



**ANALISIS PERUBAHAN KADAR IgG SERUM PASCAINJEKSI
PROTEIN PILI 65,5 KDA *Klebsiella pneumoniae* MENCIT
GALUR BALB/C: STUDI EKSPERIMENTAL
VAKSIN PNEUMONIA**

*Diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan memperoleh gelar Sarjana
Kedokteran pada Program Studi Pendidikan Dokter (S1).*

SKRIPSI

Oleh

**Priska Liana Lutianto
212010101088**

**KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET, DAN
TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN
PENDIDIKAN DOKTER
JEMBER
2025**



**ANALISIS PERUBAHAN KADAR IgG SERUM PASCAINJEKSI
PROTEIN PILI 65,5 KDA *Klebsiella pneumoniae* MENCIT
GALUR BALB/C: STUDI EKSPERIMENTAL
VAKSIN PNEUMONIA**

SKRIPSI

*Diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan memperoleh gelar Sarjana
Kedokteran pada Program Studi Pendidikan Dokter (S1).*

Oleh
Priska Liana Lutianto
212010101088

**KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET, DAN
TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN
PENDIDIKAN DOKTER
JEMBER
2025**

**ANALISIS PERUBAHAN KADAR IgG SERUM PASCAINJEKSI
PROTEIN PILI 65,5 KDA *Klebsiella pneumoniae* MENCIT
GALUR BALB/C: STUDI EKSPERIMENTAL
VAKSIN PNEUMONIA**

Oleh

Priska Liana Lutianto

NIM 212010101088

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Dini Agustina, M.Biomed.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Erfan Effendi, Sp.An.

PERSEMBAHAN

Dengan rasa syukur yang mendalam dengan telah diselesaikannya skripsi ini. Penulis mempersembahkan skripsi ini untuk:

1. Kedua orang tua saya, Bapak Laurensius Lutianto dan Ibu Veronika Sunaiya Dwi Martalia, yang senantiasa memberikan motivasi, doa dan dukungan untuk meraih cita-cita.
2. Saudariku, Adik Theresia Faustina Lutianto yang selalu memberikan semangat atas usaha yang saya lalui.
3. Dosen Pembimbing Akademik, Dr. dr. Dina Helianti, M.Kes. yang selalu memberikan arahan, saran dan masukan selama pendidikan saya menempuh sarjana.
4. Dosen Pembimbing Utama, dr. Dini Agustina, M.Biomed. yang senantiasa memberikan ilmu, bantuan, doa, dan dukungan hingga peneliti dinyatakan lulus.
5. Dosen Pembimbing Anggota, dr. Erfan Efendi, Sp.An. yang selalu memberikan arahan dan ilmu selama proses pengerjaan skripsi.
6. Dosen Penguji Utama, Dr. Dr. Yunita Armiyanti, M.Kes., Sp.Par.K. yang telah memberikan bantuan, masukan dan saran sehingga peneliti dapat menyelesaikan karya skripsi ini.
7. Dosen Penguji Anggota, dr. Rosita Dewi, M.Biotek. yang senantiasa memberikan tenaga, waktu dan pikiran sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.
8. Almamater, Fakultas Kedokteran Universitas Jember tempat saya menimba ilmu dalam perjalanan menjadi seorang dokter.

MOTTO

“Ora et Labora, Berdoa dan Berusaha”

PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Priska Liana Lutianto

NIM : 212010101088

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: *ANALISIS PERUBAHAN KADAR IgG SERUM PASCA INJEKSI PROTEIN PILI 65,5 KDA Klebsiella pneumoniae MENCIT GALUR BALB/C: STUDI EKSPERIMENTAL VAKSIN PNEUMONIA* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 9 Desember 2024

Yang menyatakan,

Priska Liana Lutianto

NIM 212010101088

HALAMAN PERSETUJUAN

Skripsi berjudul *ANALISIS PERUBAHAN KADAR IgG SERUM PASCAINJEKSI PROTEIN PILI 65,5 KDA Klebsiella pneumoniae MENCIT GALUR BALB/C: STUDI EKSPERIMENTAL VAKSIN PNEUMONIA* telah diuji dan disetujui oleh Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada:

Hari : Senin
Tanggal : 18 Desember 2024
Tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Pembimbing	Tanda Tangan
1. Pembimbing Utama Nama : dr. Dini Agustina, M.Biomed NIP : 198308012008122003	(.....)

2. Pembimbing Anggota Nama : dr. Erfan Efendi, Sp.An NIP : 196803281999031001	(.....)
---	---------

Penguji	Tanda Tangan
1. Penguji Utama Nama : Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes., Sp.Par.K(.....) NIP : 197406042001122002	(.....)

2. Penguji Anggota 1 Nama : dr. Rosita Dewi, M.Biotek NIP : 198105182006041002	(.....)
--	---------

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a bacterium that is classified into the Enterobacteriaceae family and is one of the bacteria that causes respiratory tract infections. One of the respiratory infections caused is pneumonia. Treatment of the pneumonia infections is limited due to the find of isolates in the form of Multidrug-Resistance-*Klebsiella pneumoniae* (MDR-KP). Due to the complicate of the treatment, preventive management are needed by vaccination. Along with the development, a protein isolate with the thickest band was found with a molecular weight of 65.5 kDa which has the thickest band as a sign of the highest concentration. This indicates that the pili protein with a molecular weight of 65.5 kDa has antigenic properties that can bind to the immune response. Until now, no one has proven that the 65.5 kDa pili protein *Klebsiella pneumoniae* is immunogenic as a requirement for a substance to be called a vaccine. This study purpose is to analyze changes in serum IgG levels of BALB/C strain mice after injection of pili protein with a molecular weight of 65.5 kDa. This study was carried out at the Experimental Animal House, Microbiology Laboratory, and Biochemistry Laboratory from May to December 2024. This research is a pure experimental study with a randomized posttest only controlled group design which was divided into 3 groups: control group (KK) which given PBS, the adjuvant group (KA) which given a mixture of PBS and freund's adjuvant, and the experimental group (KP) which given a mixture of PBS, freund's adjuvant and protein pili 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae*. Blood samples were taken using the cardiac puncture method which were then the serum of blood samples measured using the ELISA method. The research results showed that the average IgG for the control group was $0.338 \pm 0,228$ pg/mL, the adjuvant group was $1.182 \pm 0,514$ pg/mL and the experimental group was $1.475 \pm 0,346$ pg/mL. The results of statistical tests using the One-Way ANOVA test show a p-value between groups of 0.000 ($p < 0.05$), which means that this research data has significant differences between research groups. The conclusion of this study was injection of pili protein with a molecular weight of 65.5 kDa *Klebsiella pneumoniae* was immunogenic proven by the increases serum immunoglobulin G levels in experimental group compared to control group as a normal value in male BALB/C strain mice.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Pili protein 65.5 kDa, Immunoglobulin G (IgG), Immunity

RINGKASAN

Analisis Perubahan Kadar IgG Serum Pascainjeksi Protein Pili 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae* Mencit Galur BALB/C: Studi Eksperimental Vaksin Pneumonia; Priska Liana Lutianto, 212010101088; 2024; 84 halaman; Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri yang digolongkan ke dalam famili Enterobacteriaceae menjadi salah satu bakteri penyebab infeksi saluran pernapasan yakni infeksi pneumonia. Dari tiga penderita terdapat satu penderita pneumonia yang tidak tertangani yang berujung kematian. Penanganan infeksi pneumonia menjadi semakin rumit karena ditemukannya isolat dalam bentuk *Multidrug-Resistance-Klebsiella pneumoniae* (MDR-KP). Oleh karena terbatasnya penanganan infeksi pneumonia maka dibutuhkan langkah yang tepat dengan pencegahan yaitu diberikan vaksin.

Vaksin berbasis protein pili merupakan salah satu kandidat paling efektif. Pili merupakan salah satu faktor virulensi yang bekerja dengan adhesi pada sel inang dan pembentukan *biofilm*. Penelitian sebelumnya telah didapatkan isolat protein pili bakteri *K. pneumoniae* dengan pita paling tebal yaitu dengan berat molekul 65,5 kDa yang bersifat antigenik yaitu dapat berikatan dengan respons imun. Untuk menghasilkan suatu produk vaksin, sebuah substans harus memiliki sifat imunogenik yang artinya dapat menginduksi respons imun protektif, bertahan lama, dan memiliki sifat mengingat antigen spesifik. Respons imun yang terinduksi salah satunya respons imun adaptif humoral yaitu antibodi. Salah satu antibodi penting yaitu Immunoglobulin G yang memiliki sejumlah kelebihan yaitu dapat mengingat antigen spesifik dan bertahan paling lama sampai dengan enam bulan. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis perubahan kadar IgG serum mencit jantan galur BALB/C pascainjeksi protein pili dengan berat molekul 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae* sebagai kandidat vaksin.

Penelitian ini dilaksanakan di Rumah Hewan Coba, Laboratorium Mikrobiologi, dan Laboratorium Biokimia pada bulan Mei hingga Desember 2024. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan *randomized posttest only controlled group design*. Sampel berupa 24 ekor mencit putih jantan galur BALB/C berusia 6-8 minggu dengan berat ± 25 gram yang diacak ke dalam tiga kelompok, yaitu: kelompok kontrol (KK) yang diberikan 200 uL PBS, kelompok adjuvan (KA) yang diberi campuran 100 uL PBS dan 100 uL *freund's adjuvant*, dan kelompok perlakuan (KP) yang diberi protein pili 65,5 kDa *K. Pneumoniae* sebanyak 8 uL yang dicampurkan kedalam 92 uL PBS kemudian ditambahkan 100 uL *freund's adjuvant*. Kelompok kontrol digunakan sebagai acuan nilai normal sedangkan kelompok adjuvan digunakan sebagai pembanding untuk kelompok perlakuan. Hewan coba akan diinjeksi secara intraperitoneal. Sampel darah diambil dengan metode *cardiac puncture* yang kemudian diukur dengan metode ELISA.

Hasil penelitian menunjukkan rata-rata IgG untuk kelompok kontrol $0,338 \pm 0,228$ pg/mL, kelompok adjuvan $1,182 \pm 0,514$ pg/mL dan kelompok

perlakuan $1,475 \pm 0,346$ pg/mL. Hasil uji statistik dengan uji *One-Way* ANOVA menunjukkan perbedaan antar kelompok yang signifikan ($p < 0,05$) dengan nilai signifikansi *p-value* 0,000. Hasil analisis uji *Post-Hoc* juga menunjukkan perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan nilai signifikansi *p-value* 0,000 ($p < 0,05$). Hasil uji *Post-Hoc* pada kelompok kontrol dan kelompok adjuvan menunjukkan perbedaan signifikan dengan nilai signifikansi *p-value* 0,001 ($p < 0,05$). Pada kelompok adjuvan dan perlakuan menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan dengan nilai signifikansi *p-value* 0,340. Hasil penelitian ini menandakan bahwa protein pili *K. pneumoniae* dengan berat molekul 65,5 kDa bersifat imunogenik sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut sebagai kandidat vaksin *Klebsiella pneumoniae*.

PRAKATA

Segala puji dan syukur bagi Tuhan Yang Maha Esa , atar berkat dan anugerah-Nya sehingga peneliti dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Analisis Perubahan Kadar IgG Serum Pascainjeksi Protein Pili 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae* Mencit Galur BALB/C: Studi Eksperimental Vaksin Pneumonia”. Skripsi ini disusun guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat menyelesaikan Pendidikan Strata Satu (S1) pada program studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan meraih gelar Sarjana Kedokteran.

Segala perjuangan hingga titik ini, saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah Tuhan Yesus Kristus yang senantiasa menyertai saya dan menjadi arah hidup terbesar dalam hidup saya;
2. dr. Ulfa Elfiah, M.Kes., Sp.BP-RE., Subsp.L.B.L (K). selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember beserta jajaran Wakil Dekan sekalian;
3. dr. Dini Agusina, M.Biomed. selaku dosen pembimbing utama serta ketua Kelompok Riset Infeksi Pneumonia (KeRis Si-Nia) dan dr. Erfan Efendi, Sp.An. selaku dosen pembimbing anggota yang senantiasa membimbing, meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran;
4. Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes., Sp.Par.K. dan dr. Rosita Dewi, M.Biotek. selaku dosen penguji yang telah membimbing, memberikan kritik dan saran yang membangun selama proses pengerjaan skripsi;
5. Dr. dr. Dina Helianti, M.Kes. selaku dosen pembimbing akademik yang selalu memberikan arahan dan semangat selama saya menempuh studi saya di Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
6. Seluruh staf pengajar dan karyawan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas bimbingan dan bantuannya selama saya menjadi mahasiswa;
7. Bapak Laurensius Lutianto, yang tiada hentinya memberikan arahan, motivasi dan semangat untuk meraih cita-cita;
8. Ibu Veronika Sunaiya Dwi Martalia, yang senantiasa memberikan perhatian dan doa disetiap langkah saya;

9. Adik Theresia Faustina Lutianto, menjadi sandaran saya saat lelah hingga saya dapat menyelesaikan tanggungjawab saya;
10. Anggota Tim KeRis Si-Nia tahun 2024, dr. Dini Agustina, M.Biomed., Muhammad Farhan Hibatulloh, Shafrizal Aufal Ikhsani, Virly Kania Mitanda yang saling membantu dan memberikan bantuan selama penelitian dan pengerjaan skripsi;
11. *Partner* saya, Yulius Ade Atma Rangga Kusuma yang selalu memberikan semangat, doa, dan pengharapan selama saya menjalani proses pendidikan;
12. Anggota “4 Provinsi” yang terdiri atas Antonia Venta Nathaniela Putri, Brilian Salma Novalinda, Garnisa Salsa Finar, Rizty Aprilora Paramitha sahabat sejawat saya sejak menginjakkan kaki sebagai mahasiswa preklinik. Terima kasih atas dukungan dan doa yang selalu membersamai. Semoga kita semua dilancarkan hingga akhir;
13. Teman-teman saya selama berproses di Badan Pengurus Inti Unit Kegiatan Mahasiswa Kerohanian Katolik 2023 Imanuel Ataama, Johannes Sihombing, Paulina Serani yang selalu memberikan semangat hingga saya dapat menyelesaikan skripsi;
14. Keluarga besar Unit Kegiatan Mahasiswa Kerohanian Katolik, terima kasih atas seluruh semangat dan dukungan yang diberikan selama saya berproses;
15. Sejawat Angkatan 2021 “Atlas” yang merupakan keluarga pertama saya dalam menjalani proses pendidikan. Semoga kita semua selalu diberkati;
16. Seluruh pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, terima kasih atas dukungan dan kerjasamanya;
17. Untuk diri sendiri, terima kasih karena selalu berpikiran positif disaat keadaan tidak baik, selalu berusaha untuk menyelesaikan semua tanggungjawab yang ada, dan senantiasa mengendalikan diri dalam melewati segala rintangan. Hal ini merupakan pencapaian yang patut dibanggakan untuk diri sendiri.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis menerima segala bentuk kritik dan saran dari semua pihak untuk kesempurnaan skripsi. Akhir kata, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERSEMBAHAN.....	iv
MOTTO	v
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	vi
HALAMAN PERSETUJUAN	vii
ABSTRACT	viii
RINGKASAN	ix
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
1.4.1 Bagi Peneliti	3
1.4.2 Bagi Institusi.....	3
1.4.3 Bagi Masyarakat.....	4
BAB 2. TINJAUAN TEORI.....	5
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
2.1.1 Taksonomi dan Morfologi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
2.1.2 Faktor Virulensi.....	6
2.1.3 Patogenesis dan Gejala Klinis Infeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
2.1.4 Mekanisme Respons Imun terhadap Infeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	14
2.2 Immunoglobulin	15
2.2.1 Immunoglobulin A	16
2.2.2 Immunoglobulin D	16

2.2.3	Imunoglobulin E.....	16
2.2.4	Imunoglobulin M.....	17
2.2.5	Imunoglobulin G	17
2.3	Perkembangan Vaksin <i>Klebsiella pneumoniae</i>	19
2.3.1	Vaksin Sel Utuh <i>Klebsiella pneumoniae</i>	20
2.3.2	Vaksin Subunit <i>Klebsiella pneumoniae</i>	20
2.4	Rute Pemberian	22
2.5	Kerangka Teori	24
3.4	Kerangka Konseptual	27
2.6	Hipotesis Penelitian	28
BAB 3.	METODOLOGI PENELITIAN	29
3.1	Rancangan Penelitian	29
3.2	Lokasi dan Waktu Penelitian	30
3.3	Populasi dan Sampel/Subyek Penelitian	30
3.3.1	Populasi Penelitian	30
3.3.2	Sampel penelitian	31
3.3.3	Teknik Pengambilan Sampel.....	31
3.3.4	Besar Sampel Penelitian.....	31
3.4	Jenis dan Sumber Data	32
3.5	Variabel Penelitian	32
3.5.1	Variabel Bebas	32
3.5.2	Variabel Terikat.....	32
3.6	Definisi Operasional	33
3.7	Instrumen Penelitian	34
3.6.1	Alat.....	34
3.6.2	Bahan.....	34
3.7	Prosedur Penelitian	34
3.7.1	Uji Kelayakan Etik	34
3.7.2	Preparasi Protein Pili 65,5 kDa <i>Klebsiella pneumoniae</i>	34
3.7.3	Aklimatisasi Hewan Coba.....	35
3.7.4	Induksi Mencit dengan Protein Pili 65,5 kDa <i>Klebsiella pneumoniae</i>	35
3.7.5	Preparasi Sampel Serum Mencit Jantan Galur BALB/C.....	36
3.7.6	Uji ELISA.....	36
3.8	Analisis Data	37
3.9	Alur Penelitian	38
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	39
4.1	Hasil Penelitian	39
4.1.1	Kadar IgG.....	39
4.2	Uji Analisis Statistik	40
4.2.1	Uji Normalitas.....	40
4.2.2	Uji Homogenitas	41
4.2.3	Uji <i>One-Way</i> ANOVA.....	41
4.2.4	Uji <i>Post-Hoc</i>	41

4.3 Pembahasan.....	42
BAB 5. KESIMPULAN, KETERBATASAN, DAN SARAN.....	45
5.1 Kesimpulan.....	45
5.2 Keterbatasan Penelitian	45
5.3 Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN.....	58

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Variabel Penelitian.....	33
Tabel 4.1 Hasil Uji Normalitas.....	40
Tabel 4.2 Hasil Uji Homogenitas.....	41
Tabel 4.3 Hasil Uji <i>One-Way</i> ANOVA.....	41
Tabel 4.4 Hasil Uji <i>Post-Hoc</i>	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pada media MacConkey Agar.....	6
Gambar 2.2	Faktor Virulensi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
Gambar 2.3	Produksi Kapsul Polisakarida pada <i>Klebsiella pneumoniae</i>	8
Gambar 2.4	Struktur Lipopolisakarida.....	9
Gambar 2.5	Dua Tipe Pili pada <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
Gambar 2.6	Macam siderofor <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
Gambar 2.7	Skema Bentuk Molekul Immunoglobulin-G.....	17
Gambar 2.8	Tren Kadar Immunoglobulin-M dan Immunoglobulin-G	18
Gambar 2.9	Kerangka Teori.....	24
Gambar 2.10	Kerangka Konseptual.....	27
Gambar 3.1	Skema Penelitian.....	29
Gambar 3.2	Alur Penelitian.....	38
Gambar 4.1	Kurva Standar IgG.....	39
Gambar 4.2	Diagram Rata-Rata Konsentrasi IgG.....	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rumus Dosis Injeksi.....	58
Lampiran 2. Etik Penelitian.....	59
Lampiran 3. Hasil Analisis Data.....	60
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian.....	63

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri yang digolongkan kedalam famili Enterobacteriaceae. *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) digambarkan dengan morfologi khas berbentuk batang, berkapsul, dan non motil (Benson, 2014; Ashrust & Dawson, 2023). *Klebsiella pneumoniae* seringkali menyebabkan infeksi salah satunya infeksi pada saluran pernapasan. Infeksi pada saluran pernapasan yang disebabkan oleh bakteri *K. pneumoniae* salah satunya infeksi pneumonia (Abbas *et al.*, 2024). Menurut data Badan Pusat Statistik pada tahun 2022 angka kejadian infeksi pneumonia di Provinsi Jawa sebanyak 92.118 kasus pada anak-anak dengan umur dibawah lima tahun (Badan Pusat Statistik, 2022). Pada studi yang dilakukan oleh Aliberti *et al.*, (2021) ditemukan dari tiga penderita terdapat satu penderita dengan pneumonia yang tidak tertangani sehingga berujung kematian (Aliberti *et al.*, 2021). Selain itu, infeksi pneumonia yang disebabkan oleh *K. pneumoniae* menyumbang angka kematian yang signifikan pada infeksi pneumonia nosokomial. Ditemukan pada studi yang dilakukan oleh Juan, *et al* (2020) angka mortalitas 28 hari pada kasus infeksi pneumonia nosokomial atau *hospital-acquired pneumonia* (HAP) sebesar 36,9% dari 276 pasien (Juan *et al.*, 2020). Selain itu, *K. pneumoniae* ditemukan sering menjadi penyebab *ventilator-acquired pneumonia* (VAP) yang merupakan infeksi pneumonia didapat setelah pemasangan ventilator mekanik (Buch *et al.*, 2020). Studi yang dilakukan oleh Zillberberg *et al* di US, VAP menyumbang angka kasus terbanyak dalam proporsi kasus HAP sebanyak 47,9% dari 17.819 pasien diikuti dengan tingginya biaya rumah sakit yang dikeluarkan sebesar \$77,657 (Zilberberg *et al.*, 2021).

Angka mortalitas yang cukup signifikan pada infeksi *Klebsiella pneumoniae* tersebut disebabkan karena bakteri tersebut memiliki mekanisme resistensi antibiotik (El-Domany *et al.*, 2021). Mekanisme resistensi antibiotik tersebut disebabkan akibat *K. pneumoniae* memiliki enzim *Extended Spectrum Beta-Lactamase*. Enzim *Extended Spectrum Beta-Lactamase* (ESBL) memiliki

kemampuan untuk memecah cincin *beta-lactam* yang merupakan komponen penting antibiotik dalam melawan infeksi bakteri (Silago, 2021). Tercatat di Rumah Sakit dr. Soeradji Tirtonegoro, kasus resistensi antibiotik sebesar 52,98% dari 168 isolat *K. pneumoniae* yang ditemukan (Sinanjung *et al.*, 2020). Mekanisme resistensi yang dimiliki oleh *K. pneumoniae* menyebabkan tatalaksana yang dapat diberikan kepada pasien menjadi terbatas. Melihat urgensi tersebut dibutuhkan langkah yang tepat dengan pencegahan yaitu diberikan vaksin.

Vaksin *Klebsiella pneumoniae* yang sedang berkembang hingga saat ini diantaranya vaksin hidup yang dilemahkan, sel utuh yang dimatikan, vaksin berbasis polisakarida, lipopolisakarida, outer membrane vesicle, ribosom, protein, pili dan toksin (Assoni *et al.*, 2021). Vaksin dengan formulasi berbasis protein salah satunya protein pili merupakan kandidat efektif karena variabilitasnya yang rendah serta memiliki sifat virulensi berupa pembentukan biofilm dan adhesi yang kuat pada permukaan sel inang sehingga meningkatkan potensi untuk menghasilkan respons imun protektif (Assoni *et al.*, 2021). Ketika vaksin protein pili *Klebsiella pneumoniae* masuk ke dalam tubuh, segera akan mengaktifasi sistem imun yaitu sistem imun adaptif dan sistem imun bawaan (Ferrer-Gonzales *et al.*, 2021). Immunoglobulin atau antibodi merupakan salah satu bagian dari sistem imun adaptif terutama humoral. Immunoglobulin salah satunya IgG memiliki kelebihan dapat mengingat antigen spesifik serta bertahan lebih lama sampai dengan 6 bulan *post-antigen exposure* (Bayart *et al.*, 2021).

Penelitian sebelumnya telah menemukan protein pili yang bersifat antigenik dan imunogenik. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan protein pili dengan berat molekul 12,8 kDa bersifat imunogenik. Hal ini mendukung bahwa injeksi protein pili dapat menginduksi pembentukan respons imun yang protektif (Agustina, 2017). Vaksin berbasis protein pili *K. pneumoniae* dengan berat molekul 65,5 kDa belum terbukti memiliki sifat imunogenik, tapi sudah dibuktikan bersifat antigenik (Agustina, 2022). Sebuah protein memenuhi syarat sebagai antigen vaksin apabila dapat menstimulasi pembentukan respons imun protektif salah satunya antibodi IgG. Oleh karena itu, protein pili 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae*

perlu diketahui imunogenitasnya untuk dikembangkan sebagai kandidat vaksin berdasarkan uraian diatas.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, rumusan masalah penelitian ini adalah apakah terdapat perubahan kadar IgG serum mencit galur BALB/C pascainjeksi protein pili dengan berat molekul 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini untuk menganalisis perubahan kadar IgG pada serum mencit galur BALB/C pascainjeksi protein pili dengan berat molekul 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae*.

1.3.2 Tujuan Khusus

Dari latar belakang di atas, tujuan khusus penelitian sebagai berikut:

- a. Mengetahui kadar IgG serum mencit galur BALB/C pascainjeksi protein pili *Klebsiella pneumoniae* dengan berat molekul 65,5 kDa.
- b. Melihat perbedaan kadar IgG serum antar kelompok mencit galur BALB/C.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Peneliti

Manfaat bagi peneliti sebagai tambahan informasi dan pengetahuan terkait peningkatan kadar IgG pada serum mencit galur BALB/C pascainjeksi protein pili *Klebsiella pneumoniae* dengan berat molekul 65,5 kDa.

1.4.2 Bagi Institusi

Manfaat bagi institusi sebagai informasi terkait manfaat protein pili dengan berat molekul 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae* sehingga dapat digunakan sebagai referensi pendukung mengenai pengembangan vaksin *Klebsiella pneumoniae*.

1.4.3 Bagi Masyarakat

Manfaat bagi masyarakat adalah sebagai tambahan wawasan mengenai perkembangan vaksin dan penyakit infeksi *Klebsiella pneumoniae*.

BAB 2. TINJAUAN TEORI

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

2.1.1 Taksonomi dan Morfologi *Klebsiella pneumoniae*

Carl Friedlander mendefinisikan *Klebsiella pneumoniae* dengan bakteri basil berkapsul setelah mengisolasi bakteri tersebut dari paru-paru seseorang yang telah meninggal akibat infeksi pneumonia. *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) termasuk dalam famili Enterobacteriaceae yang digolongkan ke dalam bakteri Gram negatif, berkapsul, dan non-motil (Ashrust & Dawson, 2023). Berikut taksonomi *Klebsiella pneumoniae* berdasarkan NCBI:

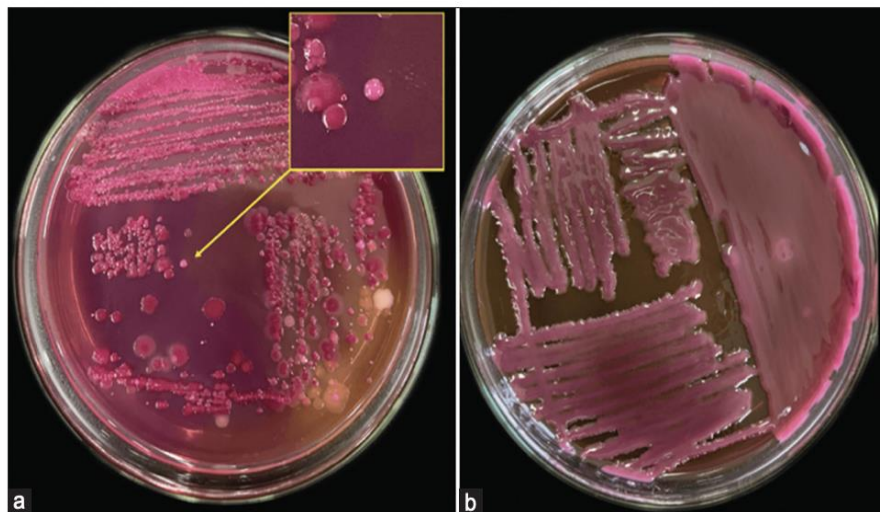
Kingdom	: Bacteriae
Fillum	: Pseudomonadota
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacterales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Klebsiella</i>
Spesies	: <i>Klebsiella pneumoniae</i>

Istilah yang digunakan untuk menamai organisme yang tetap mempertahankan warna primer disebut organisme Gram positif. Bakteri Gram positif dibawah mikroskop akan tampak berwarna ungu atau ungu kecoklatan. Bakteri Gram negatif akan tampak berwarna merah dibawah mikroskop dikarenakan tidak menyerap warna primer. Teknik Pewarnaan Gram tersebut ditemukan pertama kali oleh seorang ahli bakteriologi asal Denmark bernama Hans Christiam Gram yang diperkenalkan pada tahun 1882 dengan tujuan mengetahui organisme penyebab penyakit pneumonia (Ashrust & Dawson, 2023).

Teknik tersebut merupakan teknik dengan menggunakan pewarnaan kristal violet seawai pewarnaan awal yang kemudian dilakukan proses fiksasi pewarna menggunakan iodium dengan tujuan membentuk ikatan kompleks kristal violet-iodin yang mencegah zat warna mudah hilang. Langkah berikutnya akan diberikan penghilang zat warna yang mengandung pelarut etanol dan aseton. Selanjutnya,

pewarnaan gram dilakukan dengan pewarna fuschin basa yang akan memberikan warna merah. Warna merah yang tampak tersebut disebut sebagai bakteri *Gram negatif* (Tripathi & Sapra, 2023).

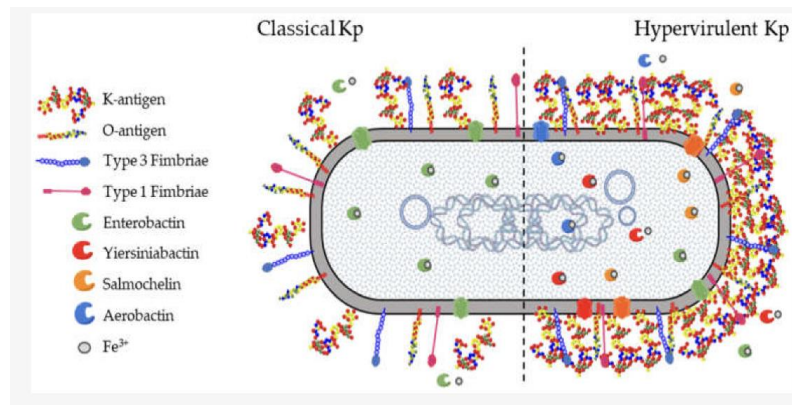
MacConkey agar merupakan media *selective* yang hanya bisa menumbuhkan bakteri gram negatif. *MacConkey agar* mengandung indikator pH yang akan berubah menjadi warna pink apabila dalam kondisi asam. *Lactose-fermenting-Gram-negative* akan membentuk koloni berwarna pink (Gambar 2.1) (Riwu *et al.*, 2022). Sedangkan, *non-lactose fermenters* akan membentuk koloni berwarna “*off-white opaque*”(Jung & Hoilat, 2022).



Gambar 2.1 *Klebsiella pneumoniae* pada media *MacConkey Agar* (Riwu *et al.*, 2022)

2.1.2 Faktor Virulensi

Faktor virulensi merupakan kemampuan yang dimiliki oleh sebuah organisme untuk menginfeksi tubuh inang sehingga menyebabkan penyakit. Faktor virulensi adalah molekul yang ada pada bakteri untuk mengkolonisasi tubuh inang dalam tingkat seluler (Sharma *et al.*, 2016). Hingga saat ini terdapat empat faktor virulensi yang telah ditemukan, yaitu: kapsul polisakarida, lipopolisakarida, fimbriae, dan siderofor (Gambar 2.2) (Arato *et al.*, 2021).

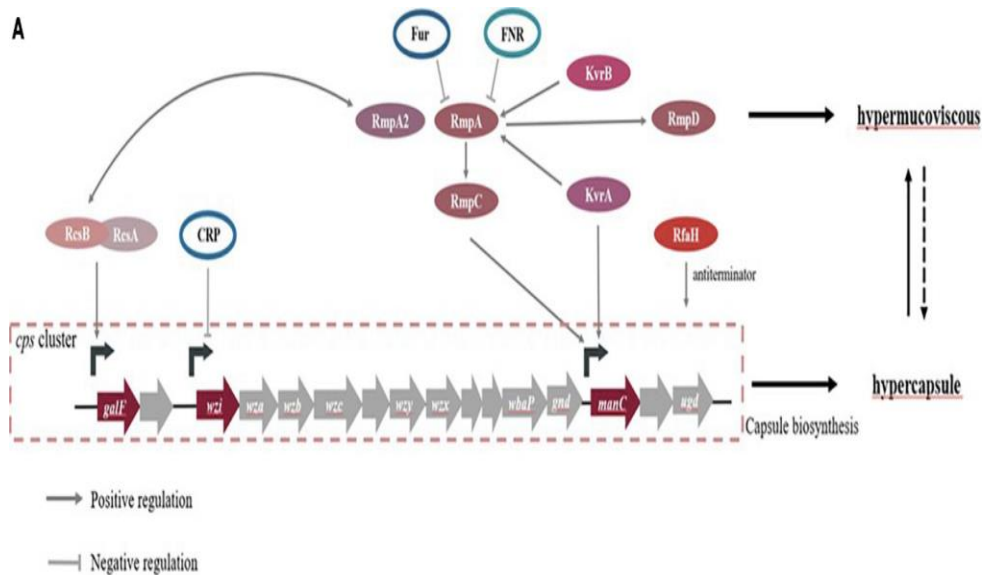


Gambar 2.2 Faktor Virulensi *Klebsiella Pneumoniae* (Arato *et al.*, 2021)

Faktor virulensi tersebut memiliki tugas masing-masing dalam menginfeksi tubuh inang. Kapsul merupakan matriks polisakarida ekstraseluler yang membungkus bakteri dan diproduksi secara berlebihan. Komposisi dan struktur kapsul garis *Klebsiella pneumoniae* memiliki fungsi menutupi sel bakteri dari sistem imun fagositosis (Zhu *et al.*, 2021). Lipopolisakarida berkontribusi pada bakteri untuk melindungi bakteri dari *complement-mediated killing* sedangkan pili tipe 1 dan pili tipe 3 berfungsi sebagai adhesi (Soulas *et al.*, 2000; Riwu *et al.*, 2022). Siderofor seperti *aerobactin*, *enterobactin*, *salmochelin*, dan *yersiniabactin* yang dapat mengikat zat besi ekstraseluler ke dalam bakteri (Arato *et al.*, 2021). Empat faktor virulensi yang berperan penting dalam bakteri *Klebsiella pneumoniae*, diantaranya:

a. Kapsul Polisakarida

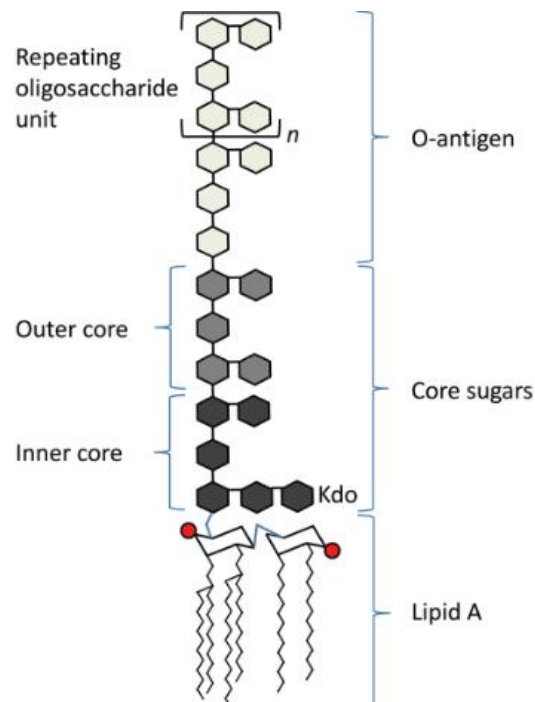
Kapsul polisakarida/*capsul polyssacharide* (CPS) merupakan lapisan terluar yang terdapat pada bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Hingga saat ini terdapat 77 serotipe kapsul yang diidentifikasi pada bakteri *K. pneumoniae* (Follador *et al.*, 2016; Patro & Rathinavelan, 2019). Faktor virulensi kapsul polisakarida menutupi sel bakteri *K. pneumoniae* terhadap respons sistem imun inang salah satunya fagositosis (Zhu *et al.*, 2021). Kapsul polisakarida diproduksi oleh jalur polimerisasi dependen *Wzx/Wzy* yang dikode oleh gugus gen *cps*. Kelompok gen yang mengkode kapsul terletak pada kromosom dan/atau plasmid. *zy-K1*, *wzx*, *wzc*, *wza*, *wzb*, *wzi*, *gnd*, *wca*, *cps A*, *cps B*, *cps G*, dan *gal F* mengkode bagian eksopolisakarida kapsul dan berlokasi pada kromosom. Sementara gen *rmp A*, *rmp B*, dan *rmp A2* terlibat dalam biosintesis kapsul berlokasi pada kromosom dan plasmid. Gen *kvr A*, *kvr B*, *rca A*, *rca B*, *c-rmp A*, dan *c-rmp A2* berkontribusi pada biosintesis kapsul dan terletak pada kromosom (Gambar 2.3) (Zhu *et al.*, 2021).



Gambar 2.3 Produksi Kapsul Polisakarida pada *Klebsiella pneumoniae* (Zhu *et al.*, 2021)

b. Lipopolisakarida

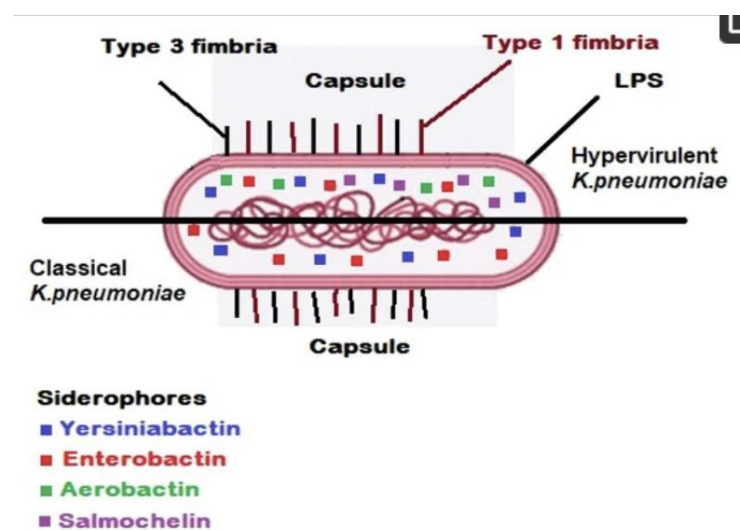
Lipopolisakarida/*lipopolysaccharide* (LPS) merupakan struktur ekstraselular polisakarida bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang terdiri atas tiga komponen (Gambar 2.4) (Maeshima & Fernandez, 2013). Komponen lipid A merupakan bagian yang mengikat seluruh struktur dalam membran bakteri, inti oligosakarida, dan rantai samping terminal yang disebut antigen O. Komponen lipid A adalah gugus hidrofobik yang terlokalisasi di lapisan luar membran luar dan disintesis oleh serangkaian enzim yang dikodekan oleh gugus gen *lpx* (Opoku-temeng *et al.*, 2019; Karampatakis *et al.*, 2023). Struktur antigen O pada lipopolisakarida bekerja dengan melindungi patogen dari *complement-mediated killing* (Soulas *et al.*, 2000).



Gambar 2.4 Struktur Lipopolisakarida (Maeshima & Fernandez, 2013)

c. Pili/Fimbriae

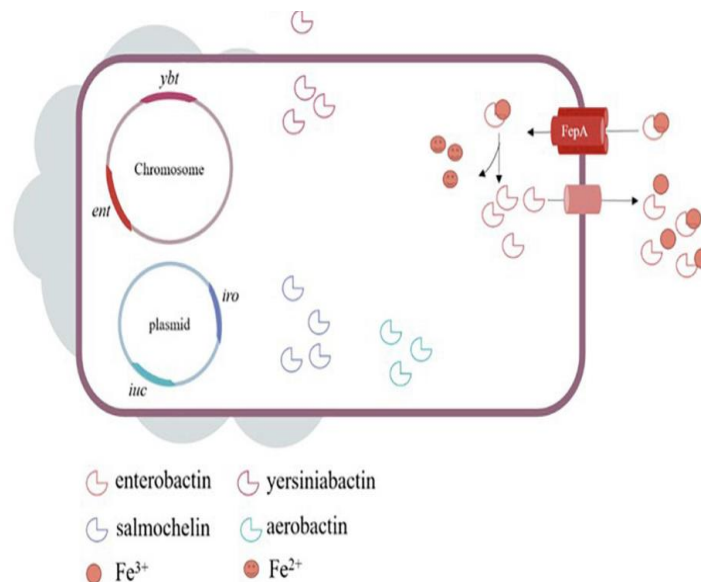
Pili atau *fimbriae* merupakan struktur yang mirip seperti rambut dan terletak pada permukaan bakteri. *Klebsiella pneumoniae* memiliki dua tipe pili, diantaranya: pili tipe 1 dan pili tipe 3 (Gambar 2.5) (Karampatakis *et al.*, 2023). Pili tipe 1 memiliki struktur tipis dan keras yang dikode oleh *fim* gen cluster dan tersusun atas delapan gen (*fimAICDFGHK*). Gen *fimK* merupakan gen yang meregulasi pili tipe 1 dan gen *fimH* akan mengkode subunit adhesi (Clegg & Murphy, 2016; Rosen *et al.*, 2016). Pili tipe 3 memiliki struktur lebih lunak dibandingkan dengan pili tipe 1. Pili tipe 3 dikode oleh operon *mrkABCDF/mrkABCDEFGH* yang diregulasi oleh aktivitas *CRP-cAMP signalling pathway* (Clegg & Murphy, 2016; Rosen *et al.*, 2016; Panjaitan *et al.*, 2019). Gen *mrkD* akan mengatur adhesi pili tipe 3 pada sel inang melalui kromosom atau plasmid (Riwu *et al.*, 2022). Struktur pili pada *Klebsiella pneumoniae* memiliki kemampuan untuk mempertahankan dan memperkuat proses adhesi (Gomez-simmonds & Uhlemann, 2017).



Gambar 2.5 Dua Tipe Pili pada *Klebsiella pneumoniae* (Karampatakis *et al.*, 2023)

d. Siderofor

Klebsiella pneumoniae membutuhkan zat besi untuk replikasinya. Siderofor (pembawa zat besi) adalah komposit pada mikroorganisme yang berfungsi untuk mengangkut zat besi pada membran sel. *Enterobactin*, *yersiniabactin*, *salmochelin*, dan *aerobactin* merupakan jenis siderofor yang diekspresikan oleh *K. pneumoniae* (Gambar 2.6) (Zhu *et al.*, 2021). *Enterobactin* disintesis oleh *gen cluster ent*, *yersiniabactin* oleh *gen cluster ybt*, *salmochelin* oleh *gen cluster iro*, dan *aerobactin* oleh *gen cluster inc*. *Gen cluster ent* dan *ybt* terletak pada kromosom sedangkan *gen cluster iro* dan *inc* terletak pada plasmid. Siderofor tersebut mendapatkan zat besi dari protein khelasi besi inang untuk bertahan hidup dan reduplikasi selama infeksi. Siderofor akan dikeluarkan untuk menarik Fe pada tubuh inang. Siderofor yang sudah berikatan dengan Fe akan kembali ke dalam sel bakteri melalui reseptor yang dikode oleh *gen FepA*. Kemudian Fe akan digunakan oleh bakteri untuk bertahan hidup, membangun infeksi pada sel inang. Produksi lebih dari satu siderofor oleh *Klebsiella pneumoniae* merupakan cara untuk mengoptimalkan keberhasilan kolonisasi dan/atau menghindari netralisasi satu siderofor oleh inang (Parrott *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021; Karampatakis *et al.*, 2023).



Gambar 2.6 Macam siderofor *Klebsiella pneumoniae* (Zhu *et al.*, 2021)

2.1.3 Patogenesis dan Gejala Klinis Infeksi *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae merupakan patogen yang sering dikaitkan dengan infeksi pneumonia dan sering menjadi penyebab infeksi nosokomial serta tidak jarang dapat menyebabkan kondisi sepsis yang berujung kematian. Infeksi pneumonia merupakan penyakit infeksi yang menyerang parenkim paru-paru. Infeksi pneumonia bisa disebabkan oleh berbagai infeksi patogen seperti bakteri, virus, dan fungi (Vardhmaan *et al.*, 2023). *Klebsiella pneumoniae* dapat ditemukan baik di lingkungan komunitas maupun di lingkungan rumah sakit seperti pada peralatan medis. Bakteri patogen ini dapat menginfeksi melalui dua jalur utama yaitu sistem pernapasan dan sistem pencernaan. Patogen *K. pneumoniae* yang masuk ke saluran pernapasan akan menginvasi faring kemudian menyebar hingga saluran pernapasan bawah melalui mikroaspirasi (Regunath & Oba, 2024). Setelah sampai di saluran pernapasan bagian bawah, *K. pneumoniae* akan menginvasi dan menginduksi sistem pertahanan paru-paru sehingga terjadi pneumonia yang diakibatkan tingginya jumlah patogen. Patogen yang menumpuk di saluran pernapasan bawah menyebabkan timbulnya eksudat sehingga mengganggu proses fisiologis pertukaran oksigen dan karbondioksida pada alveoli (Sinanjung *et al.*, 2020; Ashrust & Dawson, 2023; Vardhmaan *et al.*, 2023).

Patogen yang menumpuk menyebabkan teraktivasinya respons imun bawaan awal yang melibatkan infiltrasi neutrofil dan makrofag alveolar. Makrofag alveolar memicu pelepasan sitokin inflamasi sebagai respons terhadap reaksi inflamasi. Interleukin-1 (IL-1) dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF) yang dikaitkan dengan munculnya manifestasi klinis berupa demam. Interleukin-8 (IL-8) yang mendorong kemotaksis dan pematangan neutrofil sehingga menyebabkan kondisi leukositosis. Disisi lain, Interleukin-9 (IL-9) dan Interleukin-13 (IL-13) mendorong produksi musin untuk membentuk sekresi purulen. Sitokin proinflamasi juga bertanggungjawab atas kebocoran membran alveolar-kapiler sehingga dapat mengakibatkan penurunan pertukaran gas dan bermanifestasi sebagai dispnea yang progresif (Sattar & Sharma, 2023). Manifestasi klinis pneumonia yang lain meliputi tanda-tanda sistemik seperti menggigil, malaise, kehilangan nafsu makan, dan mialgia. Temuan umum pada pemeriksaan fisik dapat muncul seperti takipnea,

takikardia, suara nafas menurun, egofoni, fremitus taktil, nyeri dada pleuritik, menggigil dan berkeringat. Manifestasi klinis pada paru-paru dapat berupa batuk dengan atau tanpa produksi sputum (Vardhmaan *et al.*, 2023). Dahak yang disebabkan oleh *K. pneumoniae* adalah “*Currant Jelly*” yaitu sputum yang dihasilkan dari inflamasi dan nekrosis di paru-paru dengan bentukan kental bercampur darah yang beku seperti *jelly* (Ashrust & Dawson, 2023).

Pneumonia dibagi menjadi menjadi 2 klasifikasi, diantaranya: *community-acquired pneumonia (CAP)* dan *nosocomial pneumonia*. *Nosocomial pneumonia/hospital-acquired pneumonia (HAP)* diantaranya termasuk *ventilator acquired pneumonia (VAP)* (Pahal *et al.*, 2023). *Community-acquired pneumonia* diuraikan sebagai pneumonia yang didapat diluar rumah sakit atau di lingkungan komunitas (Metlay *et al.*, 2019). Sedangkan, *hospital-acquired pneumonia* dan *ventilator-acquired pneumonia* digolongkan sebagai pneumonia nosokomial. *Hospital acquired pneumonia* didefinisikan sebagai pneumonia yang didapat di lingkungan rumah sakit yang terjadi setelah setidaknya 48 jam setelah rawat inap sedangkan VAP didefinisikan dengan pneumonia yang didapat setelah 48 jam pemasangan ventilator mekanik (Kalil *et al.*, 2016). Studi yang dilakukan oleh Juan *et al.*, (2020) pada tahun 2014 hingga 2016 tingkat mortalitas 28 hari dari CAP dan pneumonia nosokomial yang disebabkan oleh *K. pneumoniae* masing-masing adalah 27,9% dan 36,9% (Juan *et al.*, 2020). Di Amerika Serikat, 20% infeksi *K.pneumoniae* yang didapat dari komunitas berujung harus dilakukan perawatan di rumah sakit dengan angka kematian mencapai 12% hingga 40% (Sattar & Sharma, 2023).

Selain sering menjadi penyebab wabah nosokomial, *Klebsiella pneumoniae* juga sering menyebabkan kondisi *multidrug-resistance*. Hal ini diakibatkan oleh adanya enzim *extended spectrum beta-lactamase (ESBL)* yang membuat bakteri tersebut kebal terhadap antibiotik (Sinanjung *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2019). ESBL merupakan enzim yang menghidrolisis penisilin, sefalosporin, dan aztreonam. (Tamma *et al.*, 2021). *ESBL-producing K.pneumoniae* sering didapatkan di ICU dan *respiratory specimen*. Kasus didapatkannya isolat *Multidrug-resistance Klebsiella pneumoniae (MDR-KP)* di Rumah Sakit dr. Soeradji Tirtonegoro

sebanyak 52,98% (Sinanjung *et al.*, 2020). Sebanyak 72% kematian di beberapa rumah sakit diakibatkan oleh MDR-KP karena penggunaan antibiotik yang tidak efisien dan sifat bakteri yang mudah resisten terhadap antibiotik. Munculnya *Klebsiella pneumoniae* variasi *multi-drug resistance* menjadi tantangan bagi masyarakat yang menyebabkan terbatasnya pilihan pengobatan (Wang *et al.*, 2019; Poerio *et al.*, 2022).

2.1.4 Mekanisme Respon Imun terhadap Infeksi *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri Gram negatif yang seringkali mengancam kesehatan, terutama infeksi nosokomial (Opoku-Temeng *et al.*, 2022). *Klebsiella pneumoniae* yang masuk dalam tubuh inang akan menggunakan faktor virulensi untuk kelangsungan hidup dan patogenitasnya. Salah satu faktor virulensi penting adalah pili yang berfungsi melekatkan bakteri ke sel inang dan membentuk *biofilm* (Abbas *et al.*, 2024; Bai & Guo, 2024). Imunitas inang melawan patogen melalui dua sistem yaitu sistem imun bawaan dan mekanisme imun adaptif (Liang *et al.*, 2022). Sistem imun bawaan merupakan lini pertama pertahanan yang membantu inang untuk melawan patogen asing. Sistem imun bawaan memberikan respons langsung namun tidak spesifik (Vaillant *et al.*, 2024). Selain itu, formasi imunitas ini juga tidak bertahan lama. Sistem imun bawaan melawan infeksi *K. pneumoniae* dengan melalui mekanisme komplemen, makrofag, dan neutrofil (Gonzalez-Ferrer *et al.*, 2021). Sistem komplemen berupa sekelompok protein yang ketika diaktifkan maka akan membunuh patogen atau meningkatkan fagositosis melalui proses opsonisasi. Mekanisme fagosit termasuk didalamnya makrofag dan neutrofil melawan patogen asing dengan cara menelan dan mencerna patogen melalui proses fagositosis (Vaillant *et al.*, 2024).

Sistem imun bawaan dan sistem imun adaptif sama-sama penting dalam melawan invasi patogen. Respons imun adaptif merupakan respons spesifik dan memiliki fitur menonjol berupa produksi memori imunologis yang diaktifkan lebih cepat pada infeksi ulang (Bonilla & Oettgen, 2010; Natalia *et al.*, 2022; Vaillant *et al.*, 2024). Sistem imun adaptif mencakup respons imun seluler yang diperantarai oleh sel T dan respons imun humoral yang diperantarai sel B. Respons imun adaptif

dimulai ketika *antigen-presenting cell* (APC) seperti sel dendritik (DC) dan makrofag. *Antigen presenting cell* mempresentasikan antigen pada permukaannya melalui *major histocompatibility complex* (MHC) kemudian MHC II akan menyajikan antigen kepada sel *T-helper*. Nantinya, sel *T-helper* akan membantu mengaktifkan sinyal yang merangsang aktivasi dan diferensiasi sel B. Sel B yang diaktifkan akan menjadi sel plasma yang akan produksi antibodi (Bonilla & Oettgen, 2010; Laing, 2019). Antibodi akan melakukan beberapa mekanisme untuk mengeliminasi bakteri seperti *complement-associated immunolysis*, *toxin neutralizing*, dan *immunophagocytosis via opsonizing*. *Complement-associated immunolysis* akan membunuh bakteri dengan melisiskan bakteri sedangkan *Toxin neutralizing* akan menetralkan toxin yang dihasilkan oleh bakteri. Di sisi lain, *immunophagocytosis* bekerja dengan memanggil neutrofil dan makrofag untuk melakukan tindakan fagositosis setelah IgG menempel pada bakteri (Murphy & Weaver, 2016; Laing, 2019 dalam Sawa *et al.*, 2019).

2.2 Imunoglobulin

Imunoglobulin atau antibodi merupakan glikoprotein yang diproduksi oleh sel plasma yang berpartisipasi dalam sistem imun humoral terhadap infeksi. Sel B diinstruksikan oleh imunogen tertentu misalnya, protein bakteri, untuk berdiferensiasi menjadi sel plasma. Sel plasma merupakan sel pembuat protein yang berpartisipasi dalam respons imun melawan terhadap patogen (Vaillant *et al.*, 2023). Imunoglobulin harus berinteraksi dengan reseptor untuk memenuhi berbagai fungsi biologis yang terutama diekspresikan pada sel mononuklear, sel mast, neutrofil, *natural killer cell* (*NK cell*), dan eosinofil. Imunoglobulin menginduksi beberapa mekanisme imunitas diantaranya fagositosis bakteri melalui tindakan opsonisasi; degranulasi sel; *killing of tumour*; dan aktivasi *antigen-presenting cells* seperti makrofag dan sel dendritik, yang mempresentasikan antigen ke limfosit T untuk menghasilkan respons imun seluler dan humoral (Engels & Wienands, 2018 dalam Vaillant *et al.*, 2023). Hingga saat ini terdapat 5 *isotype* imunoglobulin yang teridentifikasi, diantaranya Imunoglobulin A, Imunoglobulin D, Imunoglobulin E, Imunoglobulin M dan Imunoglobulin G. Keseluruhan, struktur dasar antibodi

memiliki dua fragmen, satu adalah *fragment crystallizable* (Fc), dan kedua adalah *fragment antigen-binding* (Fab). Dua fragmen Fab adalah dihubungkan ke Fc melalui *hinge region* (Schroeder & Cavacini, 2010; Vaillant *et al.*, 2023).

2.2.1 Imunoglobulin A

Imunoglobulin A (IgA) muncul dalam 2 struktur molekul berbeda: struktur monomer dan struktur dimer. IgA serum memiliki berat molekul 160 Kd dan konsentrasi serum 3 mg/mL. IgA sekretori memiliki berat molekul 385 Kd dan konsentrasi serum rata-rata 0,05 mg/mL (Vaillant *et al.*, 2023). IgA serum memiliki formasi monomerik dan berada di sirkulasi darah sedangkan IgA sekretori disekresikan pada mukosa. IgA sekretori merupakan kelas antibodi yang dominan disekresi mukosa. IgA sekretori yang disekresikan pada mukosa bertindak sebagai lini pertama dalam sistem pertahanan (Li *et al.*, 2020; Pietrzak *et al.*, 2019.; Woof *et al.*, 2004). Hal ini menjadikan IgA memainkan peran penting dalam menjaga permukaan mukosa dalam mengatasi perlawanan melawan mikroorganisme infeksius (Pereira & Woof, 2019).

2.2.2 Imunoglobulin D

Imunoglobulin D (IgD) ditemukan pada tahun 1965 dengan konsentrasi pada serum lebih rendah dari IgG, IgA, dan IgM namun lebih tinggi dari IgE. IgD merupakan salah satu kelas antibodi. Penelitian terbaru menunjukkan peran penting IgD dalam mengakumulasi autoreaktif sel B sambil mempertahankan respons terhadap antigen asing (Gutzeit, 2018). Beberapa sel B dapat menghasilkan sel plasma yang dapat ensekresi IgD sebagai respons terhadap antigen. IgD yang disekresi berinteraksi dengan basofil yang nantinya akan meningkatkan respons sel *T-helper 2*. Hingga saat ini, riset terkait peran spesifik IgD masih terus berkembang (Shan *et al.*, 2018).

2.2.3 Imunoglobulin E

Imunoglobulin E (IgE) merupakan mekanisme pertahanan penting terutama dalam melawan infeksi basofil seperti *Strongyloides stercoralis*, *Trichinella spiralis*, *Ascaris lumbricoides*, and hookworms *Necator americanus* and

Ancylostoma duodenale (Vaillant *et al.*, 2023). IgE memiliki struktur monomer dan memiliki berat molekul 188 Kd dan konsentrasi serum 0,00005 mg/mL. IgE melindungi dalam melawan infeksi parasite karena memiliki reseptor afinitas tinggi pada sel mast dan basofil. Selain itu, igE juga memediasi reaksi alergi (Mukai *et al.*, 2016; Schwartz *et al.*, 2016). IgE memiliki peran dalam memediasi reaksi alergi melalui pengikatan reseptor IgE-Fc (Sutton *et al.*, 2019).

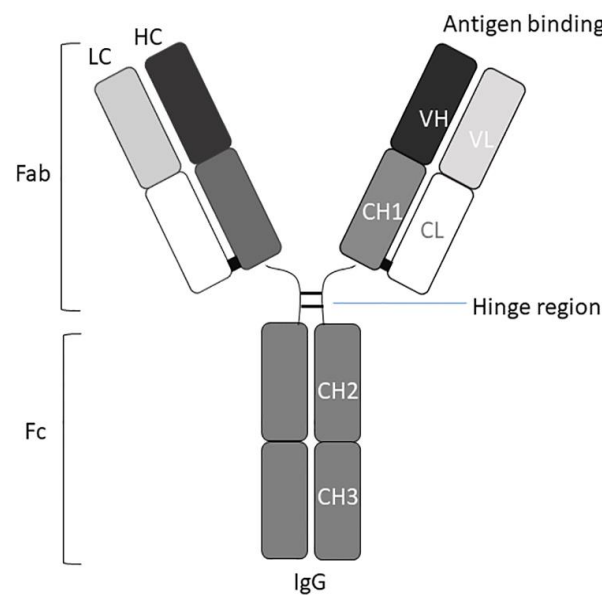
2.2.4 Imunoglobulin M

Imunoglobulin M (IgM) merupakan antibodi pertama yang diproduksi sebagai lawan atas respons terhadap infeksi. Imunoglobulin M merupakan kelas antibodi yang juga memainkan peran penting dalam imunitas bawaan dan adaptif (Pleass *et al.*, 2015). IgM memiliki berat molekul 970 Kd dan rata-rata serum konsentrasi sebesar 1,5 mg/ml (Vasilev *et al.*, 2016 dalam Vaillant *et al.*, 2023). Antibodi imunoglobulin M (IgM) adalah makroimunoglobulin pentamerik atau heksamerik dan telah sangat terkonservasi selama evolusi. Multimer IgM memiliki 10 (pentamer) atau 12 (heksamer). Struktur igM memiliki fungsi sebagai *carrier* untuk proses *apoptosis inhibitor makrofag* (Gong *et al.*, 2020). Meskipun merupakan lini pertama sebagai respons melawan infeksi, afinitas pengikatan antigen antibodi IgM biasanya lebih rendah daripada IgG (Keyt *et al.*, 2020; Vaillant *et al.*, 2023).

2.2.5 Imunoglobulin G

Imunoglobulin G merupakan salah satu antibodi yang diproduksi oleh sel plasma. Sel plasma merupakan sel yang memproduksi protein untuk berpartisipasi dalam respons sistem imun humoral terhadap bakteri, virus, jamur, parasit, dll. IgG adalah monomer dengan berat molekul 146 Kd dan memiliki nilai konsentrasi serum sebesar 9,0 mg/mL (Vaillant *et al.*, 2023). Sehingga, IgG merupakan *isotype* imunoglobulin yang paling melimpah dalam serum yang terlibat dalam sistem imun humoral (Taeye *et al.*, 2019). IgG dikatakan divalen karena memiliki dua tempat pengikatan antigen identik 2 rantai L dan 2 rantai H yang dihubungkan oleh ikatan disulfida. (Vaillant *et al.*, 2023). Struktur skema molekul imunoglobulin G (IgG) terdiri atas dua rantai yang dihubungkan oleh jembatan disulfida. *Light chain*

bersama dengan *heavy chain* dan CH1 membentuk bagian *Fragment antigen-binding* (Fab) dan CH2 dan CH3 membentuk bagian *Fragment crystallizable region* (Fc) (Gambar 2.7) (Maibom-thomsen *et al.*, 2019). Antibodi IgG memiliki dua fungsi sesuai dengan strukturnya. Fab memiliki fungsi untuk mendeteksi antigen sedangkan Fc merupakan bagian yang berfungsi sebagai efektor untuk aktivasi sistem imun dengan bereaksi bersama *Fcγ* reseptor pada *B-cells* bersama dengan sistem imun lainnya (Galeotti *et al.*, 2017; Taeye *et al.*, 2019)

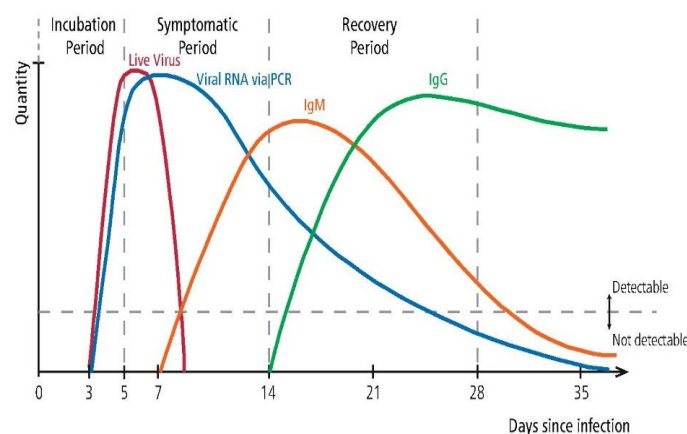


Gambar 2.7 Skema Bentuk Molekul Imunoglobulin-G (Maibom-thomsen *et al.*, 2019)

Imunoglobulin-G memiliki kadar nilai normal rata-rata pada orang dewasa sehat sebesar 994 mg/dL yang diukur menggunakan nephelometry (Agarwal & Cunningham-Rundles, 2007). IgG sebagian besar disintesis dalam respons imun sekunder terhadap patogen. IgG dapat mengaktifkan jalur yang sangat protektif (Palmeira *et al.*, 2012). Penurunan kadar igG pada orang dewasa bisa diklasifikasikan menjadi 3, yaitu: *mild-moderate* (300-600 mg/dL), signifikan (100-299 mg/dL) dan penurunan berat (<100 mg/dL). Kondisi kadar total imunoglobulin berada di angka 400-600 mg/dL atau kadar IgG berada di angka 200-400 mg/dL memungkinkan orang tersebut memiliki antibodi yang adekuat. Penurunan produksi IgG didefinisikan apabila terdapat penurunan 1 atau lebih subkelas dari IgG. Penurunan kadar IgG1 dan IgG2 seringkali menyebabkan penurunan kadar IgG serum karena subkelas tersebut merupakan komponen mayor yang terdapat

pada IgG. Adapun kondisi lain yang dapat menyebabkan kadar IgG menurun, salah satunya penggunaan beberapa obat glukokortikoid (Agarwal & Cunningham-Rundles, 2007; Sorensen & Moore, 2000).

Imunoglobulin-M merupakan *antibody primer* yang diproduksi selama paparan antigen awal (Vaillant *et al.*, 2023). IgM diproduksi oleh sel plasma sebagai respons imun humoral terhadap patogen. Aktivasi sel B sebagai respons terhadap ikatan antigen dengan *B-cell receptor* (BCR). Selanjutnya, sel B mengalami peralihan isotype yang selanjutnya secara bertahap IgG+ B cells akan menggantikan IgM+ B cells. IgG akan muncul dan menggantikan IgM dimulai pada hari ke-14 sampai dengan hari ke-21 *post-antigen exposure*. Proses peralihan tersebut dikenal dengan “*class switching*” atau “*isotype swicthing*” (Gambar 2.8) (Sathe & Cusick, 2022; Denning *et al.*, 2020).



Gambar 2.8 Tren Kadar Imunoglobulin M dan Imunoglobulin G Saat Infeksi (Denning *et al.*, 2020)

2.3 Perkembangan Vaksin *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae merupakan patogen yang sering dikaitkan dengan pneumonia dan sering menjadi penyebab infeksi nosokomial dan tidak jarang dapat menyebabkan kondisi sepsis yang berujung kematian (Choi *et al.*, 2020). Oleh karena itu diperlukan penanganan strategis untuk mencegah infeksi *K. pneumoniae*. Penanganan yang baik sampai saat ini ialah formulasi vaksin.

2.3.1 Vaksin Sel Utuh *Klebsiella pneumoniae*

Vaksin sel utuh *K. pneumoniae* telah diteliti baik sendiri maupun kombinasi dengan enterobacteria lainnya. Formulasi vaksin ini meliputi bakteri yang dilemahkan, sel yang dimatikan, dan ekstrak sel (Assoni *et al.*, 2021).

2.3.2 Vaksin Subunit *Klebsiella pneumoniae*

a. Polisakarida kapsul

Polisakarida kapsul sebagai basis vaksin *K. pneumoniae* memiliki imunogenitas yang tinggi pada permukaan kapsul (Follador *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2012). Hingga saat ini terdapat 77 serotipe kapsul yang telah ditemukan dan diidentifikasi dalam bakteri *K. pneumoniae* (Follador *et al.*, 2016; Patro & Rathinavelan, 2019b). Meski variabilitas kapsulnya yang tinggi, saat ini komposisi polisakarida tidak lebih imunogenik dibandingkan vaksin berbasis protein. Vaksin ini hanya cukup protektif pada orang dewasa dan tidak efektif pada anak kecil (Ada & Isaacs, 2003; Paton & Trappetti, 2019).

b. Lipopolisakarida

Lipopolisakarida merupakan salah satu molekul yang imunogenik. Lipopolisakarida menyebar di permukaan dan lebih sedikit variasi dibandingkan dengan polisakarida (Assoni *et al.*, 2021). Hingga saat ini ditemukan 11 variasi antigen O pada *K. pneumoniae* (Patro & Rathinavelan, 2019a). *K. pneumoniae* melalui rute intramuskular dan intrauretra memiliki sifat protektif yang ditandai oleh penurunan kolonisasi bakteri pada ginjal. (Chathley *et al.*, 1996). Imunogenitasnya yang tinggi, beberapa studi menunjukkan beberapa resiko untuk kelompok dengan sistem imun yang lemah atau dengan kondisi penyakit tertentu (Opal *et al.*, 1999; Wassenaar & Zimmermann, 2018).

c. *Outer Membrane Vesicle*

Klebsiella pneumoniae merupakan satu dari banyak bakteri Gram negatif yang menghasilkan *outer membrane vesicle* (OMV). OMV merupakan faktor virulensi penting yang terdiri atas vesikel lipid yang mengandung LPS, lipid, dinding sel, asam nukleat dan protein, protein sitoplasma dan toksin. (Chathley *et al.*, 1996;

Lee *et al.*, 2012). *Outer membrane vesicle* pada *K. pneumoniae* mampu menginduksi peningkatan produksi IL-1B, IL-8, IL-6, dan TNFa (Martora *et al.*, 2019). Salah satu *feedback* imunogenitas OMV adalah sekresi OmpA dan OmpC dalam vesikel yang berkontribusi pada respons inflamasi. Selain itu pada tikus ditemukan peningkatan produksi sitokin oleh makrofag akibat adanya OmpK35 dan OmpK36 serta ekspresi sitokin lainnya (Lee *et al.*, 2012). Meskipun vaksin berbasis OMV menunjukkan angka toleransi dan rendahnya toksisitas, perlu diperhatikan lebih lanjut karena kompleksitas komposisi OMV sehingga menyulitkan untuk memastikan konsistensi dalam prosedur pembuatan dan pengendalian kualitas (Assoni *et al.*, 2021).

d. Formulasi Berbasis Ribosom

Formulasi vaksin berbasis ribosom bakteri atau fraksi ribosom telah dilakukan selama beberapa dekade. Secara umum, vaksin berbasis ribosom bakteri terbukti meningkatkan perlindungan jika dibandingkan dengan vaksin sel utuh. Vaksin berbasis ribosom yang diekstrak dari bakteri *K. pneumoniae* telah menunjukkan perlindungan secara sistemik ketika diinjeksi secara subkutan (Gregory, 1986 dalam Assoni *et al.*, 2021). Studi lain menunjukkan *aerosol formulation based* bakteri *K. pneumoniae* juga signifikan meningkatkan IgG dan IgM level. Hingga saat ini efikasi *ribosomal-based formulation* vaksin masih kontroversial dikarenakan banyaknya kontaminasi yang terjadi sehingga memungkinkan adanya bias dalam proses perlindungan sistem imun (Michel *et al.*, 1978; Robert *et al.*, 1981 dalam Assoni *et al.*, 2021).

e. Formulasi Berbasis Protein

Salah satu bentuk formulasi yang memanfaatkan protein sebagai formulasi vaksin adalah formulasi berbasis protein. Efek perlindungan formulasi berbasis protein akibat infeksi *K. pneumoniae*. OmpA juga dikenal sebagai P40 merupakan pembawa potensial dalam formulasi terkonjugasi (Berlin *et al.*, 2001 dalam Assoni *et al.*, 2021). Ketika diberikan sebagai pembawa kombinasi RSV-A, ia dapat menginduksi sekresi IgA, IgG1, dan IgG2a. Menariknya, imunisasi OmpA rekombinan menginduksi respons Th1/Th2 termasuk sitokin diantaranya IL-2,

IgG, IL-10, dan IFN γ . (Berlin *et al.*, 2001; Caroline Soulas *et al.*, 2000 dalam Assoni *et al.*, 2021).

f. *Fimbriae*/Pili

Klebsiella pneumoniae ditemukan dua tipe *fimbriae*/pili yakni tipe 1 dan tipe 3. Pili tipe 1 berfungsi sebagai adhesi pada epitel dan membran mukosa sedangkan pada subunit pili tipe 3 penting untuk adhesi dan pembentukan biofilm pada permukaan biotik dan abiotik (Witkowska *et al.*, 2005 dalam Assoni *et al.*, 2021). Variabilitasnya yang rendah menjadikan keuntungan tersendiri bagi vaksin berbasis pili. Kedua subunit pili tersebut telah dievaluasi sebagai pembawa protein. Hasil menunjukkan peningkatan produksi IL-6 dan IFN dengan adanya kedua konjugat pili (Witkowska *et al.*, 2005 dalam Assoni *et al.*, 2021).

g. Toksin

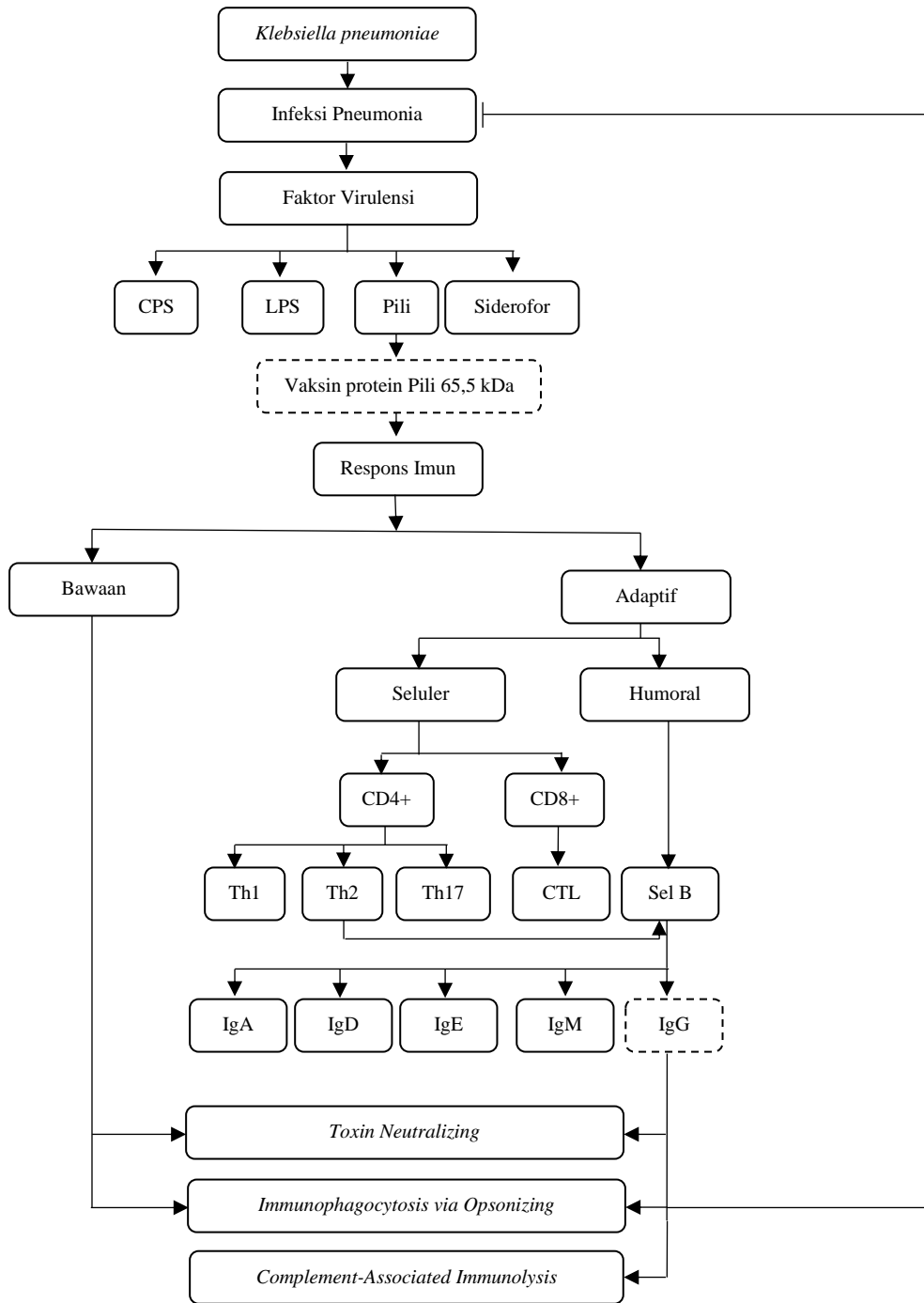
Klebsiella pneumoniae menghasilkan serta mengsekresikan toksin dan antitoksin. Strain yang dihasilkan oleh *K. pneumoniae* sangat virulen sehingga termasuk kandidat vaksin (Fernández-garcía *et al.*, 2016). Enterotoksin *K. pneumoniae* juga stabil dalam suhu panas (Singh & Sharma, 2001 dalam Assoni *et al.*, 2021). Toksoid dari *K. pneumoniae* berasal dari sitotoksin I endogen yang meningkatkan imunitas infeksi sistemik. Toksoid tersebut diantaranya KCT-I dan PBE (Klipstein *et al.*, 1983 dalam Assoni *et al.*, 2021).

2.4 Rute Pemberian

Terdapat beberapa pemilihan rute pemberian bagi hewan coba penelitian: intravena/*intravenous*, subkutan/*subcutaneous*, intraperitoneal, dan oral. Setiap jenis rute pemberian dipengaruhi oleh kebutuhan spesifik tiap studi (Al Shoyaib *et al.*, 2019). Pemberian secara intravena memiliki absorpsi yang maksimal dan penyerapan yang cepat namun menyebabkan kondisi stress pada hewan coba. Pemberian secara intravena juga sangat sulit pada studi yang membutuhkan pemberian agen secara berulang (Jin *et al.*, 2015; Al Shoyaib *et al.*, 2019). Pemberian secara subkutan juga tidak disarankan pada pemberian agen dengan volume yang banyak. Kekurangan lain pada pemberian subkutan yakni rendahnya

laju absorpsi dan bioavaibilitas (Al Shoyaib *et al.*, 2019). Landasan lain tidak dapat dipilihnya rute subkutan disebabkan karena injeksi dengan metode subkutan menyebabkan sensasi nyeri sehingga hewan coba mengalami stres. Hal tersebut meyebabkan terinduksinya respons inflamasi sehingga dapat menjadi bias pada hasil penelitian (Usach *et al.*, 2019). Pemberian secara oral tidak sesuai pada pemberian zat berupa agen biologis seperti bakteri, virus, parasit. Injeksi intraperitoneal (IP) merupakan rute yang direkomendasikan bagi penelitian eksperimental menggunakan agen biologis. Berbeda dengan pemberian IV yang tidak dapat digunakan pada pemberian zat secara berulang, rute secara intraperitoneal sangat cocok diberikan pada studi yang memerlukan pemberian zat secara berulang. Injeksi secara intraperitoneal juga tidak terlalu memicu kondisi stres pada hewan coba. Selain itu, pemberian secara intraperitoneal juga disarankan karena memiliki luas permukaan yang besar serta terdapat pembuluh darah besar yang meningkatkan penyerapan zat. Pemberian dengan berat molekul 30.000 Da juga sangat disarankan karena terserap maksimal oleh pembuluh limfatik untuk dilanjutkan ke sirkulasi sistemik. Rute pemberian secara intraperitoneal juga memiliki laju absorpsi yang lebih tinggi dibandingkan subkutan dan oral. Sejumlah keuntungan tersebut menyebabkan rute intraperitoneal lebih dipilih dibandingkan rute pemberian yang lain (Al Shoyaib *et al.*, 2019).

2.5 Kerangka Teori



Keterangan:
 - - - : Diteliti
 □ : Tidak diteliti
 → : Mempengaruhi
 —| : Mencegah

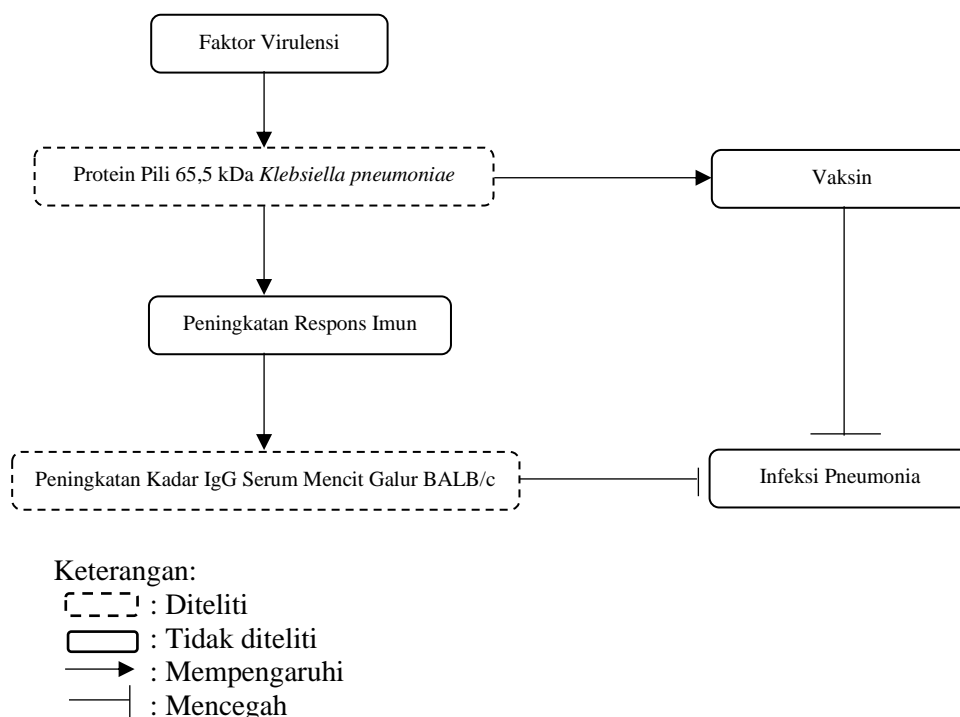
Gambar 2.9 Kerangka Teori

Infeksi *Klebsiella pneumoniae* seringkali menyebabkan wabah nosokomial dan infeksi komunitas/*community-acquired infection* (CAI). Penanganan yang diperlukan untuk menangani hal tersebut ialah dengan mengembangkan vaksin. Hingga saat ini, terdapat beberapa jenis vaksin *K. pneumoniae* yang sedang dikembangkan, diantaranya *whole-cell vaccine* dan *sub-unit vaccine*. *Sub-unit vaccine* dapat berasal dari beberapa materi bakteri yang bekerja sebagai faktor virulensi, salah satunya vaksin berbasis protein pili (Assoni *et al.*, 2021). Protein pili merupakan bagian dari bakteri yang nantinya akan berfungsi sebagai adhesi untuk perlekatan pada permukaan *host cell* serta pembentukan biofilm (Riwu *et al.*, 2022). Berat molekul 65,5 kDa terpilih menjadi kandidat vaksin karena pada *band* yang paling tebal. *Band* paling tebal pada SDS-PAGE menunjukkan konsentrasi pada berat molekul tersebut adalah yang tertinggi (Agustina, 2022).

Injeksi protein pili dengan berat molekul 65,5 kDa dapat menginduksi sistem imun baik sistem imun bawaan maupun sistem imun adaptif. Salah satu respons imun yang terinduksi ialah imunoglobulin. Imunoglobulin merupakan antibodi glikoprotein yang diproduksi oleh sel plasma (Vaillant *et al.*, 2023). Sel plasma merupakan sel yang menghasilkan protein dan berpartisipasi dalam respons sistem imun humoral seperti: bakteri, jamur, dll. Antibodi sangat berperan penting pada sistem imunitas setiap manusia, Selain IgG, terdapat antibodi lain yang diproduksi oleh tubuh, diantaranya: IgA, IgM, IgD, dan IgE (Maibom-thomsen *et al.*, 2019). Respons imun adaptif dimulai ketika sel dendritik dan makrofag, yang bertindak sebagai *antigen-presenting cells* (APC), menyajikan antigen melalui *major histocompatibility complex* (MHC). Karena *K. pneumoniae* adalah bakteri ekstraseluler, MHC II akan menyajikan antigen kepada sel *T-helper*. Sel *T-helper* diantaranya termasuk Th-1, Th-2, dan Th-17 yang merupakan diferensiasi dari Sel T CD4+ sedangkan *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL) merupakan diferensiasi dari sel CD8+. Sel *T-helper-2* kemudian membantu mengaktifkan dan mendiferensiasi sel B, yang akan berubah menjadi sel plasma dan memproduksi antibodi, diantaranya Imunoglobulin A, Imunoglobulin D, Imunoglobulin E, Imunoglobulin M, dan Imunoglobulin G. Imunoglobulin A (IgA) merupakan antibodi yang dihasilkan oleh lapisan mukosa dan bekerja sebagai lini pertahanan pertama pada lapisan mukosa.

Imunoglobulin D (IgD) hingga saat ini masih diteliti lebih dalam terkait perannya. Imunoglobulin E (IgE) merupakan mekanisme pertahanan penting terutama dalam melawan infeksi basofil dan mediasi reaksi alergi. Imunoglobulin M (IgM) merupakan antibodi yang diproduksi pada fase awal infeksi. Imunoglobulin G (IgG) merupakan antibodi yang diproduksi pada fase kronis infeksi. Antibodi ini berfungsi untuk mengeliminasi bakteri melalui beberapa mekanisme, termasuk *toxin neutralizing*, *immunophagocytosis via opsonizing*, dan *complement-associated immunolysis*. *Toxin neutralizing* menetralkan racun yang dihasilkan oleh bakteri dengan *neutralizing-antibody* (Nab). *Neutralizing-antibody* bekerja dengan mengikat patogen yang dapat mencegah patogen menginfeksi sel inang. *Immunophagocytosis via opsonizing* melibatkan neutrofil dan makrofag untuk melakukan fagositosis setelah IgG melekat pada bakteri. Opsonisasi merupakan mekanisme imun dengan menandai bakteri sehingga dapat dikenali. Mekanisme ini bekerja dengan menandai bakteri dengan antibodi kemudian ikatan tersebut dikenali dan difagosit lebih cepat oleh neutrofil dan makrofag yang merupakan bagian dari sistem imun bawaan. *Complement-associated immunolysis* membunuh bakteri dengan melisiskannya melalui sistem komplemen. Sistem komplemen merupakan bagian dari respons imun bawaan yang salah satunya bisa diaktivasi oleh adanya antibodi yang berikatan dengan patogen. Tiga mekanisme tersebut akan membantu respons imun inang untuk mencegah bakteri melanjutkan siklus hidupnya serta mengeliminasi bakteri lebih cepat. Sehingga, terbentuk proteksi pada tubuh inang yang mencegah infeksi *Klebsiella pneumoniae* (Laing, 2019; Murphy & Weaver, 2016 dalam Sawa *et al.*, 2019).

3.4 Kerangka Konseptual



Gambar 2.10 Kerangka Konseptual

Hingga saat ini, perkembangan vaksin *Klebsiella pneumoniae* masih terus berkembang. Salah satu potensi vaksin yaitu menggunakan pili yang merupakan salah satu faktor virulensi. Protein pili merupakan kandidat vaksin karena telah signifikan meningkatkan respons imun baik sistem imun bawaan maupun sistem imun adaptif. Injeksi protein pili sebesar 65,5 kDa diharapkan mampu meningkatkan respons imun adaptif yang nantinya akan meningkatkan kadar IgG yang merupakan salah satu antibodi dalam sistem imun humoral. Munculnya IgG sebagai respons imun diharapkan mampu mencegah infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Klebsiella pneumoniae* melalui proses *complement-associated immunolysis*, *toxin neutralizing*, dan *immunophagocytosis via opsonizing* (Laing, 2019; Murphy & Weaver, 2016; Sawa *et al.*, 2019)

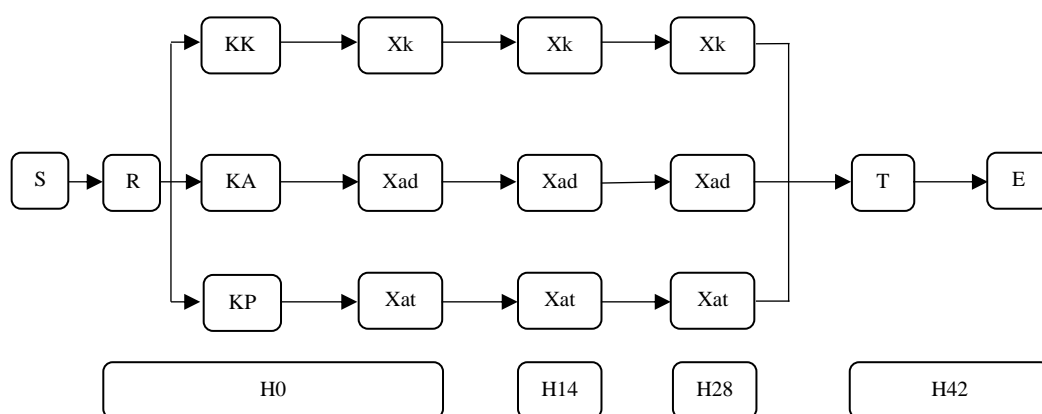
2.6 Hipotesis Penelitian

Terdapat peningkatan kadar IgG pascainjeksi protein pili dengan berat molekul 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae* pada serum mencit galur BALB/C.

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental *in vivo* murni dengan desain *randomized posttest only controlled group*. Pengukuran kadar Imunoglobulin-G dilakukan menggunakan pengujian ELISA. Kelompok kontrol (KK) hanya diinjeksi dengan PBS. Kelompok adjuvan (KA) merupakan kelompok yang hanya menerima *freund's adjuvant* dan PBS sedangkan kelompok perlakuan (KP) diinjeksi dengan protein pili 65,5 kDa yang dicampur dengan PBS dan *freund's adjuvant*. Injeksi pada mencit dilakukan melalui injeksi intraperitoneal yang merupakan metode yang paling umum untuk injeksi mencit, yang mempercepat drainase ke sistem limfatik dan kemudian ke sistem vaskular, sehingga memicu responss lokal dan sistemik (Greenfield, 2020). Injeksi dilakukan pada hari ke 0, hari ke 14, dan hari ke 28. Pengambilan sampel untuk mengukur kadar IgG dilakukan pada hari ke 14 setelah injeksi ketiga.



Gambar 3.1. Skema Penelitian

Keterangan:

S : Sampel

R : Randomisasi

KK : Kelompok kontrol

KA : Kelompok adjuvan

- KP : Kelompok perlakuan
H0 : Hari ke-0 merupakan waktu randomisasi dan perlakuan pertama
H14 : Hari ke-14 merupakan waktu perlakuan kedua
H28 : Hari ke-28 merupakan waktu perlakuan ketiga
H42 : Hari ke-42 merupakan waktu terminasi mencit dan pengukuran kadar IgG
Xk : Perlakuan kepada kelompok kontrol yang diinjeksi dengan 200 uL PBS melalui intraperitoneal
Xa : Kelompok adjuvan yang diberi perlakuan dengan injeksi campuran 100 uL *freund's adjuvant* dan 100 uL PBS secara intraperitoneal.
Xat : Kelompok perlakuan yang diberi perlakuan dengan injeksi campuran 8 uL volume antigen, 100 uL *freund's adjuvant*, dan 92 uL PBS secara intraperitoneal.
T : Terminasi dan pengambilan sampel serum darah mencit
E : Pengukuran kadar IgG dengan metode uji ELISA

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Biokimia, dan Rumah Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Jember antara bulan Mei hingga Desember 2024.

3.3 Populasi dan Sampel/Subyek Penelitian

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan galur BALB/C berusia 6-8 minggu. Dengan kriteria inklusi yang digunakan adalah:

- a. Mencit putih jantan galur BALB/C,
- b. Usia 6-8 minggu dengan berat sekitar 25 gram,
- c. Kondisi mencit sehat, aktif, dan memiliki mata jernih.

Sedangkan kriteria eksklusi dalam penelitian ini meliputi:

- a. Mencit yang sakit, ditandai dengan kelemahan, bulu kusam, dan kurang nafsu makan, terlihat adanya luka infeksi, dan meninggal dunia selama penelitian berlangsung,
- b. Mencit dengan luka berat yang mungkin disebabkan oleh gigitan mencit lain,
- c. Mencit yang darahnya tidak dapat diambil melalui *cardiac puncture*.

3.3.2 Sampel penelitian

Sampel penelitian ini adalah serum darah dari 24 mencit putih jantan galur BALB/C.

3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

Sampel dalam penelitian ini diambil menggunakan metode *simple random sampling* dari populasi mencit putih jantan galur BALB/C sebagai hewan percobaan. *Simple random sampling* merupakan teknik pengambilan sampel secara acak tanpa mempertimbangkan strata dalam populasi, sehingga setiap anggota populasi memiliki peluang yang sama untuk terpilih sebagai sampel. Metode yang digunakan untuk *simple random sampling* ini adalah undian atau lotere. Prosesnya dimulai dengan membentuk tiga kelompok perlakuan pertama sebagai kelompok kontrol (KK) diinduksi dengan PBS, kelompok perlakuan kedua sebagai kelompok adjuvan (KA) yang diinduksi *freund's adjuvant* dan PBS, serta kelompok perlakuan ketiga sebagai kelompok perlakuan (KK) yang diinduksi antigen protein pili 65,5 kDa *K.pneumoniae* yang dicampur dengan PBS dan *Freund's adjuvant*. Setiap kelompok terdiri atas 8 mencit, dan semua mencit dalam populasi diberi nomor dari 1 hingga 24. Aplikasi *spin wheel* digunakan untuk memilih nomor mencit serta mengelompokkan nomor populasi yang terpilih ke dalam kelompok kontrol (KK).

3.3.4 Besar Sampel Penelitian

Penentuan jumlah sampel dilakukan dengan merujuk perhitungan menggunakan *Degree of Freedom* (Arifin & Zahiruddin, 2017). Rumus perhitungan sampel dijabarkan sebagai berikut:

Sampel minimum

$$= \frac{10}{k} + 1$$

$$= \frac{10}{3} + 1$$

$$= 4,34 \sim 4$$

Sampel maksimum

$$= \frac{20}{k} + 1$$

$$= \frac{20}{3} + 1$$

$$= 7,67 \sim 8$$

Keterangan:

k = jumlah kelompok perlakuan

Berdasarkan hasil hitungan tersebut, didapatkan jumlah sampel sebanyak 4 – 8 ekor tiap kelompok dengan jumlah maksimum 8.

3.4 Jenis dan Sumber Data

Jenis data pada variabel yang diukur pada penelitian ini merupakan data primer. Data primer diambil dari kadar Immunoglobulin-G pada serum hewan coba.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang memengaruhi atau menjadi penyebab terjadinya perubahan pada variabel dependen (Hernawati, 2017). Dalam penelitian ini, variabel bebasnya adalah protein pili 65,5 kDa *K. pneumoniae*. Variabel ini berperan dalam perbedaan perlakuan di antara tiga kelompok perlakuan pertama sebagai kelompok kontrol (KK) yang diinduksi dengan PBS, kelompok perlakuan kedua sebagai kelompok adjuvan (KA) yang diinduksi *freund's adjuvant* dan PBS, serta kelompok perlakuan ketiga sebagai kelompok perlakuan (KP) yang diinduksi protein pili 65,5 kDa *K. pneumoniae* dicampur dengan PBS dan *freund's adjuvant*.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat (dependen) adalah variabel yang dijelaskan atau dipengaruhi oleh variabel independen (Hernawati, 2017). Dalam penelitian ini, variabel terikatnya adalah kadar IgG dalam serum mencit putih jantan galur BALB/C, yang diukur menggunakan metode ELISA.

3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini dipaparkan dalam tabel 3.1 dibawah ini:

Tabel 3.1 Variabel Penelitian

Nama Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Jenis Data
Protein Pili 65,5 kDa <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Protein pili adalah protein yang diisolasi dari pili bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Protein pili telah melalui proses purifikasi protein, uji hemaglutinasi untuk melihat kemampuan hemaglutinin, dan identifikasi berat molekul 65,5 kDa dengan metode SDS-PAGE (Agustina, 2022). Protein diinjeksikan melalui jalur intraperitoneal dengan volume perkelompok mencit yaitu 8 uL.	Konsentrasi protein pili diukur menggunakan metode Kingsley dengan menginkubasi campuran reagen biuret dan sampel kemudian diukur pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 545 nm	Rasio
Kadar IgG	IgG adalah antibodi yang diproduksi oleh sel plasma (Allen & Sharma, 2022) yang kadarnya diketahui melalui pembacaan ELISA dari serum mencit jantan galur BALB/c.	Kadar IgG diukur melalui metode <i>competitive</i> ELISA	Rasio

3.7 Instrumen Penelitian

3.6.1 Alat

Alat yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah adalah elektroforesis horizontal, *SDS-PAGE*, *incubator*, *vortex*, *magnetic stirrer*, *centrifuge*, *autoclave*, *beaker glass*, *refrigerator*, tabung falcon, *mikroplate V 96 well*, *mikropipet*, *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, *ELISA reader*, *ELISA kit*, timbangan analitik, gunting, *scapel*, gelas ukur, tabung eppendorf, *disposable spuit 3 cc*, *disposable spuit 1 cc*, *disposable needle 26 G*, *schott bottle*, kandang hewan coba, tempat pakan dan minum hewan coba, papan bedah.

3.6.2 Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini yaitu potongan pili bakteri *K.pneumoniae*, *Phosphate Buffer Saline (PBS)*, *Complete Freund's Adjuvant (CFA)*, *Incomplete Freund's Adjuvant (IFA)*, *Ketamine xylazine*, es batu, serum mencit, dan mencit jantan strain BALB/C.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Uji Kelayakan Etik

Peneliti mengajukan persetujuan etik kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember karena menggunakan mencit sebagai hewan coba.

3.7.2 Preparasi Protein Pili 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae*

Protein pili *Klebsiella pneumoniae* dengan berat molekul 65,5 kDa telah melewati proses purifikasi protein. Setelah melalui proses purifikasi protein, sampel dilanjutkan dengan perhitungan kadar protein dengan metode Kingsley (GEBA, 2019). Sampel protein didapatkan dari penelitian Agustina *et al.*, (2022) dan didapatkan kadar konsentrasi protein sebesar 0,64 gr/dL. Selanjutnya, protein pili dengan berat molekul 65,5 kDa dilanjutkan dengan uji hemaglutinasi untuk mengukur kemampuan aglutinin. Bahan penelitian protein pili dengan berat

molekul 65,5 kDa telah melalui uji hemaglutinasi dan didapatkan hasil positif dengan titer 1/8 pada penelitian Agustina *et al.*, (2022).

3.7.3 Aklimatisasi Hewan Coba

Aklimatisasi adalah tahap penting dalam pemeliharaan hewan coba yang bertujuan membantu hewan beradaptasi dengan lingkungan baru. Dengan demikian, saat tindakan dilakukan, diharapkan hewan tersebut tidak mengalami stres (Hasanah, 2017; Mutiarahmi *et al.*, 2021). Aklimatisasi mencit dilakukan dengan memelihara 24 mencit jantan galur BALB/C selama 7 hari di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Jika ada hewan yang sakit atau mati, hewan tersebut akan dikeluarkan dari penelitian. Setelah periode 7 hari, mencit akan dirandomisasi sebelum imunisasi sesuai dengan kelompok perlakuan yang telah ditentukan.

3.7.4 Induksi Mencit dengan Protein Pili 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae*

Setelah proses aklimatisasi selama 7 hari, mencit akan dirandomisasi sebelum induksi sesuai dengan kelompok perlakuan. Terdapat tiga kelompok perlakuan yang berbeda kelompok pertama sebagai kelompok kontrol (KK) yang diinduksi dengan PBS; kelompok kedua sebagai kelompok adjuvan (KA) yang menerima *freund's adjuvant* dan PBS; dan kelompok ketiga sebagai kelompok perlakuan (KP) yang diinduksi dengan protein pili 65,5 kDa dari *Klebsiella pneumoniae* yang dicampurkan dengan PBS dan *freund's adjuvant*. Induksi pada mencit dilakukan secara intraperitoneal sebanyak tiga kali dengan jangka waktu yang diberikan adalah dua minggu, sehingga penyuntikan dilakukan pada hari ke 0, hari ke 14, dan hari ke 28 (Care & U, 2017; Greenfield, 2019a, 2020). Sebelum dilakukan induksi, antigen protein pili 65,5 kDa didiamkan di suhu ruang hingga mencair dan dapat dilakukan induksi. Adjuvan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *complete freund's adjuvant* (CFA) dan *incomplete freund's adjuvant* (IFA). CFA mengandung mikobakteri yang tidak aktif, sehingga digunakan sebagai priming pada awal induksi kelompok mencit KA dan KP. Di sisi lain, IFA hanya terdiri dari air dan emulsi minyak, dan digunakan sebagai booster untuk kelompok mencit KA dan KP (Care & U, 2017; Greenfield, 2019a). Dosis antigen yang

digunakan adalah 50 µg kemudian didapatkan volume antigen yang diinjeksikan kepada setiap mencit untuk kelompok perlakuan (KP) sebesar 8 uL (Lampiran 1) (Greenfield, 2019b). Perbandingan antara adjuvan dan campuran antigen-PBS adalah 1:1 (Greenfield, 2020). Perhitungan dosis masing-masing kelompok tercantum pada Lampiran 1.

3.7.5 Preparasi Sampel Serum Mencit Jantan Galur BALB/C

Empat belas hari setelah induksi ketiga, mencit akan diterminasi. Mencit dianestesi secara intraperitoneal dengan kombinasi ketamin dan xylazine. (Erickson *et al.*, 2016; IOWA, 2023). Setelah anestesi berfungsi, mencit dibedah di bagian abdomen hingga peritoneum terbuka. Selanjutnya, darah diambil melalui *cardiac puncture* menggunakan spuit dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Persiapan sampel mengikuti prosedur yang tercantum dalam manual buku ELISA kit. Sampel darah dibiarkan selama 10-20 menit pada suhu ruang. Kemudian, sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang dihasilkan dapat segera diambil untuk pengujian langsung atau disimpan pada suhu -20° C dengan jangka waktu maksimal pengujian langsung satu bulan atau -80°C dengan jangka waktu maksimal pengujian langsung tiga bulan.

3.7.6 Uji ELISA

Sebelum melakukan pengujian, sample serum dan ELISA kit yang disimpan dalam lemari pendingin diletakkan pada suhu ruang. Langkah pertama yang dilakukan adalah menyiapkan reagen sesuai dengan prosedur di ELISA kit. Memasukkan 120 ul *reagen standart diluent* ke dalam eppendorf label 5, dihomogenkan lalu memindahkan 120 ul campuran pada eppendorf 5 ke eppendorf 4 dan seterusnya. Mengencerkan *wash buffer concentrate 25x* ke dalam *double distilled water* sesuai kebutuhan dengan perbandingan 20 ml untuk 500 ml volume campuran.

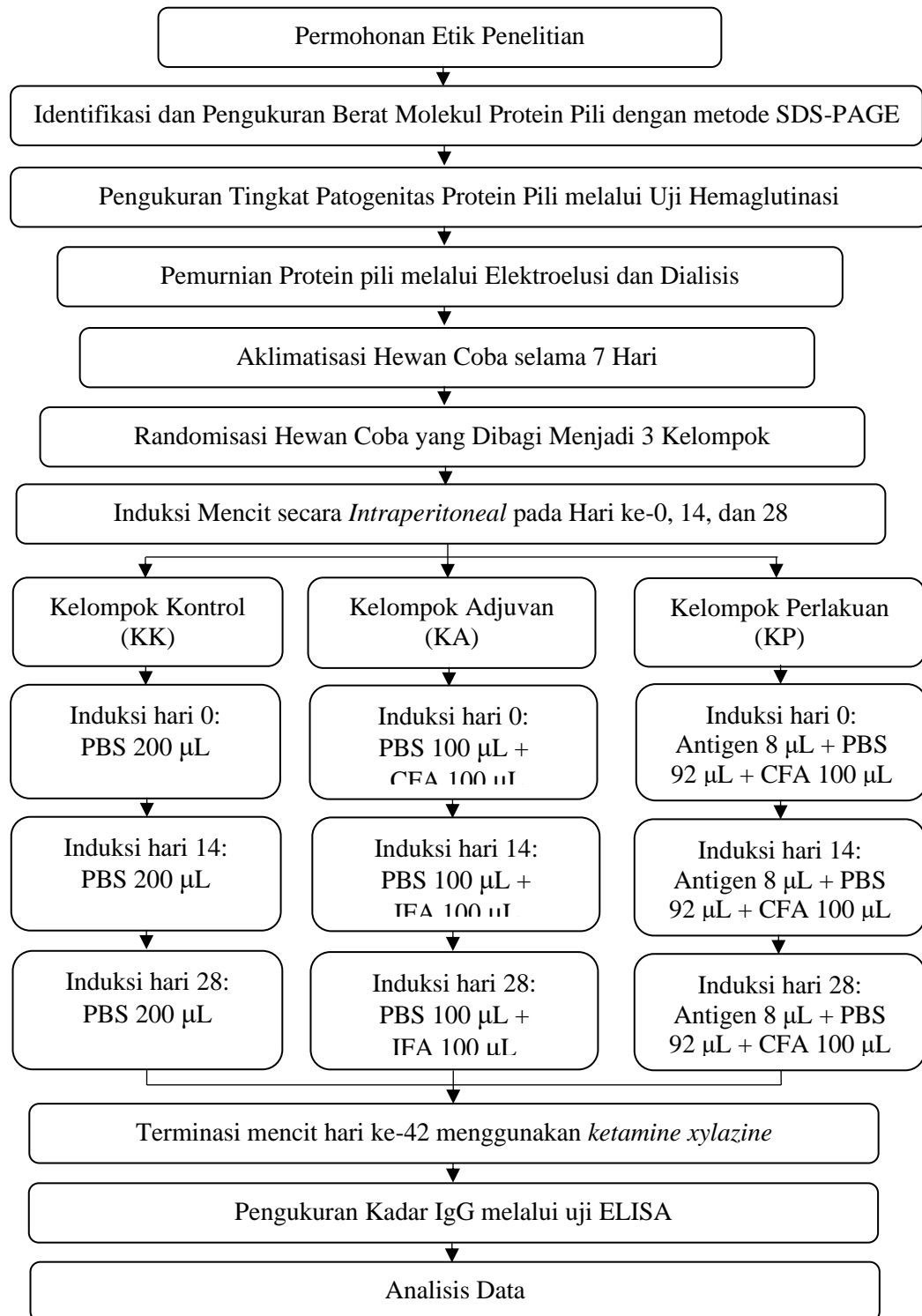
Langkah berikutnya adalah menyiapkan *mapping* ELISA untuk menentukan jumlah strip yang dibutuhkan. Memasukkan 50 ul standart ke setiap sumuran, dan memasukan 50 uL sample ke sumuran sampel dan tambahkan 50 ul *biotinylated antigen* ke setiap sumuran. Tutup dengan sealer dan inkubasi selama 60 menit pada

suhu 37° C. Buka sealer, keluarkan cairan dan cuci sebanyak 3 kali dengan wash buffer yang dilanjutkan dengan mengeringkan sumuran plate. Setelah bersih, tambahkan 50 ul *avidin-HRP* ke sumuran, tutup dengan sealer dan inkubasi selama 60 menit pada suhu 37° C. Buka *sealer* dan cuci kembali sebanyak tiga kali. Kemudian, tambahkan 50 ul substrate A dan 50 uL substrate B ke dalam setiap sumuran. Tutup dengan *sealer* dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 37° C dalam kondisi gelap. Tambahkan 50 uL stop solution ke setiap sumuran plate dan warna akan berubah dari biru menjadi kuning. Kemudian hitung *optical density* setiap well pada *ELISA reader* dengan panjang gelombang 450 nm maksimal 10 menit setelah diberikan *stop solution*.

3.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini merupakan data primer. Setelah hasil dari *ELISA reader* tersedia, konsentrasi IgG dalam serum darah mencit diuji dengan uji normalitas *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas *Levene Test*. Tujuan dari uji ini adalah untuk menentukan apakah data terdistribusi normal dan untuk memeriksa apakah varians populasi homogen. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, analisis konsentrasi IgG dilakukan dengan uji parametrik *One-Way ANOVA*. Apabila data tidak terdistribusi normal dan/atau tidak homogen maka menggunakan uji alternatif non-parametrik menggunakan *Kruskal-Wallis*. Hasil analisis uji tersebut digunakan untuk melihat apakah terdapat kenaikan IgG pascainjeksi protein pili 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae*.

3.9 Alur Penelitian



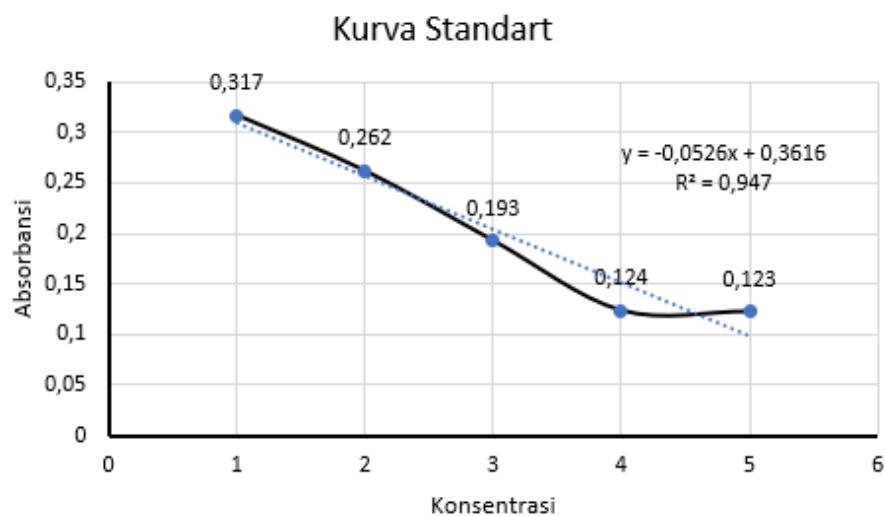
Gambar 3.2 Alur Penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Kadar IgG

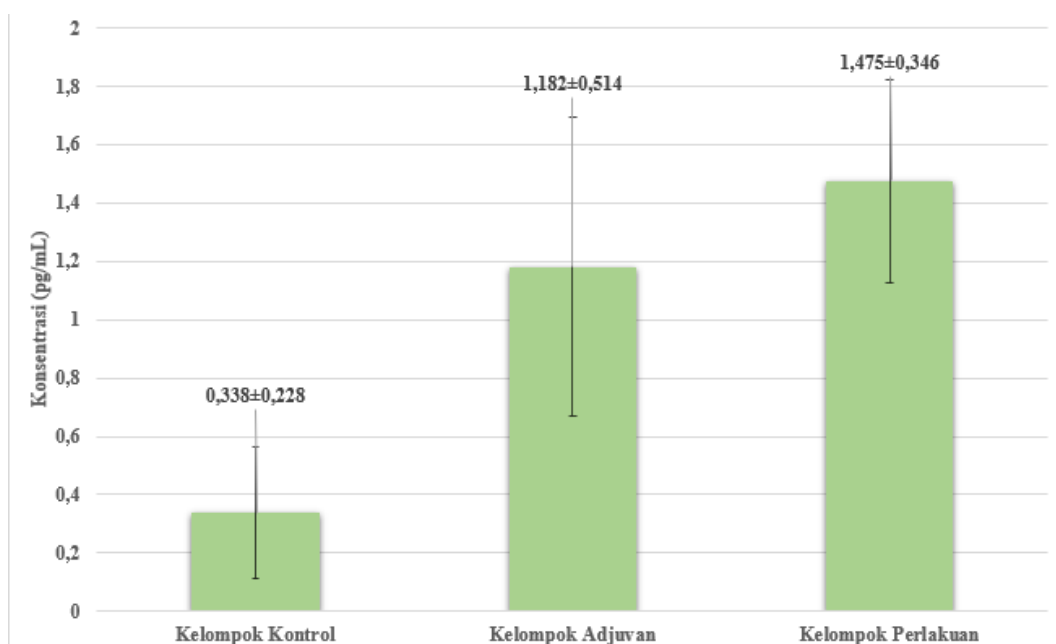
Kadar IgG didapatkan dari spesimen serum darah mencit jantan galur BALB/C yang diukur menggunakan metode ELISA yang diatur dengan panjang gelombang 450 nm. Hasil absorbansi yang terlihat pada ELISA *reader* disimbolkan sebagai y dan konsentrasi disimbolkan sebagai x dengan faktor korelasi (R) mendekati 1 ($R = 0,947$). Hasil absorbansi dikonversikan dalam persamaan linier $y = ax + b$. Persamaan regresi linear yang didapat dari larutan standar adalah $y = -0,0526x + 0,3616$ dengan kurva larutan standar dapat dilihat pada Gambar 4.1. Konsentrasi IgG setiap kelompok didapatkan melalui perhitungan pada persamaan tersebut yang tercantum pada Lampiran 3.



Gambar 4.1 Kurva Standar IgG

Hasil pengukuran menunjukkan rata-rata kadar IgG terendah ada pada kelompok kontrol (KK) dengan nilai rata-rata $0,338 \pm 0,228$ pg/mL yang dijadikan sebagai acuan nilai normal. Nilai rata-rata tertinggi berikutnya terdapat pada kelompok adjuvan (KA) dengan nilai rata-rata $1,182 \pm 0,514$ pg/mL. Nilai rata-rata

tertinggi diantara seluruh kelompok adalah kelompok perlakuan (KP) dengan nilai rata-rata $1,475 \pm 0,346$ pg/mL yang tercantum pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Diagram Rata-Rata Konsentrasi IgG.

4.1 Uji Analisis Statistik

4.2.1 Uji Normalitas

Uji normalitas dengan *Shapiro Wilk* dilakukan untuk mengetahui sebaran data normal atau tidak. Hasil uji normalitas menunjukkan seluruh data terdistribusi normal karena seluruh kelompok memiliki nilai *p-value* lebih dari 0,05 ($p > 0,05$). Kelompok kontrol (KK) memiliki nilai *p-value* sebesar 0,645, kelompok adjuvan (KA) memiliki nilai *p-value* sebesar 0,558, dan kelompok perlakuan (KP) memiliki nilai *p-value* sebesar 0,619 (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Hasil Uji Normalitas

Kelompok	Jumlah Sampel	<i>p-value</i>
Kelompok Kontrol (KK)	8	0,645
Kelompok Adjuvan (KA)	8	0,558
Kelompok Perlakuan (KP)	8	0,619

4.2.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas dengan *Levene test* untuk mengetahui apakah data homogen atau tidak. Hasil uji homogenitas dengan *Levene test* menunjukkan nilai *p-value* 0,216 yang menunjukkan seluruh data homogen karena memiliki nilai *p-value* paada seluruh kategori $p > 0,05$. Berdasarkan uji normalitas dan uji homogenitas, data penelitian ini memenuhi syarat data parametrik (Tabel 4.2).

Tabel 4.2 Hasil Uji Homogenitas

<i>Levene Statistic</i>	Jumlah sampel	<i>p-value</i>
1,653	24	0,216

4.2.3 Uji *One-Way ANOVA*

Hasil uji normalitas dan homogenitas memenuhi persyaratan uji hipotesis parametrik, maka dilanjutkan dengan analisis menggunakan *One-Way ANOVA*. Hasil analisis dengan uji *One-Way ANOVA* menunjukkan *p-value* antar kelompok perlakuan 0,000 ($p < 0,05$) mengartikan data penelitian ini memiliki perbedaan antar kelompok yang signifikan (Tabel 4.3).

Tabel 4.3 Hasil Uji *One-Way ANOVA*

Kadar IgG	<i>p-value</i>
Perbandingan antar kelompok	0,000

4.2.4 Uji *Post-Hoc*

Analisis Uji *Post-Hoc* menunjukkan kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok adjuvan mendapatkan nilai signifikansi *p-value* sebesar 0,001 ($p < 0,05$), kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan mendapatkan nilai signifikansi *p-value* sebesar 0,000 ($p < 0,05$), dan kelompok adjuvan dibandingkan dengan kelompok perlakuan mendapatkan nilai signifikansi *p-value* sebesar 0,340 ($p < 0,05$). Hasil ini menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok adjuvan serta antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pada kelompok adjuvan dibandingkan dengan kelompok perlakuan mendapatkan hasil tidak ada perbedaan signifikan (Tabel 4.4).

Tabel 4.4 Hasil Uji *Post-Hoc*

Perbandingan antar kelompok		<i>p-value</i>
Kelompok kontrol (KK)	Kelompok adjuvan (KA)	0,001
	Kelompok perlakuan (KP)	0,000
Kelompok adjuvan (KA)	Kelompok kontrol (KK)	0,001
	Kelompok perlakuan (KP)	0,340
Kelompok perlakuan (KP)	Kelompok kontrol (KK)	0,000
	Kelompok adjuvan (KA)	0,340

4.2 Pembahasan

Penelitian ini menunjukkan terjadi peningkatan kadar IgG serum pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol setelah diinjeksi protein pili 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae*. Hasil uji hipotesis *One-Way ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan dengan nilai signifikansi *p-value* 0,000 ($p < 0,05$). Hasil penelitian ini sejalan penelitian Agustina, (2017) bahwa induksi protein pili *K. pneumoniae* secara subkutan pada mencit BALB/C mampu menginduksi pembentukan antibodi IgG. Selain itu, hasil penelitian ini selaras dengan studi yang dilakukan oleh Sirat, (2021) antigen dengan berat molekul >10 kDa memiliki sifat imunogenik. Peningkatan kadar IgG pada kelompok perlakuan disebabkan oleh pemberian protein pili *K. pneumoniae* 65,5 kDa yang mengindikasikan teraktivasinya sistem imun salah satunya antibodi. Pili *K. pneumoniae* bekerja pada fase awal infeksi dan berfungsi sebagai adhesi pada sel inang. Protein pili *K. pneumoniae* juga digunakan dalam berinteraksi dengan makrofag dan agregasi bakteri. Dengan mekanisme tersebut, protein pili *K. pneumoniae* dapat memicu pembentukan respons imun tubuh inang salah satunya antibodi IgG (Arato et al., 2021; Bayart et al., 2021; Vaillant et al., 2023).

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan kadar IgG pada kelompok adjuvan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Uji *Post-Hoc* pada perbandingan kelompok kontrol dan adjuvan menunjukkan perbedaan signifikan

dengan nilai signifikansi *p-value* sebesar 0,001 ($p < 0,05$). Hal tersebut disebabkan oleh karena pemberian *complete freund's adjuvant* yang mengandung *mycobacterium* yang diinaktifkan. Di sisi lain, *incomplete freund's adjuvant* hanya mengandung emulsi minyak dan air tanpa mengandung *Mycobacterium* yang diinaktifkan tersebut. Pemberian *complete freund's adjuvant* dan *incomplete freund's adjuvant* memiliki peran yang sama penting dalam teraktivasinya sistem imun. *Freund's adjuvant* merangsang induksi Th-2 yang dapat menginduksi pematangan sel B. Sel B yang matang tersebut akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang dapat memproduksi antibodi. Pemberian adjuvan digunakan sebagai pemantik respons vaksin pada populasi sehingga dapat menciptakan kondisi imun yang protektif (Care & U, 2017; Martiñón *et al.*, 2019; Dubé *et al.*, 2020).

Hasil uji *Post-Hoc* pada kelompok adjuvan dan kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai signifikansi *p-value* sebesar 0,340 ($p > 0,05$). Hasil pengamatan kedua kelompok menunjukkan rata-rata kadar IgG pada kelompok adjuvan lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan. Hal tersebut terjadi karena pemberian kelompok perlakuan melibatkan antigen protein pili *K. pneumoniae* dan adjuvan sedangkan pada kelompok adjuvan hanya melibatkan pemberian *freund's adjuvant*. Adjuvan merupakan zat tambahan yang memiliki fungsi untuk menginduksi respons imun sebagai akibat dari pemberian antigen. Adjuvan berfungsi dengan meningkatkan antara penyajian antigen ke sel imun yang spesifik antigen (Martiñón *et al.*, 2019). Kelompok adjuvan hanya diberikan *freund's adjuvant* sebagai pembanding untuk kelompok perlakuan dalam menilai kemampuan protein pili *K. pneumoniae* dalam memicu aktivasi sistem imun. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Suswati *et al.*, (2022) yang mendapatkan kadar sitokin IL-10 pada kelompok perlakuan yang diberikan protein pili 65,5 kDa *K.pneumoniae* lebih tinggi dibandingkan kelompok adjuvan. Hal ini membuktikan bahwa injeksi protein pili 65,5 kDa *K. pneumoniae* menghasilkan antibodi IgG serum lebih maksimal apabila ditambahkan *freund's adjuvant* (Suswati *et al.*, 2022).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa protein pili dengan berat molekul 65,5 kDa bakteri *K. pneumoniae* dapat menginduksi pembentukan IgG, sehingga

protein pili dengan berat molekul 65,5 kDa bersifat imunogenik. Imunogenik adalah kemampuan sebuah protein dalam memunculkan respons imun yang protektif, bertahan lama dan memiliki memori terhadap protein spesifik (Valor & Torre, 2013; Wodi & Valerie, 2024). Hasil penelitian ini melengkapi penelitian Agustina, (2022) yang menyatakan protein pili 65,5 kDa bersifat antigenik sehingga protein pili 65,5 kDa *K. pneumoniae* telah terbukti bersifat antigenik dan imunogenik. Hal tersebut membuktikan bahwa protein pili dengan berat molekul 65,5 kDa bakteri *K. pneumoniae* merupakan kandidat yang potensial sebagai vaksin *Klebsiella pneumoniae*.

BAB 5. KESIMPULAN, KETERBATASAN, DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa injeksi protein pili dengan berat molekul 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae* signifikan meningkatkan kadar Immunoglobulin G serum pada mencit jantan galur BALB/C. Data penelitian menunjukkan kelompok perlakuan yang diberikan protein pili 65,5 kDa *K. pneumoniae* memiliki perbedaan signifikan dengan nilai signifikansi *p-value* 0,000 ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol selaku nilai normal. Oleh karena itu, protein pili 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae* bersifat imunogenik dan merupakan kandidat potensial untuk vaksin pneumonia.

5.2 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki keterbatasan hanya meneliti satu dosis antigen protein pili berdasarkan penelitian sebelumnya, sehingga tidak diketahui dosis optimal antigen protein pili 65,5 kDa dalam memengaruhi kadar IgG.

5.3 Saran

Penelitian ini memiliki sejumlah kekurangan sehingga saran yang dapat diberikan oleh peneliti, yaitu:

- a. Penelitian selanjutnya disarankan untuk meneliti beberapa dosis antigen protein pili sehingga dapat menentukan pada dosis berapa antigen tersebut memiliki sifat imunogenik.
- b. Penelitian selanjutnya disarankan untuk meneliti antibodi serta sitokin lain untuk menambah informasi terkait perkembangan vaksin berbasis protein pili.
- c. Penelitian selanjutnya disarankan untuk meneliti berat molekul lain untuk menambah informasi terkait berat molekul pili lainnya, mengetahui efek samping, dan tingkat imunogenitas masing-masing berat molekul.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, R., Chakkour, M., Zein, H., Dine, E., Obaseki, E. F., & Obeid, S. T. (2024). *General Overview of Klebsiella pneumonia : Epidemiology and the Role of Siderophores in Its Pathogenicity*.
- Ada, G., & Isaacs, D. (2003). *Carbohydrate – protein conjugate vaccines*.
- Agarwal, S., & Cunningham-Rundles, C. (2007). Assessment and clinical interpretation of reduced IgG values. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 99(3), 281–283. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60665-5](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60665-5)
- Agustina, D. (2017). *Deteksi Immunoglobulin G dengan Immunoblotting Pasca Imunisasi Subkutan Protein Hemagglutinin Pili Klebsiella pneumoniae 12,8 kDa pada Mencit BALB/c*. 3(2), 40–46.
- Al Shoyaib, A., Archie, S. R., & Karamyan, V. T. (2019). Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? *Pharmaceutical Research*, 37(1), 12. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2745-x>
- Aliberti, S., Cruz, C. S. Dela, Amati, F., Sotgiu, G., & Restrepo, M. I. (2021). Community-acquired pneumonia. *The Lancet*, 398(10303), 906–919. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00630-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00630-9)
- Allen, H. C., & Sharma, P. (2022). *Histology, Plasma Cell*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556082/>
- Arato, V., Raso, M. M., Gasperini, G., Scorza, F. B., & Micoli, F. (2021). *Prophylaxis and Treatment against Klebsiella pneumoniae : Current Insights on This Emerging Anti-Microbial Resistant Global Threat*.
- Arifin, W. N., & Zahiruddin, W. M. (2017). Sample Size Calculation in Animal Studies Using Resource Equation Approach. *The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS*, 24(5), 101–105. <https://doi.org/10.21315/mjms2017.24.5.11>
- Ashrut, J. V., & Dawson, A. (2023). *Klebsiella pneumoniae*. StatPearls. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/#_ncbi_dlg_citbx_NBK519004

- Assoni, L., Girardello, R., & Rojas, T. (2021). Current Stage in the Development of *Klebsiella pneumoniae* Vaccines. *Infectious Diseases and Therapy*, *10*(4), 2157–2175. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00533-4>
- Bai, R., & Guo, J. (2024). Interactions and Implications of *Klebsiella pneumoniae* with Human Immune Responses and Metabolic Pathways: A Comprehensive Review. *Infection and Drug Resistance*, *17*, 449–462. <https://doi.org/10.2147/IDR.S451013>
- Bayart, J., Douxfils, J., Gillot, C., David, C., Mullier, F., Elsen, M., Eucher, C., Eeckhoudt, S. Van, Roy, T., Gerin, V., Laurent, C., Closset, M., Dogn, J., & Favresse, J. (2021). *Waning of IgG , Total and Neutralizing Antibodies 6 Months Post-Vaccination with BNT162b2 in Healthcare Workers. August, 1–12.*
- Benson. (2014). *Microbiological Application Lab Manual* (8th Ed). Mc Graw Hill Companies.
- Berlin, F. U., Goetsch, L., Gonzalez, A., Haeuw, O. I. S., Aubry, J. P., Beck, A., Bonnefoy, J. Y., Corvai, N., Pierre, I., & Genevois, S. (2001). *Targeting of Nasal Mucosa-Associated Antigen-Presenting Cells In Vivo with an Outer Membrane Protein A Derived from Klebsiella pneumoniae.* *69*(10), 6434–6444. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6434>
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2 Suppl 2), S33-40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Buch, A. M., Parmar, D. V, Umrana, V. V, & Mistry, M. A. (2020). AN INSIGHT ON EPIDEMIOLOGY OF HOSPITAL ACQUIRED PNEUMONIA IN A REFERENCE TERTIARY CARE HOSPITAL OF THE SAURASHTRA KUTCH AREA. *International Journal of Scientific Research*, *9*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:225268491>
- Care, I. A., & U, C. (2017). *Guidelines for the use of adjuvants in research special emphasis on Freund's adjuvant.* UNMC Animal Care and Use Program.
- Chathley, O. C. N. E. E., Sharma, S., & Chhibber, S. (1996). *Lipopolysaccharide-Induced Resistance in Mice against Ascending Urinary Tract Infection with Klebsiella pneumonice.* *41*(4), 373–376.
- Choi, M., Hegerle, N., Nkeze, J., Sen, S., Jamindar, S., Nasrin, S., Sen, S., Permala-Booth, J., Sinclair, J., Tapia, M. D., Johnson, J. K., Mamadou, S., Thaden, J.

- T., Fowler, V. G. J., Aguilar, A., Terán, E., Decre, D., Morel, F., Krogfelt, K. A., ... Tennant, S. M. (2020). The Diversity of Lipopolysaccharide (O) and Capsular Polysaccharide (K) Antigens of Invasive *Klebsiella pneumoniae* in a Multi-Country Collection. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1249. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01249>
- Clegg, S., & Murphy, C. N. (2016). Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, *4*(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012>
- Denning, D. W., Kilcoyne, A., & Ucer, C. (2020). *Non-infectious status indicated by detectable IgG antibody to SARS-CoV-2*. *229*(8), 521–524.
- Dubé, J., McIntosh, F., Zarruk, J. G., David, S., & Nigou, J. (2020). *Synthetic mycobacterial molecular patterns partially complete Freund 's adjuvant*. 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62543-5>
- El-Domany, R. A., Awadalla, O. A., Shabana, S. A., El-Dardir, M. A., & El-Domany, M. (2021). *Analysis of the Correlation Between Antibiotic Resistance Patterns and Virulence Determinants in Pathogenic Klebsiella pneumoniae Isolates from Egypt*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0236>
- Engels, N., & Wienands, J. (2018). Memory control by the B cell antigen receptor. *Immunological Reviews*, *283*(1), 150–160. <https://doi.org/10.1111/imr.12651>
- Enterotoxin, H., Klipstein, F. A., Engert, R. F., & Houghten, R. A. (1983). *Immunological Properties of Purified Klebsiella pneumoniae*. *42*(2), 838–841.
- Erickson, R. L., Terzi, M. C., Jaber, S. M., Hankenson, F. C., McKinstry-Wu, A., Kelz, M. B., & Marx, J. O. (2016). Intraperitoneal Continuous-Rate Infusion for the Maintenance of Anesthesia in Laboratory Mice (*Mus musculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, *55*(5), 548–557.
- Fernández-garcía, L., Blasco, L., Lopez, M., Bou, G., García-contreras, R., Wood, T., & Tomas, M. (2016). *Toxin-Antitoxin Systems in Clinical Pathogens*. 1–23. <https://doi.org/10.3390/toxins8070227>
- Ferrer-Gonzales, S., Penaloza, H. F., Budnick, J. A., Bain, W. G., Nordstrom, H. R., Lee, J. S., & Tyne, D. Van. (2021). Finding Order in the Chaos: Outstanding Questions in *Klebsiella*. *American Society For Microbiology*, *89*(4), 17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/IAI.00693-20>

- Follador, R., Heinz, E., Wyres, K. L., Ellington, M. J., Kowarik, M., Holt, E., & Thomson, N. R. (2016). *The diversity of Klebsiella pneumoniae surface polysaccharides*. *June*. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000073>
- Galeotti, C., Kaveri, S. V, & Bayry, J. (2017). IVIG-mediated effector functions in autoimmune and inflammatory diseases. *International Immunology*, *29*(11), 491–498. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx039>
- GEBA. (2019). *GeBA Gel-handbook*. Gene Bio-Application. www.geba.org
- Gomez-simmonds, A., & Uhlemann, A. (2017). *Clinical Implications of Genomic Adaptation and Evolution of Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae*. *215*(Suppl 1), 1–10. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw378>
- Gong, S., Ruprecht, R. M., Lobo, P. I., & Ruprecht, R. M. (2020). *Immunoglobulin M: An Ancient Antiviral Weapon – Rediscovered*. *11*(August), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01943>
- Gonzalez-Ferrer, S., Peñaloza, H. F., Budnick, J. A., Bain, W. G., Nordstrom, H. R., Lee, J. S., & Tyne, D. Van. (2021). Finding Order in the Chaos: Outstanding Questions in *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis. *Infection and Immunity*, *89*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:231871980>
- Greenfield, E. A. (2019a). Preparing and Using Adjuvants. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2019*(1). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot100214>
- Greenfield, E. A. (2019b). Routes of Antigen Injection in Mice and Rats. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2019*(6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot100230>
- Greenfield, E. A. (2020). Standard Immunization of Mice, Rats, and Hamsters. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2020*(3), 100297. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot100297>
- Gregory, R. L. (1986). Microbial ribosomal vaccines. *Reviews of Infectious Diseases*, *8*(2), 208–217. <https://doi.org/10.1093/clinids/8.2.208>
- Gutzeit, C. (2018). *The enigmatic function of IgD: some answers at last*. 1101–1113. <https://doi.org/10.1002/eji.201646547>
- Hasanah, A. (2017). EFEK JUS BAWANG BOMBAY (ALLIUM CEPA LINN.) TERHADAP MOTILITAS SPERMATOZOA MENCIT YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN (STZ). *Saintika Medika*, *11*, 92. <https://doi.org/10.22219/sm.v11i2.4203>

- Hernawati, S. (2017). Metodologi Penelitian dalam Bidang Kesehatan: Kuantitatif dan Kualitatif. *Forum Ilmiah Kesehatan (FORIKES)*.
- IOWA. (2023). *Anestesi (pedoman) penelitian hewan vertebrata*. <https://animal.research.uiowa.edu/iacuc-guidelines-anesthesia>
- Jin, J.-F., Zhu, L.-L., Chen, M., Xu, H.-M., Wang, H.-F., Feng, X.-Q., Zhu, X.-P., & Zhou, Q. (2015). The optimal choice of medication administration route regarding intravenous, intramuscular, and subcutaneous injection. *Patient Preference and Adherence*, 9, 923–942. <https://doi.org/10.2147/PPA.S87271>
- Juan, C., Fang, S., Chou, C., Tsai, T., & Lin, Y. (2020). *Clinical characteristics of patients with pneumonia caused by Klebsiella pneumoniae in Taiwan and prevalence of antimicrobial-resistant and hypervirulent strains: a retrospective study*. 1–8.
- Jung, B., & Hoilat, G. J. (2022). *MacConkey Medium*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557394/>
- Kalil, A. C., Metersky, M. L., Klompas, M., Muscedere, J., Sweeney, D. A., Palmer, L. B., Napolitano, L. M., & Grady, N. P. O. (2016). *Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society*. 63, 61–111. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw353>
- Karampatakis, T., Tsergouli, K., & Behzadi, P. (2023). *Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae: Virulence Factors, Molecular Epidemiology and Latest Updates in Treatment Options*. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antibiotics12020234>
- Keyt, B. A., Baliga, R., Sinclair, A. M., Carroll, S. F., & Peterson, M. S. (2020). *Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies*. Figure 1.
- Laing, K. (2019). *Bitesized Immunology: Pathogens & Disease*. <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/patógenos-y-enfermedades/immune-responses-bacteria>
- Lee, J. C., Lee, E. J., Lee, J. H., Jun, S. H., Choi, C. W., Kim, S. Il, Kang, S. S., & Hyun, S. (2012). *Induce the innate immune response*. 1987. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02549.x>
- Li, Y., Jin, L., & Chen, T. (2020). The Effects of Secretory IgA in the Mucosal Immune System. *BioMed Research International*, 2020, 2032057.

<https://doi.org/10.1155/2020/2032057>

- Liang, Z., Wang, Y., Lai, Y., & Zhang, J. (2022). *Host defense against the infection of Klebsiella pneumoniae : New strategy to kill the bacterium in the era of antibiotics ? November*, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1050396>
- Maeshima, N., & Fernandez, R. C. (2013). *Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex*. 3(February), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00003>
- Maibom-thomsen, S. L., Trier, N. H., Holm, B. E., Hansen, B., Rasmussen, M. I., Chailyan, A., Marcatili, P., Peter, H., & Id, G. H. (2019). *Immunoglobulin G structure and rheumatoid factor epitopes*. 1–28.
- Martiñón, S., Cisneros, A., Villicaña, S., Hernández-Miramontes, R., Mixcoha, E., & Calderón-Vargas, P. (2019). Chemical and Immunological Characteristics of Aluminum-Based, Oil-Water Emulsion, and Bacterial-Origin Adjuvants. *Journal of Immunology Research*, 2019. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:164489494>
- Martora, F., Pinto, F., Folliero, V., Cammarota, M., Dell, F., Squillaci, G., Galdiero, M., Morana, A., Schiraldi, C., Giovane, A., Galdiero, M., & Franci, G. (2019). Microbial Pathogenesis Isolation , characterization and analysis of pro-inflammatory potential of Klebsiella pneumoniae outer membrane vesicles. *Microbial Pathogenesis*, 136(September), 103719. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103719>
- Metlay, J. P., Waterer, G. W., Long, A. C., Anzueto, A., Brozek, J., Crothers, K., Cooley, L. A., Dean, N. C., Fine, M. J., Flanders, S. A., Grif, M. R., Metersky, M. L., & Musher, D. M. (2019). *AMERICAN THORACIC SOCIETY Diagnosis and Treatment of Adults with Community-acquired Pneumonia An Official Clinical Practice Guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America*. 200. <https://doi.org/10.1164/rccm.201908-1581ST>
- Michel, F. B., Dussourd D'Hinterland, L., Bousquet, J., Pinel, A. M., & Normier, G. (1978). Immuno-stimulation by a ribosomal vaccine associated with a bacterial cell wall adjuvant in humans. *Infection and Immunity*, 20(3), 760–769. <https://doi.org/10.1128/iai.20.3.760-769.1978>
- Mukai, K., Tsai, M., Starkl, P., Marichal, T., & Galli, S. J. (2016). IgE and mast cells in host defense against parasites and venoms. *Seminars in Immunopathology*, 38(5), 581–603. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0565-1>

- Murphy, K., & Weaver, C. (2016). *Janeway's Immunobiology*. Taylor & Francis Group.
- Mutiarahmi, C. N., Hartady, T., & Lesmana, R. (2021). *Kajian Pustaka : Penggunaan Mencit Sebagai Hewan Coba di Laboratorium yang Mengacu pada Prinsip Kesejahteraan Hewan*. 10(1), 134–145. <https://doi.org/10.19087/imv.2020.10.1.134>
- Natalia, C. O., Scott, M., & Deleo, F. R. (2022). *Innate Host Defense against Klebsiella pneumoniae and the Outlook for Development of Immunotherapies*. 167–181. <https://doi.org/10.1159/000518679>
- Opal, S. M., Scannon, P. J., Vincent, J. L., White, M., Carroll, S. F., Palardy, J. E., Parejo, N. A., Pribble, J. P., & Lemke, J. H. (1999). Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *The Journal of Infectious Diseases*, 180(5), 1584–1589. <https://doi.org/10.1086/315093>
- Opoku-temeng, C., Kobayashi, S. D., & Deleo, F. R. (2019). Klebsiella pneumoniae capsule polysaccharide as a target for therapeutics and vaccines. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 1360–1366. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.09.011>
- Opoku-Temeng, C., Malachowa, N., Kobayashi, S. D., & DeLeo, F. R. (2022). Innate Host Defense against Klebsiella pneumoniae and the Outlook for Development of Immunotherapies. *Journal of Innate Immunity*, 14(3), 167–181. <https://doi.org/10.1159/000518679>
- Pahal, P., Rajasurya, V., & Sharma, S. (2023). *Typical Bacterial Pneumonia*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534295/>
- Palmeira, P., Quinello, C., Silveira-Lessa, A. L., Zago, C. A., & Carneiro-Sampaio, M. (2012). IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clinical & Developmental Immunology*, 2012, 985646. <https://doi.org/10.1155/2012/985646>
- Panjaitan, N. S. D., Horng, Y.-T., Cheng, S. W., Chung, W.-T., & Soo, P.-C. (2019). EtcABC, a Putative EII Complex, Regulates Type 3 Fimbriae via CRP-cAMP Signaling in Klebsiella pneumoniae. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:195825069>
- Parrott, A. M., Shi, J., Aaron, J., Green, D. A., Whittier, S., & Wu, F. (2021). Detection of multiple hypervirulent Klebsiella pneumoniae strains in a New

York City hospital through screening of virulence genes. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 27(4), 583–589. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.012>

Paton, J. C., & Trappetti, C. (2019). Streptococcus pneumoniae Capsular Polysaccharide. *Microbiology Spectrum*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0019-2018>

Patro, L. P. P., & Rathinavelan, T. (2019a). Targeting the Sugary Armor of Klebsiella Species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 367. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00367>

Patro, L. P. P., & Rathinavelan, T. (2019b). *Targeting the Sugary Armor of Klebsiella Species*. 9(November). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00367>

Pietrzak, B., Tomela, K., & Olejnik-schmidt, A. (n.d.). *Secretory IgA in Intestinal Mucosal Secretions as an Adaptive Barrier against Microbial Cells*. 1–15.

Pleass, R. J., Moore, S. C., Stevenson, L., & Hviid, L. (2015). Immunoglobulin M : Restrainer of In fl ammation and Mediator of Immune Evasion by Plasmodium falciparum Malaria. *Trends in Parasitology*, xx, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.09.007>

Poerio, N., Olimpieri, T., Henrici De Angelis, L., De Santis, F., Thaller, M. C., D'Andrea, M. M., & Fraziano, M. (2022). Fighting MDR-Klebsiella pneumoniae Infections by a Combined Host- and Pathogen-Directed Therapeutic Approach. *Frontiers in Immunology*, 13, 835417. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.835417>

Regunath, H., & Oba, Y. (2024). *Community-Acquired Pneumonia*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430749/>

Riwu, K. H. P. R., Effendi, M. H., Rantam, F. A., Khairullah, A. R., & Widodo, A. (2022). A review: Virulence factors of Klebsiella pneumonia as emerging infection on the food chain. *Veterinary World*, 15(9): 217. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2172-2179>

Robert, D., Michel, S., Ivanoff, B., Cozzone, A. J., & Fontanges, R. (1981). On the immunogenicity of ribosomes and ribosomal proteins isolated from Klebsiella pneumoniae and Streptococcus pneumoniae. *Microbiology and Immunology*, 25(2), 183–194. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1981.tb00021.x>

- Rosen, D. A., Hilliard, J. K., Tiemann, K. M., Todd, E. M., Morley, S. C., & Hunstad, D. A. (2016). *Klebsiella pneumoniae* FimK Promotes Virulence in Murine Pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*, 213(4), 649–658. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv440>
- Sathe, A., & Cusick, J. K. (2022). *Biochemistry, Immunoglobulin M*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555995/>
- Sattar, S. B. A., & Sharma, S. (2023). *Bacterial Pneumonias*. Stat Pearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513321/>
- Sawa, T., Kinoshita, M., Inoue, K., Ohara, J., & Moriyama, K. (2019a). *Immunoglobulin for Treating Bacterial Infections : One More Mechanism of Action*. 2, 1–13.
- Sawa, T., Kinoshita, M., Inoue, K., Ohara, J., & Moriyama, K. (2019b). Immunoglobulin for Treating Bacterial Infections: One More Mechanism of Action. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/antib8040052>
- Schroeder, H. W. J., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S41-52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- Schwartz, C., Eberle, J. U., & Voehringer, D. (2016). Basophils in inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 778, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.04.049>
- Shan, M., Carrillo, J., Yeste, A., Berin, M. C., Chen, K., & Cerutti, A. (2018). *Secreted IgD Amplifies Humoral T Helper 2 Cell Responses by Binding Basophils via Galectin-9 Article Secreted IgD Amplifies Humoral T Helper 2 Cell Responses by Binding Basophils*. 709–724. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.013>
- Sharma, A. K., Dhasmana, N., Dubey, N., & Kumar, N. (2016). Bacterial Virulence Factors : Secreted for Survival. *Indian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0625-1>
- Silago, V. (2021). *Beta-lactam antibiotics and extended spectrum beta-lactamases*. 09(02), 15–24.
- Sinanjung, K., Nirwati, H., & Aman, A. T. (2020). Extended spectrum beta lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates and its

susceptibility pattern to antibiotics at Dr. Soeradji Tirtonegoro General Hospital Klaten, Central Java. *Journal of Thee Medical Sciences (Berkala Ilmu Kedokteran)*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:213852423>

- Singh, B. R., & Sharma, V. D. (2001). *Potential of Klebsiella pneumoniae cytotoxin toxoid as vaccine against klebsiellosis in rabbits and mice*. *19*, 4505–4510.
- Sorensen, R. U., & Moore, C. (2000). Antibody deficiency syndromes. *Pediatric Clinics of North America*, *47*(6), 1225–1252. [https://doi.org/10.1016/s0031-3955\(05\)70269-8](https://doi.org/10.1016/s0031-3955(05)70269-8)
- Soulas, C, Baussant, T., Aubry, J. P., Delneste, Y., Barillat, N., Caron, G., Renno, T., Bonnefoy, J. Y., & Jeannin, P. (2000). Outer membrane protein A (OmpA) binds to and activates human macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *165*(5), 2335–2340. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2335>
- Soulas, Caroline, Baussant, T., Aubry, J., Delneste, Y., Barillat, N., Caron, G., Renno, T., & Bonnefoy, J. (2000). *Cutting Edge : Outer Membrane Protein*.
- Sousa-pereira, P. De, & Woof, J. M. (2019). *IgA : Structure , Function , and Developability*. *2*(1).
- Statistik, B. P. (2022). *Jumlah Jenis Penyakit Malaria, TB Paru, Pneumonia, Kusta Menurut Kabupaten/Kota di Provinsi Jawa Timur, 2022*. <https://jatim.bps.go.id/id/statistics-table/1/MzAwMSMx/jumlah-jenis-penyakit-malaria--tb-paru--pneumonia--kusta-menurut-kabupaten-kota-di-provinsi-jawa-timur--2022.html>
- Suswati, E., Agustina, D., & Shodikin, M. A. (2022). Kadar Sekresi IL-10 Hepar Mencit Galur BALB/c Setelah Pemberian Protein Pili 65,5 kDa Klebsiella pneumoniae Title. *Biotek Medisiana Indonesia*, *2*.
- Sutton, B. J., Davies, A. M., Bax, H. J., & Karagiannis, S. N. (2019). *IgE Antibodies : From Structure to Function and Clinical Translation*. <https://doi.org/10.3390/antib8010019>
- Taeye, S. W. De, Rispens, T., & Vidarsson, G. (2019). *The Ligands for Human IgG and Their Effector Functions*. *14*, 1–18.
- Tamma, P. D., Aitken, S. L., Bonomo, R. A., Mathers, A. J., van Duin, D., & Clancy, C. J. (2021). Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing Enterobacterales

(ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P. *aeruginosa*). *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 72(7), 1109–1116. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab295>

Tripathi, N., & Sapra, A. (2023). *Gram Staining*. StatPearls.

Usach, I., Martinez, R., Festini, T., & Peris, J.-E. (2019). Subcutaneous Injection of Drugs: Literature Review of Factors Influencing Pain Sensation at the Injection Site. *Advances in Therapy*, 36(11), 2986–2996. <https://doi.org/10.1007/s12325-019-01101-6>

Vaillant, J. A. A., Jamal, Z., Patel, P., & Ramphul, K. (2023). *Immunoglobulin*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513460/>

Vaillant, J. A. A., Sabir, S., & Jan, A. (2024). *Physiology, Immune Response*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539801/>

Valor, L., & Torre, I. De. (2013). *Understanding the Immunogenicity Concept & Comprender el concepto de inmunogenicidad*. 9(1), 1–4.

Vardhmaan, J., Vashist, R., Yilmaz, G., & Bhardwaj, A. (2023). *Pneumonia Pathology*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526116/>

Vasilev, N., Smales, C. M., Schillberg, S., Fischer, R., & Schiermeyer, A. (2016). Developments in the production of mucosal antibodies in plants. *Biotechnology Advances*, 34(2), 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.11.002>

Wang, Y., Zhang, Q., Jin, Y., Jin, X., Yu, J., & Wang, K. (2019). Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichiacoli* in China. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(3), 669–675. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00081-7>

Wassenaar, T. M., & Zimmermann, K. (2018). Lipopolysaccharides in Food, Food Supplements, and Probiotics: Should We be Worried? *European Journal of Microbiology & Immunology*, 8(3), 63–69. <https://doi.org/10.1556/1886.2018.00017>

Witkowska, D., Mieszala, M., Gamian, A., Staniszewska, M., Czarny, A., Przondomordarska, A., Jaquinod, M., & Forest, E. (2005). *Major structural proteins of type 1 and type 3 Klebsiella fimbriae are effective protein carriers and*

immunogens in conjugates as revealed from their immunochemical characterization. 45, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.04.005>

Wodi, P. A., & Valerie, M. (2024). *Principles of Vaccination*. Center For Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/pinkbook/hcp/table-of-contents/chapter-1-principles-of-vaccination.html>

Woof, J. M., Kerr, M. A., & Medical, D. (2004). *IgA function – variations on a theme.* 175–177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01958.x>

Zhu, J., Wang, T., Chen, L., & Du, H. (2021). *Virulence Factors in Hypervirulent Klebsiella pneumoniae.* 12(April), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642484>

Zilberberg, M. D., Nathanson, B. H., Puzniak, L., & Shorr, A. F. (2021). Descriptive Epidemiology and Outcomes of Nonventilated Hospital-Acquired, Ventilated Hospital-Acquired, and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia in the United States, 2012–2019. *Critical Care Medicine*, 50, 460–468. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:237555860>

LAMPIRAN

Lampiran 1 Rumus Dosis Injeksi

d. Kelompok Kontrol (KK)

PBS 200 μ L

e. Kelompok Adjuvan (KA)

Volume PBS = 100 μ L

Volume CFA/IFA = 100 μ L

f. Kelompok Perlakuan (KP)

Konsentrasi protein = 0,64 gr/dL = 6400 μ g/mL

Volume antigen

$$\frac{\text{Konsentrasi protein}}{1} = \frac{\text{antigen}}{x}$$

$$\frac{6400}{1} = \frac{50}{x}$$

$$x = \frac{6400}{50}$$

$$x = 0,0078 \text{ mL}$$

$$x = 0,008 \text{ mL}$$

$$x = 8 \mu\text{L}$$

Volume PBS

$$V \text{ Campuran PBS + Antigen} = \text{Volume PBS} - \text{Volume antigen}$$

$$\text{Volume PBS} = 100 \mu\text{L} - 8 \mu\text{L}$$

$$\text{Volume PBS} = 92 \mu\text{L}$$

Volume CFA/IFA

$$\text{Volume Total} = \text{Volume CFA/IFA} - \text{Volume Campuran}$$

$$200 \mu\text{L} = \text{Volume CFA/IFA} - \text{Volume Canpuran}$$

$$\text{Volume CFA/IFA} = 200 \mu\text{L} - 100 \mu\text{L}$$

$$\text{Volume CFA/IFA} = 100 \mu\text{L}$$

Lampiran 2 (Etik Penelitian)



KEMENTERIAN PENDIDIKAN TINGGI, SAINS,
DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)
Jalan Kalimantan 37, Kampus TegalBoto, Jember 68121
Telepon: (0331) 324446,337877, Faksimile: (0331) 324446
Laman: fk.unej.ac.id, Email: fk@unej.ac.id, Email: kepk.fk@unej.ac.id

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK *ETHICAL APPROVAL*

Nomor:5228...../UN25.1.10.2/KE/2024

Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

Analisis Perubahan Kadar Immunoglobulin-G Serum Pascainjeksi Protein Pili 65,5 Kda Klebsiella Pneumoniae Mencit Galur Balb/C: Studi Eksperimental Vaksin Pneumonia

Analysis Of Changes In Serum Immunoglobulin-G Levels Post Injection Of Pili Protein 65,5 Kda Klebsiella Pneumoniae Balb/C Strain Mice: Experimental Study Pneumonia Vaccine

Peneliti Utama : Priska Liana Lutianto
Name of the principal investigator
NIM/NIP : 212010101088
Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Masa berlaku persetujuan etik ini 1 tahun
The validity period of this ethical approval is 1 year

05 DEC 2024
Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Fakultas Kedokteran
Universitas Jember
Dr. Anji Munawaroh Aziz, M.Biomed
NIP. 198903132014042002

Lampiran 3 (Hasil Analisis Data)

1. Larutan Standar

Nama	Absorbansi	Konsentrasi
STD 1	0,317	0,847
STD 2	0,262	0,893
STD 3	0,193	3,205
STD 4	0,124	4,517
Blank	0,123	4,536

2. Kelompok Kontrol (KK)

Nama	Absorbansi	Konsentrasi
1	0,384	0,426
2	0,352	0,183
3	0,393	0,597
4	0,379	0,331
5	0,358	0,068
6	0,348	0,259
7	0,355	0,125
8	0,324	0,715

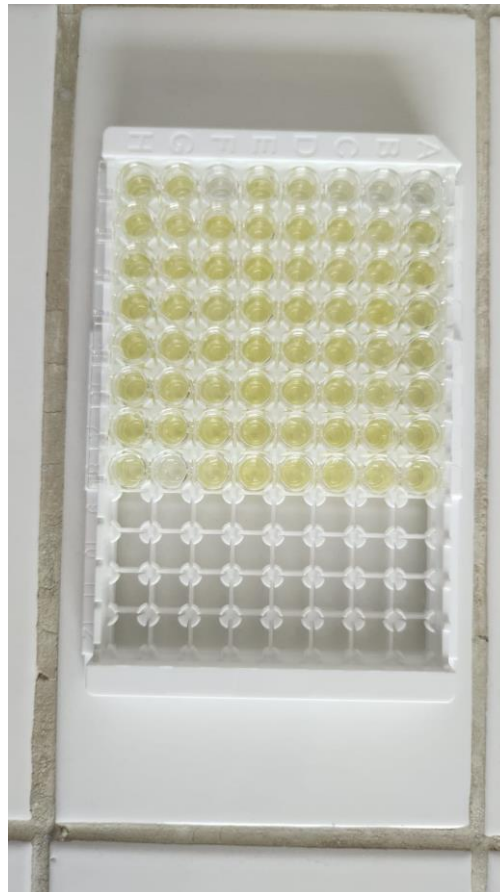
3. Kelompok Adjuvan (KA)

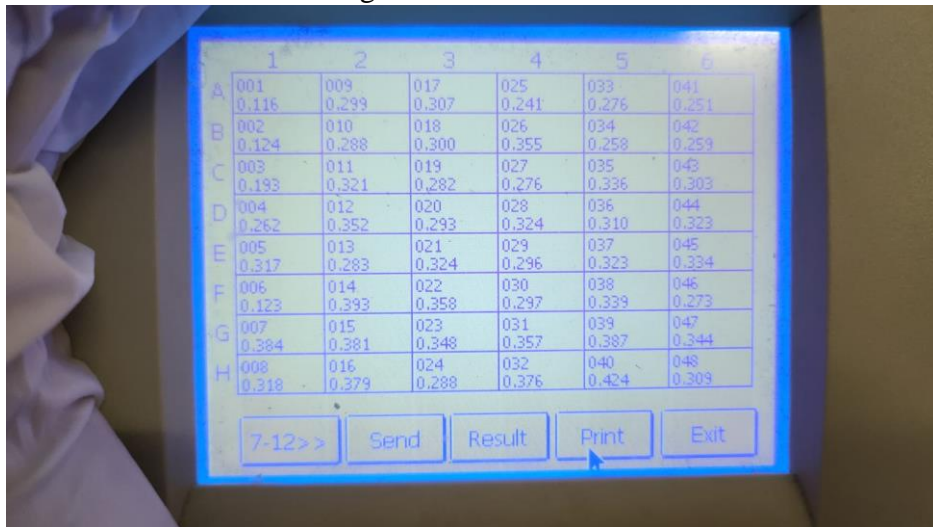
Nama	Absorbansi	Konsentrasi
1	0,296	1,247
2	0,376	0,274
3	0,258	1,970
4	0,336	0,981
5	0,323	0,734
6	0,424	1,186
7	0,259	1,951
8	0,323	1,114

4. Kelompok Perlakuan (KP)

Nama	Absorbansi	Konsentrasi
1	0,273	1,684
2	0,267	1,798
3	0,277	1,608
4	0,289	1,380
5	0,312	0,943
6	0,286	1,437
7	0,307	1,038
8	0,261	1,913

5. Proses Pengerjaan ELISA



6. Pembacaan Absorbansi dengan *ELISA reader*

	1	2	3	4	5	6
A	001 0.116	009 0.299	017 0.307	025 0.241	033 0.276	041 0.251
B	002 0.124	010 0.288	018 0.300	026 0.355	034 0.258	042 0.259
C	003 0.193	011 0.321	019 0.282	027 0.276	035 0.336	043 0.303
D	004 0.262	012 0.352	020 0.293	028 0.324	036 0.310	044 0.323
E	005 0.317	013 0.283	021 0.324	029 0.296	037 0.323	045 0.334
F	006 0.123	014 0.393	022 0.358	030 0.297	038 0.339	046 0.273
G	007 0.384	015 0.381	023 0.348	031 0.357	039 0.387	047 0.344
H	008 0.318	016 0.379	024 0.288	032 0.376	040 0.424	048 0.309

7-12 >> Send Result Print Exit

Lampiran 4 (Dokumentasi Penelitian)



Gambar 1. Aklimatisasi Hewan Coba Selama 7 Hari



Gambar 2. Randomisasi



Gambar 3. Rumatan Mencit



Gambar 4. Persiapan Substan yang Kemudian Diinjeksikan Secara Intraperitoneal



Gambar 6. Terminasi Hewan Coba



Gambar 8. Proses Sentrifugasi Sampel Darah



Gambar 9. Pengukuran IgG dengan Metode ELISA