, serta dapat melisis sel bakteri, meningkatkan respon imun antara lain meningkatkan produksi IgA, IgG dan mengaktifasi makrofag serta respon antibodi spesifik terhadap antigen asing (9). Pemberian protein susu kuda Sumbawa pasteurisasi dan fermentasi dapat menstimulasi respon IgA dan IgE dalam serum mencit Balb/c, dan menstimulasi aktivitas fagositosis makrofag (10). Studi *in vivo* pemberian susu kuda Sumbawa terfermentasi peroral dapat meningkatkan imunitas terhadap vaksin hepatitis A pada mencit Balb/c sehingga kadar IgG (IgG2a, IgGb, IgG3) IgM dan IgA secara signifikan mengalami peningkatan dibandingkan kontrol (7).

Berdasarkan latar belakang diatas, diteliti bagaimana pengaruh susu kuda Sumbawa terfermentasi terhadap potensi protein adhesi sub unit pili 37,8 kDa *V.cholerae* 01 yang dikongjugasi CTB (*cholera toxin*) dalam menginduksi respon imun mukosal, sehingga dapat mencegah timbulnya diare.

METODE

Rancangan penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan penelitian *post test group design*. Dalam penelitian ini sebagai perlakuan adalah pemberian susu kuda Sumbawa, CTB, protein adhesin 37,8k Da kongjugasi CTB. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Mikrobiologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan hewan coba mencit Balb/c, yang diberikan imunisasi secara peroral materi molekul protein adhesi 37,8 kDa kongjugasi CTB, CTB dan susu kuda Sumbawa terfermentasi yang sebelumnya masing-masing mencit diberikan larutan *natrium bikarbonat* 0,2 ml. Penggunaan CTB sebagai *adjuvant* oleh karena disebutkan CTB memiliki reseptor pada usus dan merupakan *adjuvant* mukosal yang poten (11). Kelompok

perlakuan dibagi atas 4 kelompok dengan 6 ekor mencit tiap perlakuan. Dengan demikian semua mencit yang digunakan dalam percobaan ini berjumlah 24 ekor mencit, yaitu; (a). Kelompok I (kontrol negatif) merupakan kelompok yang tidak dikenai perlakuan (*aquades* 0,4 ml/20gr/BB). (b). Kelompok II (kontrol positif); diberi susu kuda dosis 0,4 ml/20gr/BB. (c). Kelompok III; diberi susu kuda dosis 0,4 ml/20gr/BB, CTB dosis 7µg/0,3 ml PBS. (d). Kelompok IV; diberi susu kuda dosis 0,4 ml/20gr/BB, protein adhesin 37,8 kDa *V.cholera* 01 konjugasi CTB dengan dosis 250 µg/0,3 ml PBS (12).

Kultur *V.cholerae* 01

Bakteri yang digunakan adalah *V.cholerae* 01 yang berasal dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Medium yang digunakan adalah TCG yang dapat memperkaya pertumbuhan pili *V.cholerae* 01. Medium ini mengandung 0,02 % *thioproline*; 0,3 % NaHCO₃; 0,1 % mono sodium l-glutamat, 1 % *bactotrypton*; 0,2 % *yeast extract*; 0,5 % NaCl; 2 % bacto agar dan mM *B-amino ethyl ether, tetra acid* (EGTA) (13). Medium dibuat dengan botol ukuran 250 ml secara miring sebanyak 20 botol. Setiap botol tersebut diisi medium TCG masing-masing sebanyak 50 ml. *Vibrio cholera* yang dipilih tersebut diatas dibiakkan pada cawan petri yang mengandung media TCBS yang kemudian dieramkan pada suhu 24°C selama 24 jam. Hasil biakan pada media TCBS tersebut dipanen dengan menggunakan kerokan dimana sebelumnya telah dituangi dengan PBS steril pada pH 7,4 sebanyak 10 ml. Suspensi bakteri dari hasil kerokan kemudian dimasukkan dalam botol yang mengandung 1000 ml larutan brain heart infusion broth (BHI). Botol kemudian dikocok kuat selama 30 menit pada penangas air pada suhu 37°C. Selanjutnya dari botol tersebut suspensi bakteri sebanyak 10 ml dimasukkan dalam masing-masing botol yang telah mengandung medium TCG dan kemudian dilakukan pengeraman pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam.

Metode Isolasi Pili *V.cholerae* 01

Isolasi yang dikerjakan merujuk seperti penelitian Ehara (1988) dengan modifikasi penggunaan pili cutter desain Sumarno (2000). Pili yang dipanen dan dikoleksi berasal dari biakan bakteri yang tumbuh pada setiap botol tersebut. Hasil koleksi bakteri di kumpulkan dalam satu botol steril yang kemudian ditambahkan *tricoleraetic acid* (TCA) sampai konsentrasinya mencapai 3 %. Setelah dikocok rata maka koleksi bakteri diletakkan pada suhu kamar selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan menggunakan kecepatan sebesar 6.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Pellet hasil sentrifugasi diambil dan disuspensikan memakai cairan PBS pH 7,4 dengan perbandingan 1:10. Suspensi bakteri tersebut dicukur dengan menggunakan *pili cutter*. Kecepatan mencukur bakteri tersebut dilakukan secara penuh selama 30 detik pada potongan ke-satu sampai ke-tiga dengan kecepatan 6.000 rpm, sedangkan potongan keempat sampai ke-enam dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit dan hasil cukuran dilakukan kembali sentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 12.000 rpm memakai suhu 4°C. Supernatan hasil sentrifugasi yang mengandung bagian pili bakteri di simpan pada suhu 4°C, sedangkan bagian endapannya ditambahkan cairan PBS pH 7,4 dengan jumlah volume yang sama seperti tersebut

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

Metode Isolasi Protein Pili *Vibrio cholerae* 01

Petunjuk isolasi protein hemaglutinin pili seperti Ehara dengan modifikasi (13). Hasil koleksi pili tersebut dilakukan elektroforesis dengan menggunakan metode SDS-PAGE. Hasil elektroforesis yang terbentuk gel dipotong tegak lurus sehingga tiap potongnya akan mengandung lima pita protein. Hasil potongan pita tersebut diatas dikumpulkan yang kemudian dimasukkan ke dalam tabung membran, dianalisis memakai cairan penyangga elektroforesis *running buffer*. Selanjutnya dilakukan *elektroelution* menggunakan elektroforesis *horizontal apparatus* aliran listrik 120 mV selama 90 menit. Hasil dari elektroelusi kemudian dilakukan dialisis dengan cairan penyangga PBS pH 7,4 sebanyak 2 liter selama 2x24 jam. Cairan PBS diganti sebanyak tiga kali.

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) Berat Molekul Protein

Monitoring berat molekul-molekul dikerjakan dengan SDS-PAGE metode (14). Sampel protein dipanaskan 100°C selama 5 menit dalam larutan penyangga yang mengandung 5 mM Tris pH 6,8; 5% *2-mercapto ethanol*; 2,5 w/v *sodium dodecyl sulfate*, 10 % v/v *glycerol tracking gel* 4%. Voltase aliran listrik yang digunakan adalah 120 mV. Sebagai bahan warna yang digunakan adalah *coomassie brilliant blue* dan molekul standar *fermentasi low range marker*. Setelah dilakukan perhitungan berat molekul maka dilakukan perbanyakan protein dengan berat molekul 37,8 kDa. Kemudian dilakukan permurnian protein yaitu elektroelusi.

Uji Hemaglutinasi (HA) Protein Hemaglutinin

Pembuatan suspensi larutan PBS khusus HA (hemaglutinasi); NaCl 8,473 gr, Na₂HPO₄ 1,7799, NaH₂PO₄ 1,3799 gr, dilarutkan dalam 1 liter air (pH 7.4), Sediaan darah mencit disimpan dalam *falcon* (berisi PBS+EDTA), disentrifugasi 3500 rpm selama 10 menit (*supernatant* dibuang), pellet dicuci dengan PBS (di ulang 3 kali sampai bersih eritrositnya, pellet diambil sebanyak 5 µl + PBS sampai 10 ml agar homogen (siap untuk tes HA). Stok eritrosit dibuat dengan mengencerkan eritrosit 50 µl dalam PBS steril sampai 10 ml. *Mikroplate* V diisi dengan 50 µl PBS steril pada masing-masing sumuran, protein *V.cholerae* ditambahkan dalam sumuran pertama sebanyak 100 µl, setelah di homogenasi dalam sumuran diambil 50 µl ditambahkan pada sumuran kedua, pengenceran tersebut dilakukan berulang hingga pengenceran yang diinginkan. Ditambahkan stok eritrosit pada semua sumuran masing-masing sebanyak 50 µl lalu digoyang pelan dan dibiarkan hingga terjadi aglutinasi.

Prosedur Penggabungan Protein Adhesi Berat Molekul 37,8 kDa Konjugasi CTB

Prosedur pembuatan vaksin protein konjugasi CTB dengan metode hasil modifikasi dari Santoso (15). Hasil koleksi protein adhesi 37,8 kDa diambil sebanyak 8 mg dalam 1,5 ml PBS, sedangkan CTB sebanyak 0,230 mg dalam 1,5 ml PBS. Kemudian diaduk didalam lemari asam dan

ditambahkan 2% *Glutaraldehyde* 3 cc, diinkubasi dalam suhu ruangan selama 1 jam dengan diaduk perlahan. Ditambahkan *glycine* pH 7,2 sebanyak 2.24 ml (BM=75,07) diinkubasi dalam suhu ruangan selama 1 jam diaduk perlahan, setelah itu didialisa dengan PBS semalam sebanyak 4 kali, kemudian disimpan-20°C.

Preparasi Mukus

Preparasi mukus adalah sebagai berikut: potongan usus dicuci dengan PBS dingin. Kemudian usus dibuka sehingga terlihat bagian mukosa usus halus. Lapisan mukus diambil dengan cara *scraping* secara longitudinal menggunakan spatel dan ditampung didalam tabung yang berisi PBS steril dan protease inhibitor. Suspensi dikocok, kemudian disentrifus 12.000 rpm pada 4°C selama 10 menit. Supernatan diambil dilakukan pemurnian, disuspensi dengan PBS dan dilakukan dialisis menggunakan PBS digunakan sebagai sampel untuk pemeriksaan s-IgA dengan metode ELISA (16).

Perhitungan Dosis

Dosis susu kuda Sumbawa untuk mencit ditentukan berdasarkan hasil penelitian rata-rata konsumsi 150 ml, kemudian dikonversikan ke mencit. Konversi dosis dilakukan dengan melihat tabel konversi yaitu ditentukan pada berat badan manusia 70 kg dan berat badan mencit 20 gr (7). Berdasarkan perhitungan konversi dosis diperoleh konversi dosis untuk manusia berat badan 70 kg ke mencit berat badan 20 gr adalah 0.0026, sehingga dosis untuk mencit adalah $0,0026 \times 150\text{ml} = 0,4 \text{ ml}/20 \text{ grBB} = 0,02 \text{ ml}/\text{grBB}$ (16).

Pengambilan Sampel Susu Kuda Sumbawa Terfermentasi

Sampel susu kuda didapat dengan melakukan pemerahan langsung pada pengumpul susu kuda di Desa Donggo Kabupaten Bima, NTB. Sampel adalah susu kuda dari satu induk kuda umur 3 tahun dengan volume sampel 200 ml yang diambil dari bagian terakhir pemerahan untuk menghindari kontaminasi, kemudian dimasukkan dalam wadah steril yang telah divakum kemudian dimasukkan dalam *ice box*, demikian juga selama perjalanan dari Bima ke Malang. Derajat keasaman (pH) susu diukur sesaat setelah pemerahan dan selama diberikan pada mencit.

Pemberian Susu Kuda Sumbawa

Mencit Balb/c jantan usia 8-12 minggu sebelum digunakan sebagai hewan coba, semua mencit diadaptasi selama lebih kurang 1 minggu untuk penyesuaian lingkungan, mengontrol berat badan dan menyeragamkan makanan. Setelah itu mencit dibagi dalam 4 kelompok yaitu kelompok diberi *placebo* (*aquades* 0,4 ml/20gr/BB) dan kelompok diberi susu kuda terfermentasi dosis 0,4 ml/20gr/BB secara oral melalui sonde lambung selama 35 hari, dan tetap menerima makan dan minum.

Bahan Imunisasi

Bahan terdiri atas CTB, Protein adhesin 37,8 kDa *V. cholerae* 01 konjugasi CTB yang diberikan secara peroral pada mencit balb/c.

Imunisasi

Imunisasi diberikan peroral pada mencit dengan menggunakan jarum suntik (ujungnya bulat). Imunisasi diberikan 4 kali selang 1 minggu, dan pada akhir minggu

ke-5 mencit dimatikan diambil mukusnya.

Pemeriksaan Kadar s-IgA Metode ELISA

Parameter yang diamati adalah kadar IgA di dalam mukus. Sampel mukus dikumpulkan dari setiap mencit. Semua *reagen* dan sampel ditaruh pada suhu kamar sebelum digunakan. Dimasukkan 100 ml setiap standar ke sumuran (1 sumuran untuk blangko/*deionized*). Dimasukkan 100 ml sampel ke masing-masing sumur yang berbeda, sesuai peta. Sumuran ditutup dan diinkubasi selama 30 menit di temperatur ruang (dishaker sebentar sebelum di inkubasi). Dicuci dengan *wash solution* 3 kali atau 4 kali masing-masing dengan 300 ml, dishaker dan didekantasi, diserap dengan tissue. 100 ml *enzyme-antibody conjugated* dipipet dimasukkan kesemua lubang sumur (kecuali blangko), diinkubasi (30±2) menit, ditutup sumuran dengan aluminium foil, dishaker sebentar. Dicuci dengan *wash solution* 3 kali atau 4 kali masing-masing dengan 300 ml, dishaker sebentar didekantasi, diserap dengan tissue. Ditambahkan 100 ml substrat TMB ke semua sumuran (kecuali blangko), diinkubasi dalam kamar gelap pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian ditambahkan *stop solution* (3M NaOH) ke semua sumur dan segera diamati *Optical Density* larutan pada $\lambda = 450 \text{ nm}$ dengan menggunakan ELISA reader. (*Manufactured by: Immunology Consultants Laboratory, inc. USA*).

Uji Protektifitas

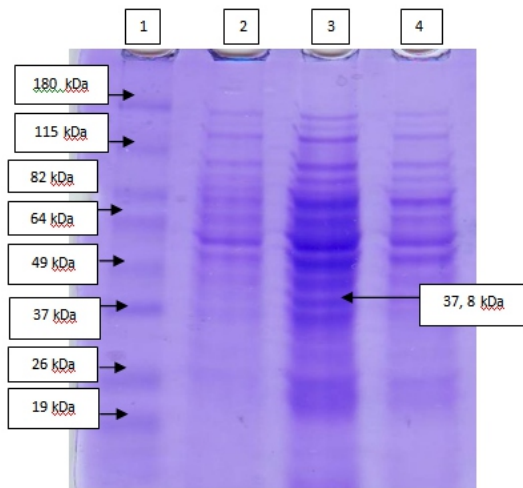
Pengujian protektifitas dalam penelitian ini menggunakan metode sebagai berikut. Usus halus mencit diambil sepanjang ujung lambung hingga ujung usus besar untuk dipotong sepanjang 20 cm, kemudian kedua ujungnya diikat dengan benang. Setelah itu masing-masing usus halus disuntik *V.cholerae* 01 OD 1, sebanyak 0,5 cc kemudian ditimbang. Setelah ditimbang dimasukkan kedalam media *Roswell Pack Medium Institute* (RPMI) dan dikocok perlahan kemudian ditimbang kembali. Hasil yang diamati adalah berat usus awal dan berat usus akhir untuk dilihat selisih beratnya. Hasil ini secara tidak langsung menggambarkan jumlah cairan yang disekresi dalam lumen usus (*MLIL/Mice Ligated Heat Loop*) (17).

Analisis Data

Untuk mengetahui perbedaan perlakuan antara kelompok kontrol dengan perlakuan digunakan uji statistik *One Way ANOVA*. Hasil pengujian yang diperoleh digunakan untuk menilai pengaruh pemberian susu kuda Sumbawa terfermentasi terhadap kadar s-IgA. Penelitian ini bermakna bila $p < 0,05$. Kemudian dilakukan analisis *Post Hoc* dengan uji *Tukey* apabila terdapat perbedaan yang signifikan, untuk mengetahui kelompok mana saja yang menunjukkan perbedaan yang signifikan.

HASIL

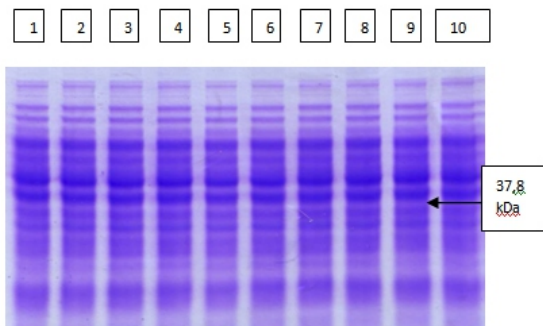
Berat molekul fraksi protein pili *V.cholerae* 01 37,8 kDa pada SDS-PAGE berada diantara 37 sampai 49 kDa. Tampak pita protein yang ditemukan dari hasil potongan pili pertama sampai kedua (Gambar 1). Hasil SDS-PAGE menunjukkan adanya berat molekul antara 37 sampai 49 kDa pada potongan pili.



Gambar 1. Hasil SDS-PAGE protein pili dengan cara mencukur dengan pili cutter

Keterangan :
Sumur:1: Marker (low Weight Protein Marker),2: Whole cell,3: Pili

Untuk penelitian selanjutnya dipilih potongan pertama, dilakukan perbanyakkan dan terlihat terjadi konsistensi ekspresi pita protein 37,8 kDa (Gambar 2).



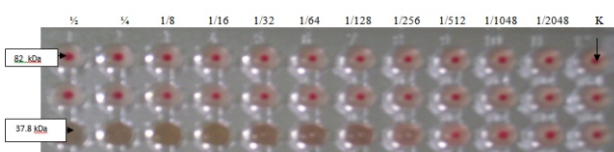
Gambar 2. Hasil SDS-PAGE protein potongan ke-1

Keterangan:
Sumur: 1–10: pili potongan ke-1

Protein ini dimurnikan dengan melakukan pemotongan secara horizontal, kemudian dilakukan elektroelusi yang akan digunakan sebagai antigen pada penelitian selanjutnya.

Uji Hemaglutinasi (HA)

Protein berat molekul 37.8 kDa sebagai protein hemaglutinin (Hemaglutinin sebagai kandidat protein adhesi), dibuktikan dengan hasil tes HA (hemaglutinasi) sesuai pada pita yang dimaksud (Gambar 3).



Gambar 3. Hasil uji hemaglutinasi

Dari Gambar 3 memperlihatkan bahwa pada lajur 37.8 kDa terlihat sampai pada pengenceran yang ke- 1/256 tampak kosong, tidak terjadi pengendapan eritrosit. Hal ini menunjukkan terjadi aglutinasi protein tersebut terhadap eritrosit. Mulai pengenceran 1/512- 1/2048 nampak terjadi pengendapan, hal ini dimungkinkan karena konsentrasi protein adhesi 37.8 kDa tidak seimbang dengan eritrosit. Demikian juga pada kontrol negatif (PBS steril) nampak terjadi endapan, karena tidak adanya protein yang dipapar sehingga tidak terjadinya pengikatan protein dan eritrosit. Adapun pada protein 82 kDa pada semua pengenceran terjadi endapan eritrosit, menunjukkan bukan protein aglutinin.

Pemeriksaan ELISA

Pada percobaan ini yang diamati adalah kadar s-IgA mukus dengan metode ELISA, dengan panjang gelombang 450 nm dengan berdasarkan OD (Optimal Density) per 1 cc sampel.

Hasil ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan dengan nilai F table sebesar 32.412 (p=0.00), kemudian dilakukan uji Tukey's (Tabel 1).

Tabel 1. Perbedaan kadar s-IgA pada kelompok penelitian

| No | Kelompok | Rata - Rata (%+SD) | BNJD |
|----|----------|--------------------|------|
| 1. | I | 0.644±0.131 | a |
| 2. | II | 0.9778±0.007 | b |
| 3. | III | 1.0748± 0.009 | b |
| 4. | IV | 1.1602±0.216 | c |

Keterangan: Notasi pada BNJD yang berbeda menunjukkan berbeda bermakna, sedangkan huruf yang sama berarti tidak berbeda

Dari hasil analisis Tukey pada perlakuan negatif yang hanya diberikan aquades didapatkan rata-rata IgA paling rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain. Pada kelompok yang diberikan susu kuda sumbawa+CTB didapatkan peningkatan IgA tapi tidak berbeda bermakna dengan kelompok perlakuan yang hanya diberikan susu kuda sumbawa saja. Untuk perlakuan susu kuda+CTB+protein adhesi didapatkan peningkatan IgA yang berbeda bermakna dengan semua kelompok perlakuan

Hasil yang diperoleh dengan rerata paling rendah pada kontrol negatif, sedangkan rerata paling tinggi adalah pada kelompok perlakuan imunisasi protein pili *V.cholerae* O1 37,8 kDa dikonjugasi dengan CTB dan pemberian susu kuda (kelompok 4). Hasil ini menunjukkan bahwa protein adhesi 37,8 kDa dan CTB adalah imunogenik, dan pemberian susu kuda Sumbawa terfermentasi dapat meningkatkan imunitas protein adhesi 37,8 kDa konjugasi CTB. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya memperlihatkan bahwa rerata paling tinggi adalah perlakuan dengan pemberian protein pili *V.cholerae* O1 37,8 kDa dikonjugasi dengan CTB dengan rerata 0.683 (17). Jika dibandingkan dengan hasil penelitian ini dengan pemberian susu kuda Sumbawa terfermentasi memperlihatkan bahwa rerata paling tinggi adalah perlakuan protein pili *V.cholerae* O1 37,8 kDa dikonjugasi

dengan CTB hampir dua kali lipatnya. Demikian pula jika dilihat dari aspek selisih nilai tiap kelompok perlakuan menunjukkan hasil yang lebih tinggi. Dari perbandingan hasil penelitian ini memperkuat bahwa susu kuda Sumbawa terfermentasi memiliki potensi yang cukup signifikan dalam memberikan efek peningkatan imunitas protein adhesi 37,8 kDa yang di konjugasi CTB.

Uji Protektifitas

Setelah diketahui bahwa protein adhesi 37,8 kDa yang dikonjugasi dengan CTB memiliki potensi imunogenik dalam membangkitkan respon imun humoral, maka perlu dilakukan uji protektifitas. Tujuan uji protektifitas adalah untuk mengetahui apakah susu kuda Sumbawa terfermentasi serta protein adhesi 37,8 kDa yang dikonjugasi dengan CTB dapat menghambat pengeluaran cairan dari sel usus ke dalam lumen usus. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Keadaan awal usus saat sebelum disuntik bakteri *V. cholera 01*

Keterangan: 1, 2, 3 dan 4 adalah uji protektifitas dengan perlakuan sampel sama

Gambar 5 memperlihatkan kondisi usus sebelum dipapar *V. cholera 01* menampakkan pengelembungan. Hasil uji protektifitas kontrol negatif dengan disuntikan bakteri, tampak pada Gambar 6.



Gambar 6. Keadaan usus hasil uji protektifitas kontrol negatif sesudah disuntik *V. cholera 01*

Keterangan: 1, 2, 3 dan 4 adalah uji protektifitas dengan perlakuan sampel

Hasil uji protektifitas kontrol negatif, terjadi pengelembungan pada usus akibat pemberian bakteri *V.cholerae 01* kedalam usus halus pada mencit tanpa paparan susu kuda Sumbawa terfermentasi dan tanpa imunisasi. Pengelembungan tersebut akibat masuknya cairan kedalam lumen usus.



Gambar 7. Keadaan uji usus dengan injeksi *V. Cholera 01* susu kuda Sumbawa terfermentasi

Keterangan: 1, 2, 3 dan 4 adalah pengulangan pada perlakuan yang sama

Hasil perlakuan paparan susu kuda Sumbawa terfermentasi seperti pada Gambar 7 menunjukkan terjadinya pengelembungan usus pada bagian tertentu. Hasil pengelembungan ini apabila dibandingkan dengan uji protektifitas kontrol negatif tampak lebih kecil.



Gambar 8. Hasil uji protektifitas susu kuda dan CTB

Keterangan: 1, 2, 3 dan 4 adalah uji protektifitas dengan perlakuan sampel sama

Hasil perlakuan imunisasi dengan CTB, seperti pada Gambar 8 menunjukkan terjadinya pengelembungan usus pada bagian tertentu. Hasil pengelembungan ini apabila dibandingkan dengan uji protektifitas dengan kontrol negatif (Gambar 6) dan kontrol positif (Gambar 7) tampak lebih kecil.



Gambar 9. Hasil Uji protektifitas menggunakan protein adhesi 37,8 kDa dikonjugasi dengan CTB

Keterangan: 1, 2, 3 dan 4 adalah uji protektifitas dengan perlakuan sampel sama.

Hasil perlakuan imunisasi protein adhesi 37,8 kDa dikonjugasi CTB dan susu kuda menunjukkan tampak

terjadi penggelembungan pada usus lebih kecil apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan kelompok CTB (Gambar 9).

Untuk memperjelas hasil uji protektifitas maka dilakukan penghitungan volume cairan yang terdapat pada lumen usus (Tabel 2). Hasil uji ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan dengan nilai *F table* sebesar 32.412 ($p=0.00$). Kemudian dilakukan uji *Tukey's*. Hasil *Tukey's* test tersebut menunjukkan bahwa kelompok I kontrol negatif tidak berbeda bermakna dengan kelompok II (kontrol positif), akan tetapi berbeda bermakna dengan kelompok III (CTB+susu kuda) dan kelompok IV (protein pili adhesi *V.cholerae* 01 37,8 kDa dikongjugasi CTB+ susu kuda). Perlakuan CTB sendiri tidak berbeda bermakna dengan pemberian perlakuan protein pili adhesi *V.cholerae* 01 37,8 kDa dikongjugasi CTB. Hasil ini menunjukkan susu kuda mempunyai pengaruh dalam meningkatkan imunitas protein adhesi 37,8 kDa konjugasi CTB *V.cholerae* 01 dalam mencegah sekresi cairan usus jika dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Tabel 2. Hasil uji pengaruh perlakuan terhadap volume cairan

| No | Kelompok | Rata-rata (% \pm SD) Berat usus | BNJD |
|----|------------------|--------------------------------------|------|
| 1 | K.Negatif | 1.6532 \pm 0.06 | a |
| 2 | K.Positif | 1.6240 \pm 0.44 | a |
| 3 | CTB+Susu | 1.5435 \pm 0.02 | b |
| 4 | CTB+susu+Protein | 1.5765 \pm 0.04 | b |

Keterangan: Notasi berbeda pada BNJD (a,b) menunjukkan beda nyata ($p=0.05$) sedangkan yang sama tidak berbeda nyata.

DISKUSI

Protein Adhesi V.cholerae 01

Tahap pertama pada penelitian ini adalah mengisolasi protein adhesi subunit pili *V.cholerae* 01, seperti yang dikerjakan pada penelitian sebelumnya (18). Perhitungan berat molekul protein tersebut melalui elektroforesis (SDS-PAGE). Kemudian membuktikan bahwa protein subunit pili berat molekul 37,8 kDa protein hemaglutinin melalui uji hemaglutinin (HA). Protein hemaglutinin merupakan protein adhesi yang berperan sebagai faktor virulensi yang berpengaruh pada proses adhesi bakteri *V.cholerae* 01 pada sel epitel usus halus (18).

Potensi Imunogenik Protein adhesi V.cholerae 01

Seperti telah diketahui bahwa imunogen yang poten adalah protein, terutama bila berat molekulnya lebih dari 10 kDa sampai dengan 100 kDa. Apabila berat molekulnya kurang dari 10 kDa biasanya tidak bersifat imunogenik (19).

Berat molekul protein adhesi *V.cholerae* 01 yang berhasil diisolasi ialah protein pili dengan berat molekul 37,8 kDa. Berat protein tersebut berada pada kisaran antara 10 kDa sampai 100 kDa sehingga protein tersebut dapat dikatakan sebagai imunogen yang poten.

Untuk mengetahui potensi imunogenik protein tersebut

dalam menginduksi respon imun mukosa, yaitu s-IgA yang dapat mencegah proses adhesi *V.cholerae* 01 pada usus, maka dilakukan imunisasi peroral dengan protein menggunakan mencit. Dosis protein yang diberikan adalah 250 μ g setiap kali pemberian secara oral (14). Untuk menghindari *oral tolerance* atau sistem imun mukosal menjadi tidak responsif terhadap imunogen oral, maka protein adhesin tersebut dikongjugasikan dengan *adjuvant cholera toxin* subunit B (CTB).

Penggunaan CTB sebagai *adjuvant* yang sekaligus sebagai protein *carier* untuk protein adhesi 37,8 kDa. Alasan digunakannya CTB sebagai *adjuvant* pada percobaan ini antara lain: (1). CTB merupakan salah satu *adjuvant* poten yang sering digunakan; (2). CTB bisa diterima baik oleh traktus gastrointestinalis, dan stabil pada suasana asam; (3). CTB bertanggung jawab pada pengikatan dengan reseptor G_{M1} yang terdapat pada semua sel berinti termasuk sel epitel usus, dan (4). CTB tidak toksik, terutama apabila vaksin ini akan dicobakan kepada manusia (20). Sebenarnya banyak bahan lain yang dapat digunakan sebagai *adjuvant* mukosal, tetapi kelihatannya memberikan efek toksik.

Hasil pengukuran kadar s-IgA yang terbentuk setelah imunisasi menunjukkan bahwa pemberian susu kuda Sumbawa terfermentasi terhadap molekul adhesi 37,8 kDa subunit pili yang dikongjugasi dengan CTB serta perlakuan pemberian susu kuda Sumbawa terfermentasi dan CTB sendiri mampu menginduksi s-IgA secara bermakna, dibandingkan dengan perlakuan kontrol negatif dan kontrol positif, karena CTB secara teoritis bersifat imunogen yang poten (21). Perbedaan perlakuan pemberian susu kuda Sumbawa terfermentasi dan CTB dibandingkan pemberian susu kuda Sumbawa terfermentasi terhadap molekul adhesi 37,8 kDa subunit pili yang dikongjugasi dengan CTB tidak berbeda bermakna. Hal tersebut kemungkinan disebabkan dosis CTB yang kecil sehingga tidak optimal dalam menginduksi s-IgA sehingga perlu adanya penelitian lebih lanjut dosis CTB dalam menginduksi s-IgA.

Hasil pemberian susu kuda Sumbawa terfermentasi terhadap imunisasi dengan kelompok perlakuan protein adhesi 37,8 kDa yang dikongjugasi dengan CTB sebagai bahan imunisasi peroral telah menunjukkan potensinya dalam meningkatkan induksi s-IgA dalam mukus (Tabel 2). Hal tersebut membuktikan bahwa susu kuda Sumbawa terfermentasi dapat meningkatkan imunitas protein 37,8 kDa yang merupakan imunogen mukosal yang poten yaitu mampu membangkitkan respon imun mukosal.

Respon imun mukosal terhadap antigen yang masuk melalui saluran cerna atau perinhalasi didominasi oleh s-IgA. Penangkapan antigen melewati sawar usus terjadi pada tempat yang dikenal sebagai daerah induktif oleh sel pengangkut khusus yang disebut sel M. Morfologi sel M unik karena adanya suatu kantong besar pada membran basolateral yang berisi limfosit dan makrofag. Sel M secara terus menerus menghantarkan antigen dari lumen saluran cerna ke sel imun yang ditemukan dalam kantong tersebut. Limfosit atau makrofag yang menangkap antigen tersebut meninggalkan sel M untuk seterusnya berpindah menuju folikel limfoid setempat (17).

Pada stimulasi sel B, Ig *switching* ke isotop IgA di-rangsang oleh TGF- β dan IL-5 yang diproduksi oleh sel T. IL-5 menginduksi s-IgA pada sel yang telah mengalami

switching (21). Alasan yang memungkinkan mengapa IgA diproduksi lebih banyak dalam sistem imun mukosal dibandingkan jaringan yang lain, karena *isotype switching* ke IgA terjadi paling efisien dalam jaringan limfoid mukosal, disamping itu sel Th2 yang memproduksi IL-5 lebih banyak dalam mukosa dibandingkan dalam jaringan limfoid yang lain. Sel B yang memproduksi IgA juga mempunyai kecenderungan untuk homing ke jaringan mukosal (17).

Hasil pembahasan diatas membuktikan bahwa pemberian susu kuda Sumbawa terfermentasi terhadap protein adhesi subunit pili berat molekul 37,8 kDa *V. cholerae O1* yang dikongjugasi dengan CTB apabila diberikan peroral mampu menginduksi respon imun mukosal dengan terbentuknya s-IgA secara bermakna.

Protektifitas Susu Kuda Sumbawa Terfermentasi pada Peningkatan Potensi Protein Adhesi V.cholerae O1 sebagai Imunogen Mukosal

Uji protektifitas yang digunakan adalah pemberian susu kuda Sumbawa terfermentasi disertai gabungan protein adhesi 37,8 kDa dikongjugasi CTB. Hasil respon imun yang ditimbulkan tidak hanya terhadap peningkatan imunitas protein adhesi 37,8 kDa, tetapi juga terhadap CTB, mengingat CTB selain berperan sebagai *adjuvant* juga merupakan imunogen yang poten. Hal ini telah dibuktikan bahwa pada manusia (sukarelawan) CTB dapat menginduksi level antibodi yang setara dengan orang yang menderita kolera (13). Selain itu respon memori setelah imunisasi oral dengan vaksin yang mengandung CTB dapat bertahan bertahun-tahun. Sel T spesifik antigen juga bisa didapatkan dalam darah perifer sampai lebih dari 1 tahun setelah imunisasi oral dengan CTB (21).

Uji protektifitas yang dilakukan adalah dengan mengukur volume cairan dalam usus, setelah diberikan perlakuan pemberian bakteri *V.cholerae O1*, yang selanjutnya dilakukan perhitungan jumlah volume dengan mengukur berat sebelum dan sesudah perlakuan. Hasil rerata yang didapatkan selanjutnya dilakukan pengujian ANOVA dan *Tukey's tes* (Tabel 2) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

Metode yang biasanya digunakan dalam uji protektifitas terhadap diare yang disebabkan oleh bakteri adalah metode *rabbit ileal loop*. Metode ini sifatnya traumatik (menyiksa hewan), sehingga dalam penelitian ini menggunakan metode modifikasi (19).

Hasilnya seperti pada Tabel 2 menunjukkan adanya perbedaan secara bermakna antara kontrol negatif dengan kontrol positif dan perlakuan. Dapat dijelaskan bahwa pada kontrol negatif terjadi sekresi cairan kedalam lumen usus yang disebabkan serangkaian reaksi enzimatik hingga timbulnya diare. Hal ini ditandai dengan terjadinya penggelembungan pada usus dan bertambahnya volume cairan dalam lumen usus setelah dilakukan perlakuan. Sedangkan pada kontrol positif dan perlakuan volume cairan dalam lumen usus berkurang. Sekresi cairan dari sel usus ke lumen usus seperti pada Gambar 9 tidak tampak, yang ditunjukkan dengan tidak terjadi penggelembungan pada jaringan usus. Hasil uji protektifitas pada kelompok usus yang diimunisasi dengan CTB berbeda bermakna dengan kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan protein 37,8 kDa dikongjugasi CTB. Pada Gambar 8 terlihat jelas perbedaan peng-gelembungan usus hasil perlakuan. Hasil tersebut sama dengan hasil uji kadar s-IgA yang

perlakuan CTB dengan perlakuan protein 37,8 kDa berbeda secara bermakna. Namun demikian kemungkinan lain yang dapat dijelaskan adalah adanya toksin lain yang masih aktif menyebabkan terjadi masuknya cairan kedalam lumen usus seperti *zonula occludens toxin* (20).

Pada proses diare, adanya kenaikan sekresi aktif *chloride* dan *bicarbonate* dalam lumen usus dan terjadinya penurunan reabsorpsi NaCl. Kedua kejadian tersebut disebabkan oleh sub unit A CT merupakan enzim yang meningkatkan aktifitas *adenilate cyclase* memecah ATP menjadi cAMP yang merupakan *second messenger* untuk menghambat absorpsi NaCl dan meningkatkan sekresi NaCl serta *bicarbonate* pada lumen usus yang akan disertai dengan sekresi H₂O (3), sehingga jumlah volume dalam usus bertambah. Dalam penelitian selanjutnya perlu dipikirkan penggunaan metode lain guna mendukung hasil yang sekarang.

Perlakuan dengan pemberian protein adhesi 37,8 kDa yang dikongjugasi dengan CTB dan susu kuda menunjukkan volume akhir perlakuan tersebut berbeda bermakna dengan kontrol negatif. Hal ini kemungkinan karena perlekatan *V.cholerae O1* pada sel epitel usus halus yang diperankan oleh protein adhesi dapat dihambat oleh s-IgA yang terbentuk.

Volume cairan yang keluar yang disebabkan aktivasi oleh CT dapat dihambat oleh s-IgA yang terbentuk karena pemberian vaksinasi. Perbedaan antar perlakuan pada kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan vaksinasi yang sangat berbeda bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa memang terjadinya sekresi cairan akibat aktivasi oleh CT yang diproduksi oleh *V.cholerae O1* yang berhasil melekat pada epitel dan berkembang biak dalam usus.

Secretory-IgA yang terbentuk oleh pemberian vaksinasi protein adhesi subunit pili berat molekul 37,8 kDa yang dikongjugasi dengan CTB dan susu kuda, mempunyai kemampuan protektif, mencegah masuknya cairan kedalam lumen usus halus menciit, sehingga proses diare dapat dicegah.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dalam susu kuda Sumbawa didominasi oleh bakteri kelompok asam laktat genus *Lactobacilli* dan *weisella/Leuconostoc*. Asam laktat merupakan metabolik yang dihasilkan oleh BAL dalam metabolisme karbohidrat, dimana metabolik ini bersifat antimikrobal (22). Aktivitas antimikroba asam laktat berhubungan dengan keseimbangan asam-basa, donasi proton dan juga sifat asam laktat yang lipofilik yang mampu mendekati dan memasuki membran lipid mikroorganisme tanpa memerlukan energi (23). Selain itu bakteri asam laktat digunakan sebagai probiotik sudah banyak dilaporkan. Terdapat tiga genus bakteri asam laktat yang sering dipakai sebagai probiotik antara lain *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* dan *Streptococcus* (24).

Hasil beberapa penelitian, secara *in vitro* susu kuda Sumbawa mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Vibrio cholerae*. Susu kuda Sumbawa dilaporkan mempunyai aktivitas anti mikrobial dengan spektrum yang cukup luas (24,25). Tetapi penghambatan yang didapatkan berasal dari komponen bahan aktif hasil ekstraksi langsung dari susu kuda Sumbawa. Penghambatan BAL terhadap patogen melalui produksi asam laktat serta asam organik lainnya seperti asetat serta adanya hidrogen *peroksida* (25).

Susu kuda Sumbawa terfermentasi juga terbukti dapat meningkatkan potensi protein adhesi 37,8 kDa yang dikonjugasi CTB dalam menginduksi respon imun mukosal s-IgA. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa satu sisi protein adhesi 37,8 kDa sangat potensial sebagai kandidat vaksin mukosal peroral terhadap penyakit kolera dan susu kuda Sumbawa terfermentasi dapat juga diformulasi untuk melengkapi dan mendukung mekanisme kerja protein adhesi. Disamping itu secara tradisional susu kuda Sumbawa dapat dikonsumsi sebagai upaya preventif dan pengobatan penderita kolera.

Penelitian ini membuktikan pemberian susu kuda Sumbawa terfermentasi dapat meningkatkan imunitas protein adhesi subunit pili berat molekul 37,7 kDa *V.cholerae* 01 yang dikonjugasi dengan CTB apabila diberikan peroral mampu menginduksi respon mukosal dengan terbentuknya s-IgA secara bermakna. Dan *secretory* IgA yang terbentuk hasil paparan susu kuda Sumbawa terfermentasi dapat meningkatkan imunitas protein 37,8 kDa yang dikonjugasi dengan CTB serta bersifat protektif, yaitu mencegah masuknya cairan kedalam lumen usus sehingga tidak terjadi diare.

DAFTAR PUSTAKA

1. Umar Z. *Diare Akut Disebabkan Bakteri*. (Online) 2004. [http://www.jurnalet.com/konten.php?nama=berita utama & topic=7&id=267](http://www.jurnalet.com/konten.php?nama=berita%20utama&topic=7&id=267) [diakses tanggal 4 November 2007].
2. Sumarno. *Karakterisasi Molekuler Protein Adhesi Vibrio Cholera 01 dan Protein Reseptornya pada Sel*. Majalah Kedokteran Universitas Brawijaya Malang; 2000; 12: 26-29.
3. Sharp G and Hyne S. *Stimulation of Intestinal Adenyl Cyclase by Cholerae Toxin*. Nature. 1971; 229: 266-269.
4. Sumarno. *Karakterisasi Molekuler Protein Adhesi Vibrio Cholera 01 dan Protein Reseptornya pada Sel Epitel Usus Halus Tikus Putih (Wistar), Studi pathogenesis Vibrio cholera 01*. [Disertasi]. Universitas Airlangga, Malang. 2000.
5. Hanne LF and Finkelstein RA. *Characterization and Distribution of Haemagglutinins Produced by Vibrio cholerae*. Infection and Immunity. 1982; 36 (1): 209-214.
6. Sumarno, Ismanoe, Winarsih S, dan Yudani Tri. *Reaksi Imunogenitas dan Daya Protektifitas Mencit Terhadap V.Cholerae yang di Vaksinasi dengan Molekul Adhesi Pili 37,8 kDa Digabung dengan CTB V.Cholerae*. [Laporan Penelitian]. Universitas Brawijaya, Malang. 2009.
7. Lawrence RM. *Host-Resistance Factors and Immunologic Significance of Human Milk*. In: Lawrence RA, Lawrence RM, (Ed). Breastfeeding. A Guide for the Medical Profession. Orlando, Florida : Elsevier Mosby Saunders; 2005 (6): p. 171-214.
8. Severin S and X Wenshui. *Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review*. Critical Review Food Science Nutrition. 2005; 45(7): 645-656
9. Isolauri E, Rautava S, Kalliomaki M, Kirjavainen P, and Salminen S. *Role of Probiotics in Food Hypersensitivity*. Current Opinion in Allergy Clinical Immunology. 2002; 2(3): 263-267.
10. Nurliyani, M Adnan, Artama TW, and Zuheid N. *Peran Laktoferin Susu Kuda sebagai Immunomodulator dalam Respon Imun Humoral*. Agritech. 2005; 25(2): 85-89.
11. Elson CO and Ealding W. *Generalized Systemic and Mucosal Immunity in Mice after Mucosal Stimulation with Cholera Toxin*. The Journal of Immunology. 1984; 132(6) : 2736-2741.
12. Sumarno, Noorhamdani A, Samsul I, Sjoeker M, dan Ichinose Y. *Purifikasi Protein Hambatan Aglutinasi Vibrio Cholerae El Tor T79-6*. Majalah Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. 1991: 11-14.
13. Ehara M, Ishibasi M, Ichinose Y, Iwanaga M, Shimotori S, Naito T. *Purification and Partial Characterization of Fimbriae Vibrio cholera 01*. Vaccine. 1987; 5(4): 283-288.
14. Santoso S. *Protein Adhesi Salmonella Typhi sebagai Virulensi Berpotensi Immunogenik terhadap Produksi slgA Protektif*. [Disertasi]. Universitas Airlangga, Surabaya. 2002.
15. Sasmito E, Rumiyan, Rahayu SW, Andriyani E, dan Rochmy I. *Pengaruh Pemberian Susu Kuda Terfermentasi terhadap Imunitas Vaksin Hepatitis A pada Mencit Balb/c*. Majalah Farmasi Indonesia. 2006; 17(1): 13-18.
16. Awaluddin, Sumarno, dan Rasjad Indra. *Pengaruh Molekul Adhesi V.cholerae 01 M094V Sub Unit SSPili Berat Molekul 37,8 kDa Dikonjugasi Cholera Toxin Sub Unit B terhadap Respon s-IgA pada Usus Halus Mencit*. [Thesis]. Universitas Brawijaya, Malang. 2007.
17. Parslow, Tristam G, Daniel P, Abba I, Jhon B, and Imoden. *Medical Immunology*. New York City: MC Graw-Hill Companies; 2001.
18. Elson CO and Ealding W. *Generalized Systemic and Mucosal Immunity in Mice after Mucosal Stimulation with Cholera Toxin*. The Journal of Immunology. 1984; 132(6): 2736-2741.
19. Abbas K dan Andrew HL. *Cellular and Molecular Immunology*. Orlando, Florida: Elsevier Science USA; 2004.
20. Millar DG, Hirst TR, and Snider DP. *Escherichia Coli Heat-Labile Enterotoxin B Subunit is a More Potent Mucosal Adjuvant than Its Closely Related Homologue, The B Subunit of Cholera Toxin*. Infection and Immunity. 2001; 69(5): 3476-3482.
21. Baratawidjaja KG dan Rengganis I. *Imunologi Dasar*. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2004; hal. 57-177.
22. Gill DM. *The Arrangement of Subunits in Cholera Toxin*. Biochemistry. 1979; 15: 1242-1248.
23. Doores S. *Organic Acids*. Di dalam: Branen AL, Davidson PM. Antimicrobial in Food. New York: Marcel Dekker, Inc; 1983.

24. Goldin B. *The Evidence of The Effectiveness of Probiotics for The Prevention and Treatment of Human Diseases*. Nutrition and Clinical Care. 2002; 5(1): 1-2.
25. Hermawati D, Sudarwanto M, Soekarto ST, Zakaria FR, Sudrajat S, dan Tjatur RFS. *Aktivitas Antimikroba pada Susu Kuda Sumbawa*. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. 2004; 15(1): 47-53.