

**Spesifitas Monoklonal Antibodi
Anti Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)
dalam Deteksi Bakteri EPEC Penyebab Diare**

*(THE SPECIFICITY OF ANTI ENTEROPATHOGENIC
ESCHERICHIA COLI (EPEC) MONOCLONAL ANTIBODY IN
DETECTION OF DIARRHEA-INDUCING EPEC BACTERIA)*

**Sri Murtini^{1*}, Sri Budiarti²,
I Wayan Teguh Wibawan¹, Esdinawan Carakantara Satrija³**

¹Divisi Mikrobiologi Medis,
Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis,

²Departement Biologi,
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Pertanian Bogor

³FAO ECTAD Indonesia Programe
Jln. Agatis, Kampus IPB Dramaga,
Bogor, Jawa Barat 16680 Indonesia,
Tel./Fax.: +62 251 8471431;
Email: srilmurtini_fkh@apps.ipb.ac.id.

Abstract

Diarrhea caused by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is one of the most important foodborne diseases in Southeast Asia. EPEC infection causes watery diarrhea which, if left untreated, can trigger dehydration that can be lethal for the patients. One method of handling EPEC infections is through passive immunization which can deal with infections quickly and be used as short-term prevention before infection occurs without triggering resistance. One of the potential antibody candidates for passive immunization efforts is the antiprotease monoclonal antibody. This antibody was chosen because it is effective against all EPEC strains, has high specificity, and can be produced in large quantities and for a long time. The protease used in this research was isolated from the EPEC strain K1.1 bacterium which was then injected into 4 weeks old BALB/c mice. The immunized then had their spleens taken after the 69th day. Splenocytes harvested from collected spleen for fusing with myeloma cells to form hybridoma cell cultures cultured on LCT-skim-starch medium and M9 medium. The antibodies produced by the two cultures were tested using the dot blot/slot blot method to determine the potential for cross-reaction, in which only the antibodies cultured on M9 media did not cause cross-reactions with the media or other antigens. The titer of the antibodies produced by this media was then measured using the ELISA test, where it was found that the antibodies produced had a titer value of 10 and were only specific for the EPEC protease.

Keywords: EPEC, monoclonal antibody, dot blot, ELISA

Abstrak

Diare yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* enteropatogenik (EPEC) merupakan salah satu jenis penyakit tular makanan yang paling penting di wilayah Asia Tenggara. Infeksi EPEC menyebabkan gejala diare berlendir yang jika tidak ditangani akan memicu dehidrasi yang dapat berakhir dengan kematian. Salah satu metode penanganan infeksi EPEC adalah melalui imunisasi pasif yang mampu menangani infeksi dengan cepat serta dapat digunakan sebagai pencegahan jangka pendek sebelum infeksi terjadi tanpa memicu resistensi. Salah satu kandidat antibodi potensial yang dapat digunakan untuk upaya imunisasi pasif adalah antibodi monoklonal antiprotease. Antibodi ini dipilih karena efektif terhadap seluruh strain EPEC serta memiliki spesifitasnya yang tinggi dan dapat diproduksi dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang lama. Protease yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari bakteri EPEC strain K1.1 yang selanjutnya diimunisasikan ke mencit BALB/c berusia 4 minggu. Mencit yang diimunisasi kemudian diambil limpanya setelah hari ke-69. Splenosit dipanen dari limpa yang dikumpulkan untuk difusikan dengan sel mieloma guna membentuk kultur sel hibridoma yang dibiakkan pada media LCT-skim-pati dan media M9. Antibodi hasil produksi kedua kultur diuji dengan metode dot blot/slot blot untuk mengetahui potensi reaksi silang, di mana hanya antibodi hasil biakan pada media M9 yang tidak menimbulkan reaksi silang dengan media ataupun antigen lainnya. Antibodi hasil media ini selanjutnya diukur titernya menggunakan uji ELISA, di mana diketahui antibodi yang dihasilkan memiliki nilai titer 10 dan hanya spesifik untuk protease EPEC.

Kata-kata kunci: EPEC, antibodi monoklonal, dot blot, ELISA

PENDAHULUAN

Penyakit yang menular lewat makanan (*food-borne diseases*) merupakan salah satu penyakit yang paling mematikan bagi anak-anak, khususnya di negara - negara berkembang (Kirk *et al.*, 2015). Salah satu jenis *food-borne diseases* yang paling penting di wilayah Asia Tenggara, khususnya Indonesia, adalah diare yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* (Syahrul *et al.*, 2020, WHO 2015). Sekitar 420.000 kematian terjadi akibat *food-borne diseases* di seluruh dunia pada tahun 2010, dan 230.000 di antaranya disebabkan oleh diare. Dari jumlah ini, 63.000 disebabkan oleh *E. coli* (WHO 2015). Selain menyebabkan kematian, gangguan pencernaan akibat *E. coli* juga berpotensi memicu kekerdilan (*stunting*) serta terhambatnya proses tumbuh-kembang anak

(Osman *et al.*, 2023, George *et al.*, 2018, Rogawski *et al.*, 2018).

Bakteri *E. coli* merupakan bakteri Gram-negatif yang tergolong famili *Enterobacteriaceae*. Spesies bakteri ini secara alami terdapat di dalam saluran pencernaan manusia sebagai bakteri komensal dan mayoritas dari spesies ini bersifat non-patogenik. Akan tetapi, beberapa galur *E. coli* memiliki virulensi yang didapat melalui transfer genetik horizontal sehingga dapat me-nyebabkan gastroenteritis. Berdasarkan gejala klinis, virulensi, dan pola epidemiologisnya, *E. coli* virulen dikelompokkan menjadi tujuh kelompok yaitu *Enterohemorrhagic E. coli* (EHEC), *Enteropathogenic E. coli* (EPEC), *Enteraggagative E. coli* (EAEC), *Enteroinvasive E. coli* (EIEC), *Diffusely adherent E. coli* (DAEC), *Adherent-Invasive E.coli* (AIEC), dan *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC)

(Govindarajan *et al.*, 2020, Spano *et al.*, 2017). Bakteri *E. coli* memiliki sejumlah antigen, yaitu O (permukaan), H (flagellum), dan K (kapsular). Hingga saat ini, 181 antigen O, 53 antigen H, dan 80 antigen K telah teridentifikasi (Liu *et al.*, 2020, Sarowska *et al.*, 2019, Amézquita-López *et al.*, 2018). Kompleksitas antigen ini menjadikan tingkat keragaman serotipe *E. coli* sangat tinggi. Antigen O serotipe dari EPEC di antaranya adalah O33, O55, O76, O85, O88, O103, O111, O114, O119, O126, O127, O128, O142, O145, dan O153 (Denamur *et al.*, 2020).

Infeksi EPEC terkait erat dengan kontaminasi makanan atau air oleh bakteri dari lingkungan yang kotor serta perilaku higiene pribadi dan lingkungan yang kurang baik (Syahrul *et al.*, 2020, Govindarajan *et al.*, 2020). Infeksi EPEC menyebabkan gejala diare berlendir yang jika tidak ditangani akan memicu dehidrasi yang dapat berakhir dengan kematian. Timbulnya gejala ini terkait erat dengan proses perlekatan bakteri EPEC dengan dinding sel epitel usus. Protein intimin dalam sel bakteri akan membantu sel bakteri melekat di permukaan sel epitel usus. Setelah proses perlekatan awal ini terjadi, bakteri EPEC akan mampu melepaskan protein EspB dan EspD yang mengikat bakteri tersebut dengan mikrovili sel epitel inang dan mengubah fungsi dinamis aktin regular. Proses ini memicu terjadinya perluasan sel serta disekresikannya protein virulen EspF, EspG, EspH, dan Tir yang menyebabkan diare. Pada saat yang sama, protein EspC yang berperan dalam proses replikasi bakteri serta pembentukan biofilm juga dilepaskan, sehingga diare menjadi berlendir serta turut membawa populasi bakteri EPEC baru ke lingkungan (Govindarajan *et al.*, 2020). Protein-protein yang disekresikan EPEC tergolong dalam kelompok serine metalloprotease yang bekerja efektif pada pH 7-9 dan suhu 37 °C (Caminero *et al.*, 2023, Pokharel *et al.*, 2019).

Penanganan infeksi sedini mungkin merupakan komponen penting dalam upaya pengendalian diare akibat infeksi EPEC. Salah satu metode penanganan infeksi EPEC adalah melalui imunisasi pasif. Imunisasi pasif dilakukan dengan memberikan secara langsung antibodi spesifik terhadap antigen EPEC kepada penderita diare yang disebabkan oleh infeksi EPEC. Imunisasi pasif mampu mengatasi infeksi dengan cepat serta dapat digunakan sebagai pencegahan jangka pendek sebelum infeksi terjadi tanpa memicu resistansi (Constantin *et al.*, 2020). Selain itu, metode ini perlu dikaji secara lebih mendalam mengingat efektivitas terapi antibiotik sebagai metode penanganan utama yang tersedia saat ini semakin terancam oleh berkembangnya resistansi antibiotik (Eltai *et al.*, 2020; Hilman *et al.*, 2020; Rodrigues 2019).

Antibodi spesifik antiprotease EPEC yang diberikan dapat berupa antibodi poliklonal maupun antibodi monoklonal. Antibodi monoklonal memiliki keunggulan karena spesifisitasnya yang tinggi dan sekali diperoleh klon yang positif antibodi dapat diproduksi dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang lama. Sejumlah upaya pengembangan antibodi monoklonal untuk penanganan infeksi *E. coli* telah dikembangkan di berbagai belahan dunia (Thuthikkadu *et al.*, 2021). Akan tetapi, antibodi monoklonal yang mampu bekerja secara spesifik dan efektif untuk EPEC masih belum dapat diproduksi secara efisien. Pengembangan dan pemanfaatan antibodi monoklonal saat ini masih terbatas untuk serodiagnosis bakteri ini, sedangkan pemanfaatan untuk imunoterapi masih perlu dikaji lebih lanjut (Hilman *et al.*, 2020; Praekelt *et al.*, 2014; Vandekerchove *et al.*, 2002). Penelitian Giron *et al.*, (1995) telah berhasil mengembangkan antibodi mono-klonal yang mampu menghambat kerja *bundle-forming pilus* (BFP) yang berperan dalam proses perlekatan EPEC pada permukaan sel inang. Namun, sejumlah studi lanjutan menunjukkan bahwa BFP tidak selalu ditemukan pada setiap strain EPEC

(strain EPEC atipikal), sehingga akan menghambat efektivitas imunoterapi yang dilakukan (Liu *et al.*, 2021; Pakbin *et al.*, 2021). Oleh sebab itu, telaah antibodi monoklonal terhadap faktor virulensi lain yang ditemukan pada EPEC tetapi tidak menimbulkan reaksi silang dengan mikrob lain, khususnya *E. coli* non-patogenik, perlu dilakukan. Enzim protease ekstraseluler diketahui berperan penting sebagai salah satu faktor virulensi EPEC yang tidak ditemukan pada *E. coli* non-patogenik (Bager dan Naeem, 2022; Pokharel *et al.*, 2019; Budiarti dan Mubarik, 2007). Dengan demikian, antibodi spesifik terhadap protease EPEC dapat menjadi kandidat potensial untuk pengembangan antibodi monoklonal yang efektif untuk semua strain EPEC. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode produksi antibodi monoklonal terhadap protease yang dihasilkan oleh EPEC sebagai kandidat antisera potensial untuk imunisasi pasif bagi penderita diare akibat infeksi EPEC secara dini.

METODE PENELITIAN

Persiapan Strain Bakteri

Bakteri yang digunakan untuk memproduksi antigen adalah EPEC K1.1 yang diisolasi dari penderita diare di daerah Depok, Jawa Barat. Galur ini mempunyai aktivitas spesifik terhadap musin yang paling tinggi (Budiarti dan Mubarik, 2007). Bakteri EPEC K1.1 koleksi dari laboratorium Bio-teknologi Hewan dan Biomedis, Pusat Penelitian Bio-teknologi IPB diremajakan pada media agar *Eosin Methylene Blue* (EMB) (Difco) dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37 °C. Koloni tunggal yang berwarna hijau metalik selanjutnya diinkubasikan pada media Luria-Bertani Agar (LBA), kemudian dipindahkan ke media Skim Minimal Agar (SMA). Koloni yang menunjukkan aktivitas proteolitik, yaitu terbentuknya zona bening di sekitar koloni pada media SMA, dipindahkan

ke media LBA miring dan digunakan sebagai stok bakteri.

Penyiapan Antigen

Antigen yang digunakan dalam penelitian ini adalah protease ekstraseluler dari EPEC galur K1.1. Antigen diproduksi dengan dua metode yaitu:

1. EPEC K 1.1 ditumbuhkan pada media cair kaldu Luria-Bertani (Trypton 1%, NaCl 1%, ekstrak ragi 0,05%) dan diinkubasikan pada *shaker waterbath* (B. Braun Certomat® WR, Biotech. Int.) selama 8 jam pada suhu 37 °C dengan kecepatan 120 rpm, 10% dari biakan tersebut dipindahkan ke media produksi limbah cair tahu - skim - pati (LCT, 0,5% skim, 1% pati) dan diinkubasi pada kondisi yang sama. Biakan tersebut selanjutnya disentrifugasi (Beckman GPR Centrifuge) pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit untuk memperoleh supernatannya yang merupakan ekstrak kasar dari enzim protease ekstraseluler. Supernatan yang diperoleh diendapkan dengan penambahan amonium sulfat 45% (w/v) selama 24 jam pada suhu 4 °C. Endapan protein dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit dan dilarutkan dengan buffer Tris-Cl 10mM, pH 8 untuk didialisis. Dialisis dilakukan dalam membran dialisis (Sigma) dengan menggunakan buffer Tris-Cl 20 mM, pH 8 sebanyak 100 kali volume filtrat yang didialisis. Proses tersebut dilakukan selama 4 jam dan hasil dialisis difiltrasi dengan kolom kromatografi gel Shephadex G 1000 (Sigma). Hasil kromatografi dimurnikan dengan sentrifugasi membran menggunakan sentricon (Amicon Bioseparation, Millipore Corp.) pada kecepatan 1000g selama satu jam. Protease yang diperoleh tersebut digunakan sebagai antigen 1.

2. Bakteri EPEC K1.1 ditumbuhkan pada media cair kaldu Luria-Bertani dan diinkubasikan pada *shaker waterbath* (B. Braun Certomat® WR, Biotech. Int.) selama 8 jam pada suhu 37 °C dengan kecepatan 120 rpm. Biakan tersebut kemudian disentrifugasi (Beckman GPR Centrifuge) dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit dan diambil pelet bakterinya. Pelet bakteri dicuci dengan menambahkan larutan buffer Tris-Cl 10 mM pH 8 dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Pencucian pelet bakteri tersebut dilakukan sebanyak tiga kali. Bakteri yang telah dicuci dibiakkan pada media produksi M9 yang dimodifikasi yaitu media minimal dengan komposisi Na₂HPO₄·7H₂O 64 g/L, KH₂PO₄ 15 g/L, NaCl 2,5 g/L, NH₄Cl 5 g/L yang dilarutkan dalam air bebas ion dan disuplementasi dengan 2 mM CaCl₂ selama 12 jam dalam kondisi kultur diam (tidak dikocok) pada suhu 37 °C. Kemudian biakan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 15.000g selama 15 menit (Sorval plus 80). Supernatan yang diperoleh didapatkan dengan ammonium sulfat 45% (w/v) selama 24 jam pada suhu 4 °C. Endapan protease dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 15.000 g selama 30 menit (Sorval plus 80). Pelet yang diperoleh dilarutkan dalam buffer Tris-Cl 10 mM pH 8 dan disaring dengan saringan millipore dengan ukuran lubang pori 0,22 µm (Sartorius). Protease yang diperoleh tersebut digunakan sebagai antigen 2.

Pada setiap tahapan isolasi protease tersebut, konsentrasi protein diukur dengan metode Bradford, sedangkan aktivitas protease yang diperoleh diukur dengan metode Walter (Bergemeyer *et al.*, 2022; Kielkopf *et al.*, 2020). Konfirmasi protein dilakukan dengan

menguji hasil pemurniannya pada SDS-PAGE 12,5% (King 2022).

Imunisasi

Sebanyak 17 ekor mencit BALB/c (umur 4 minggu) diperoleh dari Laboratorium Patologi Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis IPB. Lima belas ekor dari kelompok mencit ini diimunisasi dan limpanya digunakan sebagai sumber sel limpa, sedangkan dua ekor lainnya tidak diimunisasi untuk digunakan sebagai kontrol serum negatif.

Lima ekor mencit diimunisasi antigen protease hasil pemurnian pertama dengan dosis 20 µg/ekor melalui rute penyuntikan di bawah kulit (subkutan) menggunakan adjuvant komplet dan tidak komplet masing-masing dengan perbandingan 1:1 dengan jarak penyuntikan 10 hari. Pada hari ke-28, darah mencit diambil melalui vena *sacralia media* (vena ekor) untuk mengevaluasi hasil imunisasi. Evaluasi hasil imunisasi dilakukan dengan uji dot blot (Wibawan *et al.*, 2010). Mencit yang serumnya positif pada uji dot blot dan tidak ada reaksi silang dengan media penumbuhnya, diambil limpanya untuk difusikan dengan sel mieloma. Namun, hasil uji menunjukkan bahwa imunisasi dengan antigen yang dimurnikan menggunakan metode pertama menghasilkan serum poliklonal yang tidak spesifik karena bereaksi positif dengan media penumbuhnya yaitu LCT-Skim-Pati. Oleh sebab itu, imunisasi mencit selanjutnya menggunakan antigen protease yang dimurnikan dengan metode pemurnian kedua.

Sepuluh ekor mencit diimunisasi menggunakan antigen protease hasil pemurnian kedua dengan dosis penyuntikan masing-masing adalah 20 µg/ekor. Rute penyuntikan di bawah kulit (subkutan) menggunakan adjuvant komplet dan tidak komplet. Penyuntikan dilakukan sebanyak sembilan kali dengan jarak penyuntikan 10 hari pada tiga kali penyuntikan pertama dan tujuh hari pada penyuntikan selanjutnya. Pada hari ke-28, 42, 51, 62, dan 69, darah mencit

diambil melalui vena *sacralia media* (vena ekor) untuk mengevaluasi hasil imunisasi. Serum dievaluasi menggunakan metode dot blot. Selanjutnya, mencit yang serumnya positif pada uji dot blot serta bersifat spesifik (tidak ada reaksi silang dengan antigen lain) diambil limpanya. Limpa yang diambil kemudian difusikan dengan sel mieloma SP 2/0 untuk memperoleh antibodi monoklonal.

Penyiapan Sel Mieloma

Produksi antibodi dilakukan pada sel mieloma galur SP 2/0 koleksi Laboratorium Virologi Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor. Sel mieloma ditumbuhkan dalam media RPMI 1640 yang mengandung L-glutamin dan natrium bikarbonat (Cat. 31800-022 Gibco Brl) serta dilengkapi dengan 1% glutamin dan 10% *fetal calf serum* (FCS). Sel mieloma diinkubasikan dalam inkubator CO₂ (Forma Scientific) pada suhu 37 °C dan konsentrasi CO₂ 5% sampai siap difusikan.

Penyiapan Feeder (faktor penunjang pertumbuhan hibridoma)

Mencit BALB/c sehat berumur enam minggu yang tidak diimunisasi dikorbankan nyawanya dengan cara dislokasi tulang leher, kemudian dibersihkan dan direndam dalam alkohol 96%. Mencit dinekropsi untuk mengekstraksi timus secara aseptis, yang selanjutnya dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Timus dicuci dan dibersihkan dari jaringan lemak dengan menggunakan media RPMI 1640. Sel-sel timosit dalam timus dikeluarkan dari kapsula dan dikumpulkan dalam media RPMI 1640. Sel timosit selanjutnya disentrifugasi (Beckman GPR Centrifuge) dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Pelet sel timosit ditumbuhkan dalam botol kultur (Nunc) dengan media RPMI 1640 lengkap pada suhu 37 °C dan kadar CO₂ 5% dalam inkubator CO₂ (Forma Scientific) selama 3-5 hari. Limfokin selanjutnya dipanen dari biakan sel timosit dengan cara membeku-cairkan biakan sel sebanyak tiga kali dan disaring dengan

saringan millipore dengan pori berukuran 0,22 µm (Sartorius). Filtrat yang dihasilkan mengandung limfokin yang digunakan sebagai *feeder* (trace element) dalam menumbuhkan hibridoma. Larutan *feeder* kemudian disimpan pada suhu -20 °C sampai saatnya digunakan.

Penyiapan Sel-sel Limpa

Mencit yang diimunisasi dan telah membentuk antibodi antiprotease EPEC dikorbankan nyawanya dengan mendislokasi tulang lehernya. Mencit tersebut dicuci dan direndam dalam alkohol 70% sebelum dinekropsi. Mencit kemudian dinekropsi dan diambil limpanya secara aseptis. Limpa yang diambil selanjutnya diletakkan di cawan petri steril dan dicuci dengan RPMI 1640 untuk menghilangkan darah dan jaringan lemaknya. Sel-sel limpa (splenosit) dikeluarkan dari kapsula dan ditambahkan media RPMI 1640. Suspensi sel limpa tersebut lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm (Beckman GPR Centrifuge) selama 5 menit dan diambil peletnya. Pelet sel limpa dicuci sekali lagi dengan menambahkan RPMI 1640 dan disentrifugasi dengan kecepatan yang sama. Pada saat yang sama, sel mieloma yang digunakan untuk fusi disiapkan dalam tabung sentrifuse dan disentrifugasi pada kecepatan yang sama dengan sel limpa. Masing-masing pelet sel diambil dan diresuspensi dengan 10 mL media RPMI 1640 lengkap. Dari masing-masing suspensi sel, diambil 2 mL suspensi untuk dilakukan penghitungan tiap jenis sel menggunakan haemositometer (kamar hitung Neubauer) dengan pewarnaan eosin.

Fusi sel dan Pembentukan Hibridoma

Hibridoma penghasil antibodi monoklonal diperoleh dengan melakukan fusi antara sel splenosit dan sel mieloma. Fusi dilakukan dengan memasukkan suspensi sel mieloma sebanyak 2×10^7 sel ke dalam tabung yang berisi suspensi sel limpa. Campuran kedua suspensi sel tersebut selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 1500

rpm selama 5 menit dan dibuang supernatannya. Pelet sel yang dihasilkan lalu ditambahkan larutan PEG-DMSO hangat (1 g PEG 1500 dicampur dengan 1,4 mL 15% DMSO) secara perlahan-lahan selama 60 detik kemudian ditambahkan media RPMI 1640 sebanyak 10 mL. Selanjutnya, tabung dibolak-balik secara perlahan sebanyak 3-4 kali hingga suspensi sel tercampur homogen. Suspensi sel yang telah homogen lalu ditambahkan dengan RPMI 1640 sampai volume larutan mencapai 30 mL. Suspensi sel yang telah difusikan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 800 rpm selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang dan peletnya diresuspensi dengan 30 mL media RPMI 1640 lengkap yang disuplementasi dengan 2% hypoxanthine aminopterin thymidine (HAT) (Gibco), *feeder* 20%, serta gL-ntamycin 50 µg/mL. Suspensi sel hasil fusi kemudian dimasukkan ke dalam cawan kultur 24 sumuran (Costar) dan diinkubasi pada suhu 37 °C dengan konsentrasi CO₂ 5% selama 21 hari dalam inkubator CO₂ (Forma Scientific). Evaluasi hasil fusi dilakukan 24 jam setelah fusi dengan mengamati sel menggunakan *inverted microscopes* (Olympus). Setelah hari ke-21, sel ditumbuhkan pada media RPMI 1640 lengkap yang disuplementasi dengan 2% hypoxanthine thymidine (HT) (Gibco), *feeder* 20%, serta gentamycin 50 µg/ml.

Penapisan Hibridoma

Penapisan hibridoma yang menghasilkan antibodi dilakukan dengan interval tujuh hari setelah fusi menggunakan metode dot blot sampai diperoleh klon yang positif (Wibawan *et al.*, 2010). Klon yang menghasilkan sekreta dengan hasil uji positif diperbanyak untuk mendapatkan antibodi monoklonalnya. Sampel serum dan hasil sekresi hibridoma yang dikumpulkan diuji titer antibodinya dengan metode dot blot dan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) tidak langsung (Alahi dan Mukhopadhyay, 2017).

Uji Spesifisitas Antibodi Monoklonal

Uji spesifisitas antibodi monoklonal yang diperoleh dilakukan menggunakan metode dot blot (Wibawan *et al.*, 2010). Uji spesifisitas ini dilakukan untuk melihat keberadaan reaksi silang. Sel utuh dari bakteri *E. coli* non patogen, EPEC K1.1, *Salmonella typhi*, *Shigella* sp., *Lactobacillus* sp., serta protein musin dan tripsin digunakan sebagai antigen, sedangkan protease ekstraseluler EPEC sebagai digunakan antigen kontrol positif.

Uji Serologi

Uji serologi dengan metode dot blot dilakukan untuk menguji serum poliklonal, penapisan hibridoma, maupun uji spesifisitas antibodi monoklonal. Adapun pengukuran titer antibodi monoklonal hasil sekresi hibridoma yang positif dilakukan menggunakan metode ELISA. Uji tersebut dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

1. Metode dot blot/slot blot

Sebanyak 10 µL antigen diteteskan pada membran nitroselulosa dan dibiarkan mengering sehingga antigen terikat pada membran. Selanjutnya, membran diblok dengan skim-PBS 0,5% dan dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali. Antibodi yang diuji (antibodi poliklonal, hasil sekresi hibridoma, dan antibodi monoklonal) diteteskan di atas antigen terikat membran sebanyak 10 µL dan diinkubasi selama 15 menit. Membran lalu dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali untuk menghilangkan antibodi yang tidak berikatan dengan antigen. Selanjutnya, 10 µL konjugat (*goat anti mouse* IgG) yang berlabel HRP (*horseradish peroxidase*) (Sigma) diteteskan di atas membran tersebut dan diinkubasi selama satu jam pada suhu ruang. Larutan α -chloronaphthol yang mengandung substrat H₂O₂ 3% (v/v) kemudian ditambahkan untuk

melihat hasil uji. Hasil uji positif akan menunjukkan titik/garis hitam pada membran yang digunakan.

2. Metode ELISA

Pada pengujian ini, digunakan cawan polystiren dengan 96 sumuran (Costar) dan masing-masing sumur dilapisi 0,1 mL protease EPEC yang diencerkan dengan buffer sodium karbonat-bikarbonat dengan pH 9,6 dan diinkubasi semalam pada suhu 4 °C. Setelah semalam, setiap sumuran cawan dicuci 5 kali menggunakan 0,1 mL PBS yang mengandung Tween-20 0,05% v/v (PBS-T). Selanjutnya, dilakukan *blocking* dengan PBS-skim 0,5% sebanyak 0,1 mL pada setiap sumuran dan inkubasi selama tiga jam pada suhu ruang. Cawan kemudian dicuci kembali dengan PBS-T sebanyak 5 kali. Sampel antibodi monoklonal, serum kontrol positif dan negatif, serta media RPMI 1640 yang masing-masing telah diencerkan dengan pengenceran 1, 10⁻¹, dan 10⁻² ditambahkan ke dalam sumuran sebanyak 0,1 mL. Cawan yang telah diisi sampel dan kontrol selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama satu jam. Cawan kemudian dicuci kembali sebanyak 4 kali dengan PBS-T dan ditambahkan 0,1 mL konjugat (*goat anti mouse IgG*) yang dilabel

dengan HRP (*horseradish peroxidase*) (Sigma) yang telah diencerkan dengan PBS-T lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Cawan kemudian dicuci 4 kali dengan PBS-T dan ditambahkan 0,1 mL substrat yang terdiri atas 0,4 mg/mL O-penylenediamine dihydrochloride (OPD) dalam 50 mM buffer fosfat-sitrat dengan pH 5,0 yang mengandung 0,5% H₂O₂ (v/v). Cawan kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 2N H₂SO₄. Titer diukur dengan mengukur nilai kerapatan optiknya (*optical density/OD*). Nilai OD dibaca dengan ELISA reader (Stat Fax 2100) pada panjang gelombang 492 nm. Nilai absorbansi menunjukkan nilai titer antibodi yang diukur.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Antigen

Rataan konsentrasi protein dan aktivitas terhadap musin dari protease ekstraseluler EPEC K1.1 yang ditumbuhkan pada media LCT-skim-pati sampai tahap purnian dengan sentricon lebih tinggi dibandingkan dengan EPEC K1.1 yang ditumbuhkan pada media minimal M9 (Tabel 1).

Tabel 1. Konsentrasi dan aktivitas protease EPEC K1.1 terhadap substrat musin

Media produksi	Konsentrasi protein(mg/ml)	Aktivitas protease (UI/ml)	Aktivitas spesifik (UI/mg)
LCT-skim-pati	9,85 ± 0,114	6,8 ± 0,044	0,69
M9	0,412 ± 0,316	0,078 ± 0,120	0,19

Perbedaan konsentrasi dan aktivitas tersebut dapat terjadi karena adanya perbedaan suplemen pada media penumbuhannya. Media minimal tidak mengandung protein sedangkan LCT-skim-pati merupakan media yang kaya protein. Dengan demikian,

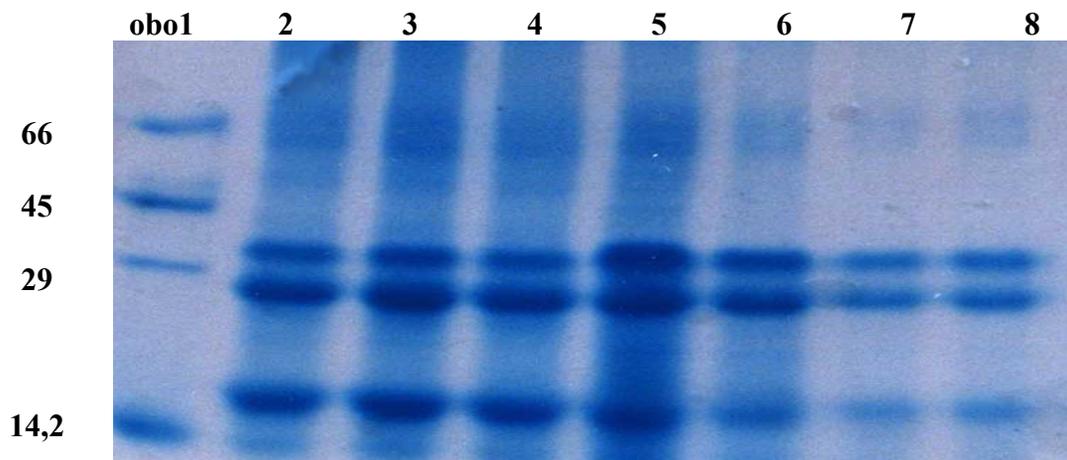
protease yang diekskresikan oleh bakteri yang tumbuh dalam media kaya protein akan lebih banyak dibandingkan dengan bakteri yang ditumbuhkan pada media miskin protein. Hal ini karena *E. coli* tidak akan memproduksi enzim protease secara berlebihan bila tidak

tersedia protein di lingkungan sekitarnya. Penelitian Khayoon dan Al Sa'ady (2022) menunjukkan bahwa *E. coli* akan menghasilkan protease secara maksimal pada lingkungan kaya protein seperti *brain heart infusion agar* dan *skim milk agar*. Namun, penggunaan protease ekstraseluler EPEC K1.1 yang ditumbuhkan pada media LCT-skim-pati yang telah dimurnikan sampai tahap pemurnian dengan sentricon bila digunakan sebagai antigen ternyata menghasilkan antibodi yang bereaksi silang dengan media penumbuhannya (LCT-skim-pati). Dengan demikian, antibodi yang diperoleh tidak spesifik terhadap protease saja. Hal ini dapat disebabkan oleh belum murninya antigen tersebut. Leenaars dan Hendriksen (2005) menyatakan bahwa antigen yang digunakan sebagai agen imunisasi pada tahapan produksi monoklonal harus murni untuk menghindari produksi antibodi tidak spesifik yang tidak diinginkan.

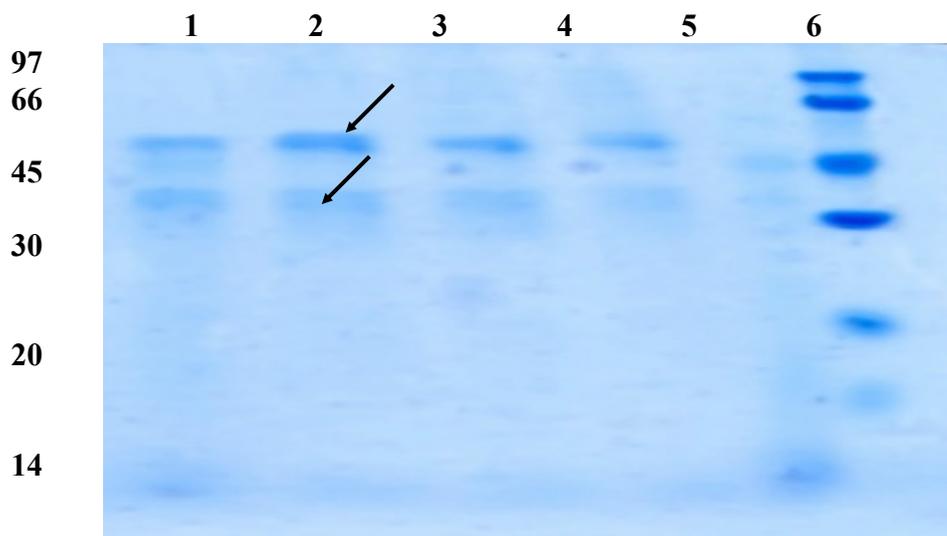
Bakteri ditumbuhkan pada media produksi yang tidak mengandung protein untuk memperoleh protease EPEC yang tidak terkontaminasi oleh protein lain. Hal ini akan

membuat protein yang diekstraksi dari hasil produksi tersebut hanya bersumber dari hasil metabolisme bakteri yang ditumbuhkan. Media M9 merupakan media sintesis yang hanya mengandung garam-garam elektrolit tanpa protein sebagai sumber karbonnya. Media ini merupakan media yang digunakan untuk memelihara *E. coli* strain liar C untuk waktu yang lama (beberapa tahun). *Escherichia coli* strain liar C merupakan bakteri yang tidak mempunyai plasmid fertilisasi (F⁻) dan juga tidak mempunyai batasan inang tetapi mempunyai aktivitas untuk memodifikasi (Green dan Sambrook, 2012). Dengan demikian, media ini dapat digunakan untuk menumbuhkan EPEC.

Hasil pemurnian antigen tersebut menunjukkan bahwa enzim protease dapat disintesis secara konsisten oleh EPEC K1.1 pada media minimal. Kondisi optimal untuk mensintesis protease ekstraseluler sesuai dengan kondisi optimal untuk pertumbuhan EPEC, karena sintesis enzim protease ekstraseluler EPEC sangat dipengaruhi oleh faktor fisiologis dan lingkungan selama pertumbuhan (Pokharel *et al.*, 2019).



Gambar 1. Visualisasi protein protease EPEC K1.1 media produksi LCT-skim-pati: (1) penanda bobot molekul (kDa), (2-3) protease EPEC hasil sentricon, (4) protease EPEC hasil khromatografi, (5) protease EPEC hasil dialysis (6) protease EPEC hasil pengendapan ammonium sulfat, (7) ekstrak kasar, (8) media LCT-skim-pati.



Gambar 2. Visualisasi protein protease EPEC K1.1 media produksi M9: (1-4) protease EPEC K1.1 dengan pengendapan ammonium sulfat, (5) musin, (6) penanda berat molekul (kDa)

Hasil elektroforesis pada SDS-PAGE dari protease yang dimurnikan dari EPEC K1.1 yang ditumbuhkan pada media LCT-skim-pati mempunyai lima pita protein dengan bobot molekul masing-masing 60,9 kDa, 39,3 kDa, 32,9 kDa, 23,9 kDa, dan 17,3 kDa (Gambar 1), sedangkan protease EPEC K1.1 yang ditumbuhkan pada media M9 hanya memperoleh dua pita protein dengan bobot molekul kira-kira 58,6 kDa dan 37,4 kDa (Gambar 2). Namun, konfirmasi uji zimogram menunjukkan bahwa hanya protein dengan bobot molekul 39,9 kDa yang mampu mendegradasi senyawa musin (Nurhayati 2000).

Kedua gambar tersebut menunjukkan adanya perbedaan jumlah pita karena perbedaan media produksi yang digunakan. Meskipun demikian, bobot molekul protein yang memiliki aktivitas protease hampir sama dengan salah satu pita dari protease EPEC yang ditumbuhkan dengan media minimal, yaitu 39,3 kDa pada media LCT-skim-pati dan 37,4 kDa pada media M9.

Aktivitas protease terhadap IgA merupakan salah satu faktor proinflamasi sejumlah bakteri patogen seperti *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*,

Haemophilus influenzae type B, dan *Sutterella* sp., (Kaakoush 2020). Pengujian terhadap kemampuan beberapa bakteri enterik dalam menghasilkan protease serta aktivitas protease IgA sudah pernah dilaporkan, mengingat terdeteksinya aktivitas protease IgA dari sample tinja. Namun, hingga saat ini hanya *Bacteroides melanogebicus* dan *B. asaccharolyticus* yang menunjukkan adanya produksi protease IgA, sedangkan bakteri enterik anaerob lainnya seperti enterococci dan coliforms tidak menghasilkan protease. Protease IgA dari bakteri ini hanya mampu menghidrolisis IgA₁ tetapi tidak mempunyai aktivitas terhadap musin (Mulks 2018). Penelitian yang dilakukan terhadap EPEC menunjukkan bahwa bakteri ini menghasilkan protease yang mempunyai aktivitas terhadap musin, tetapi aktivitasnya terhadap IgA₁ masih perlu dikaji lebih lanjut.

Antibodi Poliklonal

Hasil uji dot blot terhadap antibodi poliklonal yang diperoleh dari mencit yang diimunisasi dengan protease EPEC yang ditumbuhkan pada media LCT-skim-pati menunjukkan adanya reaksi silang dengan media penumbuhnya. Hal ini membuktikan

bahwa protein pada media penumbuh cukup imunogenik sehingga menginduksi terbentuknya antibodi. Keberadaan protein media selain protease EPEC pada antigen 1 dapat dilihat dari gambaran elektroforesis antigen tersebut. Gambar 1 menunjukkan keberadaan tiga pita protein media yang sama dengan pita protein antigen 1. Ketiga pita protein tersebut diduga turut menginduksi terbentuknya antibodi antimedia yang menyebabkan ter-

jadinya reaksi silang. Cemaran ketidakmurnian dalam antigen yang digunakan untuk imunisasi hewan donor serum hiperimun dapat menyebabkan dominasi antibodi terhadap cemaran ketidakmurnian dalam produk yang dihasilkan (Leenaars dan Hendriksen, 2005). Selain itu, cemaran juga dapat menimbulkan variasi kualitas tiap *batch* serta memengaruhi performa antibodi monoklonal yang dihasilkan (Limonier 2019).

Tabel 2. Hasil uji dot blot serum mencit yang diimunisasi dengan protease EPEC dari kedua jenis media

Serum	Antigen			
	Protease 1	Media LCT-skim-pati	Protease 2	M9
Antibodi 1	+	+	-	-
Antibodi 2	-	-	+	-

Imunisasi mencit BALB/c dengan enzim protease ekstraseluler EPEC K1.1 yang ditumbuhkan pada media M9 baru menunjukkan terbentuknya antibodi setelah penyuntikan ke-7. Hasil ini tampak dari uji dot blot yang dilakukan pada serum yang diambil pada hari ke-51. Hasil ini berbeda dengan imunisasi antigen 1, karena antibodi sudah terbentuk setelah penyuntikan kedua. Hal ini dapat disebabkan oleh kompleksitas dari masing-masing antigen yang berbeda. Antigen 1 memiliki kandungan protein yang lebih beragam dibandingkan dengan antigen 2, sehingga antibodi yang diinduksi oleh antigen 1 lebih cepat muncul dibandingkan antibodi yang diinduksi oleh antigen 2. Antigen berupa polipeptida dan protein yang berukuran lebih besar akan merangsang respons imun yang lebih kuat, terutama jika antigen tersebut dalam bentuk dimer atau polimer dan dicampur dengan adjuvan (Shi *et al.*, 2019, Lee *et al.*, 2010).

Titer antibodi hasil induksi antigen 2 yang diperoleh meningkat setelah penyuntikan ke-8 dan ke-9. Serum dari kedua penyuntikan masing-masing diambil pada hari ke-62 dan ke-69. Adapun hasil uji dot blot kedua serum menunjukkan hasil positif sampai pada pengenceran 2^2 dan 2^7 . Hasil uji

terhadap serum positif menunjukkan tidak adanya reaksi silang antara antibodi poliklonal dengan media produksi (Tabel 2). Hal ini membuktikan bahwa protein antigen 2 cukup murni dan bersifat imunogenik.

Produksi Sel Hibridoma

Hibridoma terbentuk pada minggu ke-4 setelah fusi. Hal ini disajikan pada Gambar 3, karena beberapa sel yang telah berfusi tumbuh dan bergerombol. Menurut Hamilton dan Davis (1995), pertumbuhan sel hibridoma dipengaruhi oleh beberapa variabel antara lain kondisi sel B dari mencit yang diimunisasi, kondisi pertumbuhan mieloma, komposisi media kultur dan kemungkinan adanya kontaminan seperti fibroblast dan makrofag pada kultur primer. Dalam kondisi optimal, kemungkinan terbentuknya hibridoma adalah 2000-3000 sel dari 5×10^7 sel limpa bila memakai mitogen sel B sebagai suplemen pada media kultur. Perbandingan antara sel limpa dengan mieloma pada saat fusi di beberapa laboratorium biasanya adalah 10:1 tetapi bila media kultur yang digunakan cukup kaya maka perbandingan tersebut dapat dikurangi (Holzlöhner dan Hanack, 2017; Zola 1987). Pada penelitian ini, digunakan sel limpa sebanyak 2×10^7 dengan

perbandingan antara sel limpa dan mieloma adalah 7:1, sehingga diharapkan terbentuknya hibridoma akan lebih cepat. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa hibridoma baru terbentuk pada minggu ke-4 tetapi sekreta dari hibridoma tersebut dengan pengujian dot blot masih negatif. Hasil uji tersebut dimungkinkan karena masih rendahnya titer

antibodi dari sekreta hibridoma tersebut. Penelitian Yokoyama *et al.* (2013) menunjukkan bahwa guna mencapai produksi antibodi monoklonal yang optimal, skrining sel dilakukan dua hingga tiga minggu setelah fusi dan empat minggu setelah fusi untuk menentukan jumlah hibrid yang dapat ditapis dan diklonkan.

Tabel 3. Penapisan sekreta hibridoma dengan slot blot

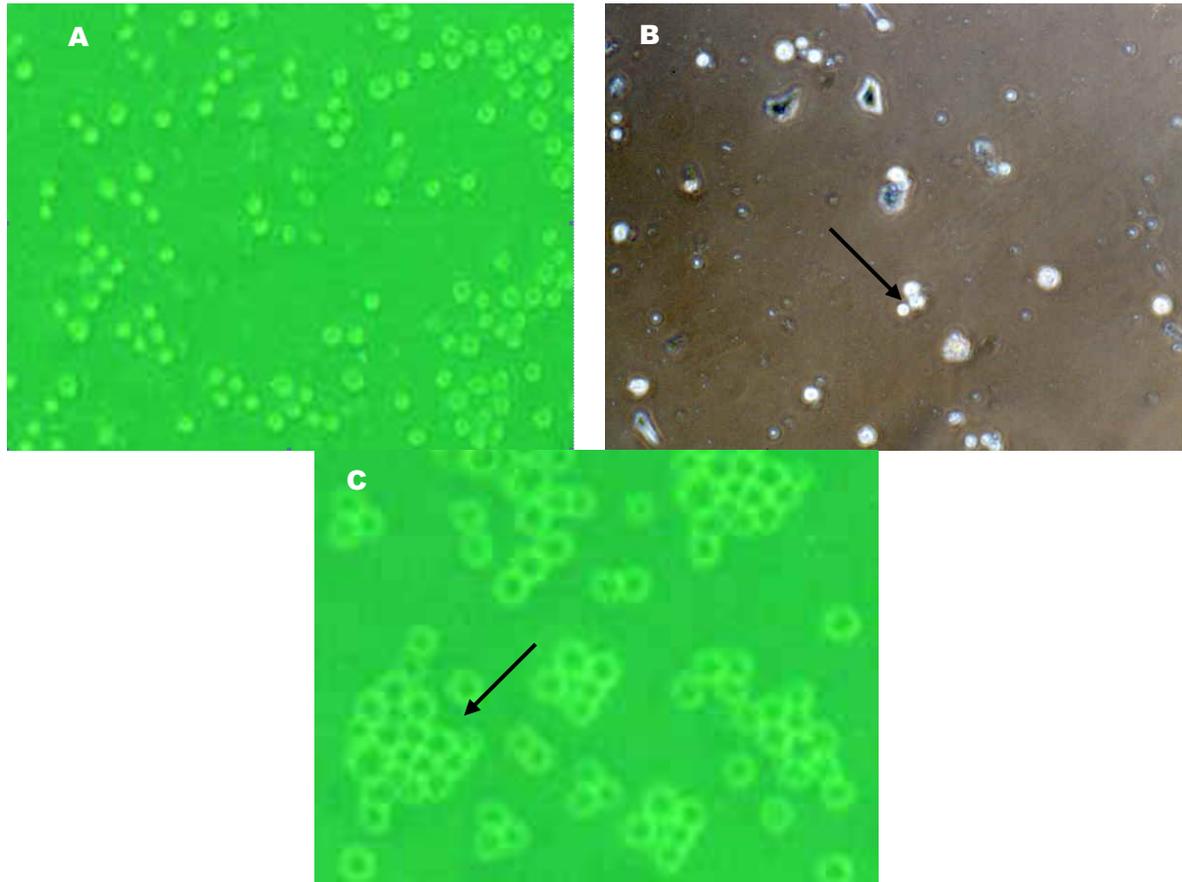
Sumuran Nomor	Hasil uji	Sumuran Nomor	Hasil uji
1a	–	1c	+
2a	–	2c	–
3a	–	3c	–
4a	+	4c	–
5a	–	5c	+
6a	–	6c	–
1b	–	1d	–
2b	+	2d	–
3b	–	3d	+
4b	+	4d	–
5b	–	5d	–
6b	–	6d	–



Gambar 3. Hasil dot blot monoklonal yang diambil pada minggu ke-6 dengan antigen protease: No. 1-2 Poliklonal, No. 3-4 Serum negatif, No. 5-8 Monoklonal



Gambar 6. Uji reaksi silang antibodi monoklonal dengan beberapa antigen (A) No. 1-2 Tripsin, No. 3-4 Musin; (B) No. 1 *E. coli* non-patogen, No. 2 EPEC K1.1, No. 3 *Salmonella tiphy*, No. 4 *Shigella* sp.; (C) No. 1-2 *Lactobacillus* sp., No. 3-4 Protease



Gambar 4. (a) Sel Mieloma Sp2/0, (b) Fusi sel mieloma dengan sel limpa, (c) Koloni Hibridoma.

Hasil uji Serologi Sekreta Hibridoma

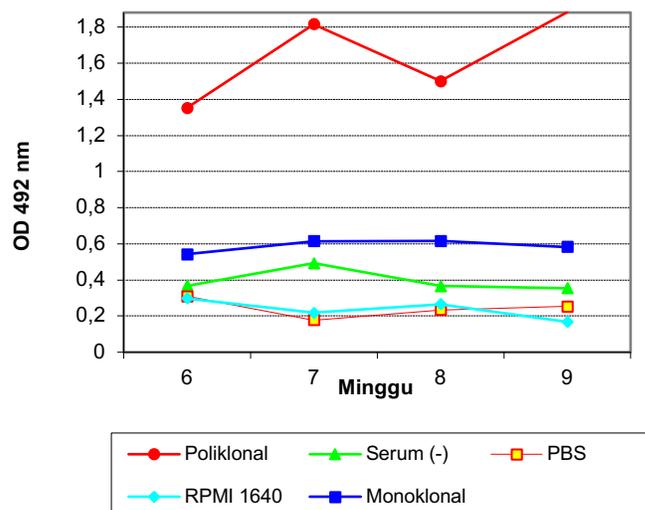
Penapisan sel hibridoma menunjukkan bahwa klon pada sumur 4a, 2b, 4b, 1c, 4c, dan 3d berhasil mensekresikan antibodi antiprotease EPEC K1.1 dari 24 sumur yang ada pada minggu ke-6 setelah fusi (Tabel 4). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat 25% klon yang berhasil mensekresikan antibodi monoklonal anti-protease

EPEC K1.1, seperti yang disajikan pada Gambar 3. Hasil uji serologi sekreta hibridoma dengan metode ELISA menunjukkan terjadinya kenaikan titer antibodi dari cairan hibridoma pada minggu ke-6, ke-7, dan ke-8 dan penurunan setelah minggu ke-9 seperti yang disajikan pada Tabel 5 dengan titer tertinggi pada klon 1 (Gambar 5).

Tabel 4. Nilai absorbansi antibodi monoklonal dari masing-masing klon positif dengan metode ELISA

Bahan uji vs protease EPEC	Nilai absorban pada OD 492 nm minggu ke :			
	6	7	8	9
Poliklonal	1,353±0,481	1,815±0,529	1,501±0,529	1,882±0,017
Serum kontrol negatif	0,368±0,012	0,493±0,016	0,366±0,012	0,506±0,006
PBS	0,310±0,002	0,177±0,009	0,234±0,035	0,253±0,027
Media kultur (RPMI 1640)	0,297±0,002	0,219±0,031	0,265±0,002	0,168±0,053

Klon 1	0,543±0,044	0,614±0,025	0,616±0,054	0,583±0,074
Klon 2	0,421±0,110	0,571±0,015	0,535±0,30	0,470±0,035
Klon 3	0,356±0,020	0,579±0,039	0,575±0,051	0,532±0,010
Klon 4	0,347±0,029	0,589±0,053	0,568±0,073	0,553±0,05
Klon 5	0,353±0,012	0,602±0,068	0,512±0,152	0,458±0,038
Klon 6	0,331±0,013	0,563±0,014	0,551±0,005	0,547±0,231



Gambar 5. Nilai absorbansi rata-rata antibodi monoklonal dengan metoda ELISA

Pengamatan terhadap rata-rata nilai absorbansi antibodi monoklonal dan serum negatif pada tingkat pengenceran 1, 10^{-1} , dan 10^{-2} yang merupakan sekreta hibridoma pada minggu ke-8 setelah fusi dapat dilihat pada Tabel 5. Tampak terjadi penurunan rata-rata nilai absorbansi dari antibodi monoklonal dengan meningkatnya pengenceran, sedangkan rata-rata nilai absorbansi serum negatif relatif tetap. Perbandingan antara nilai absorbansi antibodi monoklonal dengan serum negatif pada pengenceran tersebut adalah

1,57:1, 1,52:1 dan 1,38:1. Penentuan titer antibodi dengan metode ELISA dapat dihitung berdasarkan perbandingan antara nilai absorbansi serum positif dengan nilai absorbansi *background* serum negatif. Serum dikatakan positif bila batas perbandingan terendah dari nilai absorbansi serum positif adalah 1,5 kali nilai absorbansi serum kontrol negatif (Kemeny dan Sarmay 1992). Dengan demikian, dapat ditentukan bahwa titer antibodi monoklonal tersebut adalah 10^1 .

Tabel 5. Perbandingan nilai absorbansi antibodi monoklonal dengan serum kontrol negatif pada metode ELISA

Bahan uji vs protease EPEC	Nilai absorbansi pada OD 492 nm pada pengenceran ke :		
	1	10^{-1}	10^{-2}
Antibodi monoklonal	0,575 ±0,051	0,527±0,074	0,452±0,026
Serum kontrol negatif	0,366±0,012	0,346±0,068	0,326±0,029
Perbandingan	1,57:1	1,52:1	1,38:1.

Tabel 6. Uji spesifisitas antibodi monoklonal dengan beberapa antigen bakteri menggunakan metode slot blot

Antigen	Reaksi silang terhadap antibodi monoklonal
<i>E. coli</i> non-patogen	-
EPEC K1.1	-
<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Shigella</i> sp	-
<i>Lactobacillus</i> sp	-

Uji reaksi silang dengan metode slot blot menggunakan bakteri *E. coli* non patogen, EPEC K1.1, *Salmonella typhi*, *Shigella* sp dan *Lactobacillus* sp (Tabel 6) serta protein musin dan tripsin sebagai antigen menunjukkan tidak adanya reaksi silang antara antibodi antiprotease dengan antigen-antigen tersebut (Tabel 7). Hal ini menunjukkan bahwa antibodi antiprotease yang dihasilkan bersifat spesifik hanya terhadap protease EPEC K1.1. Hal ini karena antibodi monoklonal mempunyai sifat hanya bereaksi dengan epitop pada afinitas tunggal yang mempunyai isotipe spesifisitas dan aktivitas tunggal terhadap antigen (Chandra *et al.*, 2022).

SIMPULAN

Antibodi monoklonal antiprotease EPEC dapat diproduksi dengan menggunakan enzim ekstraseluler protease EPEC yang diekstraksi dari bakteri yang ditumbuhkan pada media minimal M9 sebagai antigen. Antibodi monoklonal yang diperoleh mempunyai titer 10 (diukur dengan metode ELISA) dan hanya spesifik untuk protease EPEC.

SARAN

Hasil penelitian ini menunjukkan potensi antibodi monoklonal sebagai metode penanganan diare akibat EPEC. Dengan

Tabel 7. Uji spesifisitas antibodi monoklonal dengan beberapa antigen protein menggunakan metode slot blot

Antigen	Reaksi silang terhadap antibodi monoklonal
Protease	+
EPEC	-
Musin	-
Tripsin	-

demikian, telaah lebih lanjut mengenai potensi metode ini, khususnya dalam hal pembuatan sediaan yang mudah disimpan dan digunakan serta uji klinis *in vivo*, perlu dilakukan untuk membuka jalan bagi pemanfaatan metode ini secara luas.

DAFTAR PUSTAKA

- Alahi MEE, Mukhopadhyay SC. 2017. Detection methodologies for pathogen and toxins: A review. *Sensors* 17(8): 1885.
- Amézquita-López BA, Soto-Beltrán M, Lee BG, Yambao JC, Quiñones B. 2018. Isolation, genotyping and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 51(4): 425–434. doi:-<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.07.004>.
- Bager AM, Naeem AK. 2022. Phenotypic Detection of Some Virulence Factors of Enteropathogenic *E. coli* Isolated from Children with Diarrhea in Alnajaf AL Ashraf/Iraq. *Methods* 15(1).
- Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M. 2022. Methods of Enzymatic Analysis, Yol. I., Fundamentals. Di dalam: Volume 4, Number 3. De Gruyter. Hlm. 300.

- Budiarti SRI, Mubarik NR. 2007. Extracellular protease activity of enteropathogenic *Escherichia coli* on mucin substrate. *Hayati Journal of Biosciences* 14(1):36–38.
- Camirero A, Guzman M, Libertucci J, Lomax AE. 2023. The emerging roles of bacterial proteases in intestinal diseases. *Gut Microbes* 15(1): 2181922.
- Chandra V, Tiwari A, Pant KK, Bhatt R. 2022. Animal Cell Culture: Basics and Applications. Di dalam: *Industrial Microbiology and Biotechnology*. Berlin. Springer. Hlm. 691–719.
- Constantin C, Neagu M, Supeanu TD, Chiurciu V, Spandidos DA. 2020. IgY-turning the page toward passive immunization in COVID-19 infection. *Experimental and Therapeutic Medicine* 20(1):151–158.
- Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D. 2021. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 19(1):37–54.
- Eltai NO, Al Thani AA, Al Hadidi SH, Al Ansari K, Yassine HM. 2020. Antibiotic resistance and virulence patterns of pathogenic *Escherichia coli* strains associated with acute gastroenteritis among children in Qatar. *BMC microbiology* 20:1–12.
- George CM, Burrowes V, Perin J, Oldja L, Biswas S, Sack D, Ahmed S, Haque R, Bhuiyan NA, Parvin T. 2018. Enteric infections in young children are associated with environmental enteropathy and impaired growth. *Tropical Medicine & International Health* 23(1):26–33.
- Giron JA, Qadri F, Azim T, Jarvis KJ, Kaper JB, Albert MJ. 1995. Monoclonal antibodies specific for the bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 63(12):4949–4952.
- Govindarajan DK, Viswalingam N, Meganathan Y, Kandaswamy K. 2020. Adherence patterns of *Escherichia coli* in the intestine and its role in pathogenesis. *Medicine in Microecology* 5:100025.doi:10.1016/j.medmic.2020.100025.
- Green MR, Sambrook J. 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hamilton MJ, Davis WC. 1995. Culture conditions that optimize outgrowth of hybridomas. *Methods Mol Biol* 45:17–28
- Hillman Y, Gechtler J, Lustiger D, Even D, Braverman D, Dror Y, Sal-Man N, Wine Y. 2020. An anti-bacterial monoclonal antibody that targets pathogenic bacteria expressing the type 3 secretion system for therapeutic and diagnostic applications. Authorea. <https://advance.sagepub.com/doi/full/10.22541/au.157878419.98634382>
- Holzlohner P, Hanack K. 2017. Generation of murine monoclonal antibodies by hybridoma technology. *Journal of Visualized Experiments* 119:e54832.
- Kaakoush NO. 2020. Sutterella species, IgA-degrading bacteria in ulcerative colitis. *Trends in Microbiology* 28(7):519–522.
- Kemeny D, Sarmay G. 1992. *A practical guide to ELISA*: DM Kemeny. Oxford. Pergamon Press.
- Khayoon AR, Al Sa'ady AJ. 2022. Optimum Conditions of Production and Purification of Gastroenteritis *E. coli* Protease Isolated from Iraqi Patients. *Iraqi journal of Biotechnology*. 21(2).
- Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. 2020. *Bradford assay for determining protein concentration*. Cold Spring Harbor Protocols. 2020(4):pdb. Prot-102269.

- King J. 2022. Using T4 genetics and Laemmli's development of high-resolution SDS gel electrophoresis to reveal structural protein interactions controlling protein folding and phage self-assembly. *Journal of Biological Chemistry* 298(10).
- Kirk MD, Pires SM, Black RE, Caipo M, Crump JA, Devleeschauwer B, Döpfer D, Fazil A, Fischer-Walker CL, Hald T. 2015. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 food-borne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis. *PLoS Medicine* 12(12):e1001921.
- Lee B-S, Huang J-S, Jayathilaka GLP, Lateef SS, Gupta S. 2010. Production of anti-peptide antibodies. *Immunoelectron Methods Mol Biol* 657: 93–108.
- Leenaars M, Hendriksen CF. 2005. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 46(3):269–279.
- Limonier F. 2019. Prevention is better than cure: Non-targeted and sensitive screening of impurities in plasma-derived immunoglobulin with mass spectrometry-based proteomics. Ghent. Ghent University.
- Liu B, Furevi A, Perepelov AV, Guo X, Cao H, Wang Q, Reeves PR, Knirel YA, Wang L, Widmalm G. 2020. Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiology Reviews* 44(6):655–683.
- Liu H, Meng L, Dong L, Zhang Y, Wang J, Zheng N. 2021. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Escherichia coli* isolated from raw milk in dairy herds in Northern China. *Frontiers in Microbiology* 2720.
- Mulks MH. 2018. Microbial IgA proteases. Di dalam: *Bacterial enzymes and virulence*. Boca Raton, Florida. CRC Press. Hlm. 81–104.
- Nurhayati T. 2000. Pemurnian dan karakterisasi protease Enteropathogenik *Escherichia coli* K1. 1 sebagai bahan-antigen. <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/5792>
- Osman M, Kassem II, Dabboussi F, Cummings KJ, Hamze M. 2023. The indelible toll of enteric pathogens: Prevalence, clinical characterization, and seasonal trends in patients with acute community-acquired diarrhea in disenfranchised communities. *Plos one* 18(3):e0282844.
- Pakbin B, Brück WM, Rossen JW. 2021. Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: A review. *International Journal of Molecular Sciences* 22(18):9922.
- Pokharel P, Habouria H, Bessaiah H, Dozois CM. 2019. Serine protease auto-transporters of the Enterobac-teriaceae (SPATEs): out and about and chopping it up. *Microorganisms* 7(12):594.
- Praekelt U, Reissbrodt R, Kresse A, Pavankumar A, Sankaran K, James R, Jesudason M, Anandan S, Prakasam A, Balaji V. 2014. Monoclonal antibodies against all known variants of EspA: development of a simple diagnostic test for enteropathogenic *Escherichia coli* based on a key virulence factor. *Journal of Medical Microbiology* 63(Pt 12):1595.
- Rodrigues RS, da Silva Lima NC, Taborda RLM, Esquerdo RP, Gama AR, Nogueira PA, Orlandi PP, Matos NB. 2019. Antibiotic resistance and biofilm formation in children with Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Brazilian Amazon. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 13(08):698–705.

- Rogawski ET, Liu J, Platts-Mills JA, Kabir F, Lertsethtakarn P, Siguas M, Khan SS, Praharaj I, Murei A, Nshama R. 2018. Use of quantitative molecular diagnostic methods to investigate the effect of enteropathogen infections on linear growth in children in low-resource settings: longitudinal analysis of results from the MAL-ED cohort study. *The Lancet Global Health* 6(12):e1319–e1328.
- Shi S, Zhu H, Xia X, Liang Z, Ma X, Sun B. 2019. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine* 37(24):3167–3178.
- Spano LC, da Cunha KF, Monfardini MV, de Cássia Bergamaschi Fonseca R, Scaletsky ICA. 2017. High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* carrying toxin-encoding genes isolated from children and adults in southeastern Brazil. *BMC Infectious Diseases* 17(1):1–9.
- Syahrlul F, Wahyuni CU, Notobroto HB, Wasito EB, Adi AC, Dwirahmadi F. 2020. Transmission media of foodborne diseases as an index prediction of diarrheagenic *Escherichia coli*: Study at elementary school, Surabaya, Indonesia. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(21):8227.
- Thuthikkadu IS, Karthikeyan M, Gopal G, Ambi SV, Sekaran S, Palaniappan B, Diraviyam T. 2021. Antibody therapy against antibiotic-resistant diarrheagenic *Escherichia coli*: a systematic review. *Immunotherapy* 13(15):1305–1320.
- Vandekerchove DGF, Kerr PG, Callebaut AP, Ball HJ, Stakenborg T, Marien J, Peeters JE. 2002. Development of a capture ELISA for the detection of antibodies to enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in rabbit flocks using intimin-specific monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology* 88(4):351–366.
- Wibawan IWT, Pasaribu FH, Rawendra R. 2010. Production of IgY specific antibody against enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in egg yolk. *Jurnal Kedokteran Hewan-Indonesian Journal of Veterinary Sciences* 4(1).
- World Health Organization. 2015. *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015*. Geneva. World Health Organization.
- Yokoyama WM, Christensen M, Santos GD, Miller D, Ho J, Wu T, Dziegielewski M, Neethling FA. 2013. Production of monoclonal antibodies. *Current Protocols in Immunology*. 102(1):-2.5.1-2.5.29.
- Zola H. 1987. *Monoclonal antibodies: a manual of techniques*. Boca Raton, Florida. CRC press.