



**KADAR SEKRESI IL-10 HEPAR MENCIT GALUR BALB/C  
SETELAH PEMBERIAN PROTEIN PILI 65,5 KDA**

*Klebsiella pneumoniae*

**SKRIPSI**

Oleh

**Tio Wisnu Pradana Putra  
182010101121**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2022**



**KADAR SEKRESI IL-10 HEPAR MENCIT GALUR BALB/C  
SETELAH PEMBERIAN PROTEIN PILI 65,5 KDA  
*Klebsiella pneumoniae***

**SKRIPSI**

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

Oleh

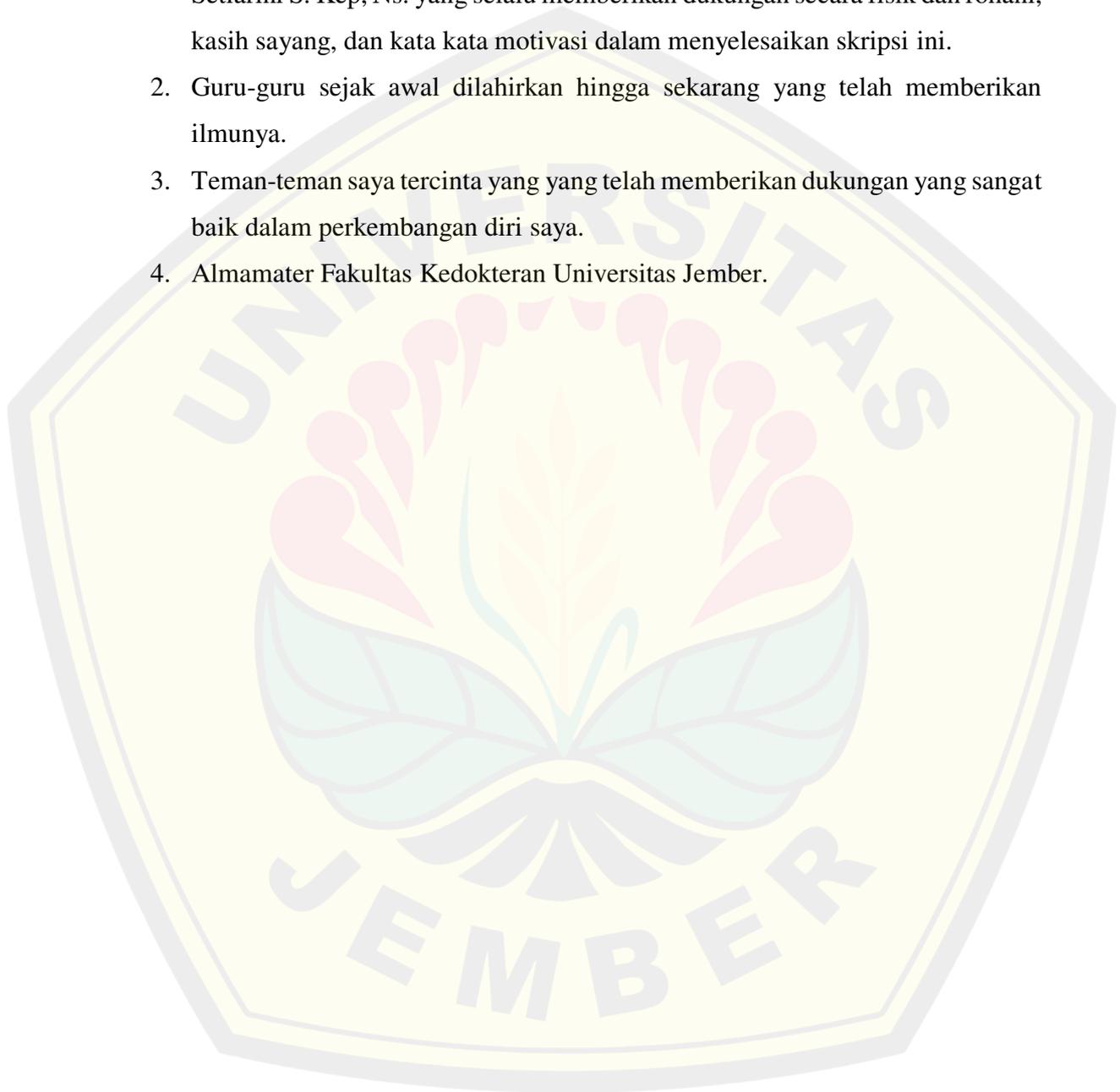
**Tio Wisnu Pradana Putra  
182010101121**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2022**

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Orang tua saya tercinta, Ayahanda Luki Tiasanto S. Kep, Ns., dan Ibunda Anis Setiarini S. Kep, Ns. yang selalu memberikan dukungan secara fisik dan rohani, kasih sayang, dan kata kata motivasi dalam menyelesaikan skripsi ini.
2. Guru-guru sejak awal dilahirkan hingga sekarang yang telah memberikan ilmunya.
3. Teman-teman saya tercinta yang telah memberikan dukungan yang sangat baik dalam perkembangan diri saya.
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



**MOTO**

*“Sejatine urip kuwi mung sawang sinawang.”*

(Peribahasa Bahasa Jawa)\*)



---

\*) Daryanto S.S. 2005. Kawruh Basa Jawa Pepak. Surabaya: APOLLO.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Tio Wisnu Pradana Putra

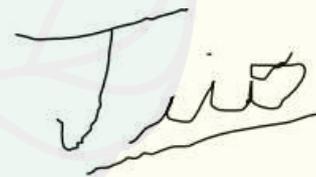
NIM : 182010101121

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Kadar Sekresi Il-10 Hepar Mencit Galur BALB/C setelah Pemberian Protein Pili 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan 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 ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 4 Maret 2022

Peneliti,



Tio Wisnu Pradana Putra  
(182010101121)

**SKRIPSI**

**KADAR SEKRESI IL-10 HEPAR MENCIT GALUR BALB/C  
SETELAH PEMBERIAN PROTEIN PILI 65,5 KDA  
*Klebsiella pneumoniae***

Oleh  
**Tio Wisnu Pradana Putra**  
NIM 182010101121

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. dr. Enny Suswati, M. Kes.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Ika Rahmawati Sutejo, M. Biotech

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Kadar Sekresi IL-10 Hepar Mencit Galur BALB/C setelah Pemberian Protein Pili 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Jumat, 04 Maret 2022

tempat : Via Daring Online

**Tim Penguji:**

Ketua,

Anggota I,

dr. Dini Agustina, M. Biomed  
NIP 19830801 200812 2 003

dr. Ayu Munawaroh A., M. Biomed  
NIP 19890313 201404 2 002

Anggota II,

Anggota III,

Dr. dr. Enny Suswati, M. Kes  
NIP 19700214 199903 2 001

dr. Ika Rahmawati S., M. Biotech  
NIP 19840819 200912 2 003

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

dr. Supangat, M. Kes, Ph. D, Sp.BA  
NIP. 19730424 199903 1 002

## RINGKASAN

**KADAR SEKRESI IL-10 HEPAR MENCIT GALUR BALB/C SETELAH PEMBERIAN PROTEIN PILI 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae***; Tio Wisnu Pradana Putra; 182010101121; 2022; 65 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember

*Klebsiella pneumoniae* termasuk genus *Klebsiella* dalam famili *Enterobacteriaceae*, yang menjadi flora normal kulit dan mulut namun *K. pneumoniae* sering ditemukan sebagai penyakit nosokomial di rumah sakit. *K. pneumoniae* termasuk bakteri mudah resisten terhadap antibiotik dikarenakan memiliki enzim *Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase*. Tingkat kematian akibat bakteri ini mencapai 28,3% dan terus meningkat. Lembaga FDA (*Food and Drug Administration*) belum mengeluarkan vaksin berlisensi sebagai langkah preventif menghindari infeksi *K. pneumoniae*. Penelitian ini menggunakan organel protein pili *K. pneumoniae*. Reaksi imun ini dapat diukur dengan melihat peningkatan kadar *Interleukin-10* sebagai protein resolusi pasca infeksi sehingga tujuan penelitian menemukan hubungan peningkatan kadar IL-10 hepar terhadap paparan protein pili *K. pneumoniae* pada mencit.

Variabel penelitian ini adalah kadar IL-10 pada hepar mencit dan kadar konsentrasi protein pili 65,5 kDa *K. pneumoniae* pada setiap kelompok. Uji analisis korelasi penelitian ini menggunakan uji korelasi *One way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Penelitian ini menggunakan 21 sampel hepar yang dibagi dalam 3 kelompok. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol dengan pemberian PBS, kelompok kedua adalah kelompok perlakuan dengan pemberian protein pili, dan kelompok ketiga adalah kelompok adjuvan dengan pemberian CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) dan IFA (*Incomplete Freund's Adjuvant*). Sampel hepar diproses dengan menggunakan *Sandwich ELISA*.

Hasil penelitian menunjukkan peningkatan kadar IL-10 pada kelompok perlakuan yang diberikan protein pili 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae*. Data juga menunjukkan perbedaan mean total setiap kelompok pada kadar IL-10 setelah pemberian protein pili *K. pneumoniae* ( $p=0,008$ ). Kelompok perlakuan memiliki mean kadar IL-10 tertinggi sehingga terdapat hubungan peningkatan antara paparan protein pili dengan kadar IL-10 pada mencit secara data kasar. Perbandingan peningkatan IL-10 antar kelompok tertinggi dimulai dari kelompok perlakuan, kelompok kontrol, lalu kelompok adjuvan. Peningkatan kadar IL-10 signifikan terdapat pada kelompok perlakuan dibanding kelompok adjuvan dan terdapat peningkatan rata-rata kadar IL-10 pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol meskipun secara statistik peningkatan tidak berbeda dan hubungan peningkatan secara signifikan. Perlu dilakukan penelitian tentang efek samping dan sifat imunogenik protein pili 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae* pada mencit galur BALB/c.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah Subhanahu wa Ta'ala karena atas limpahan rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Kadar Sekresi IL-10 Hepar Mencit Galur BALB/C setelah Pemberian Protein Pili 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae*”. Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

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

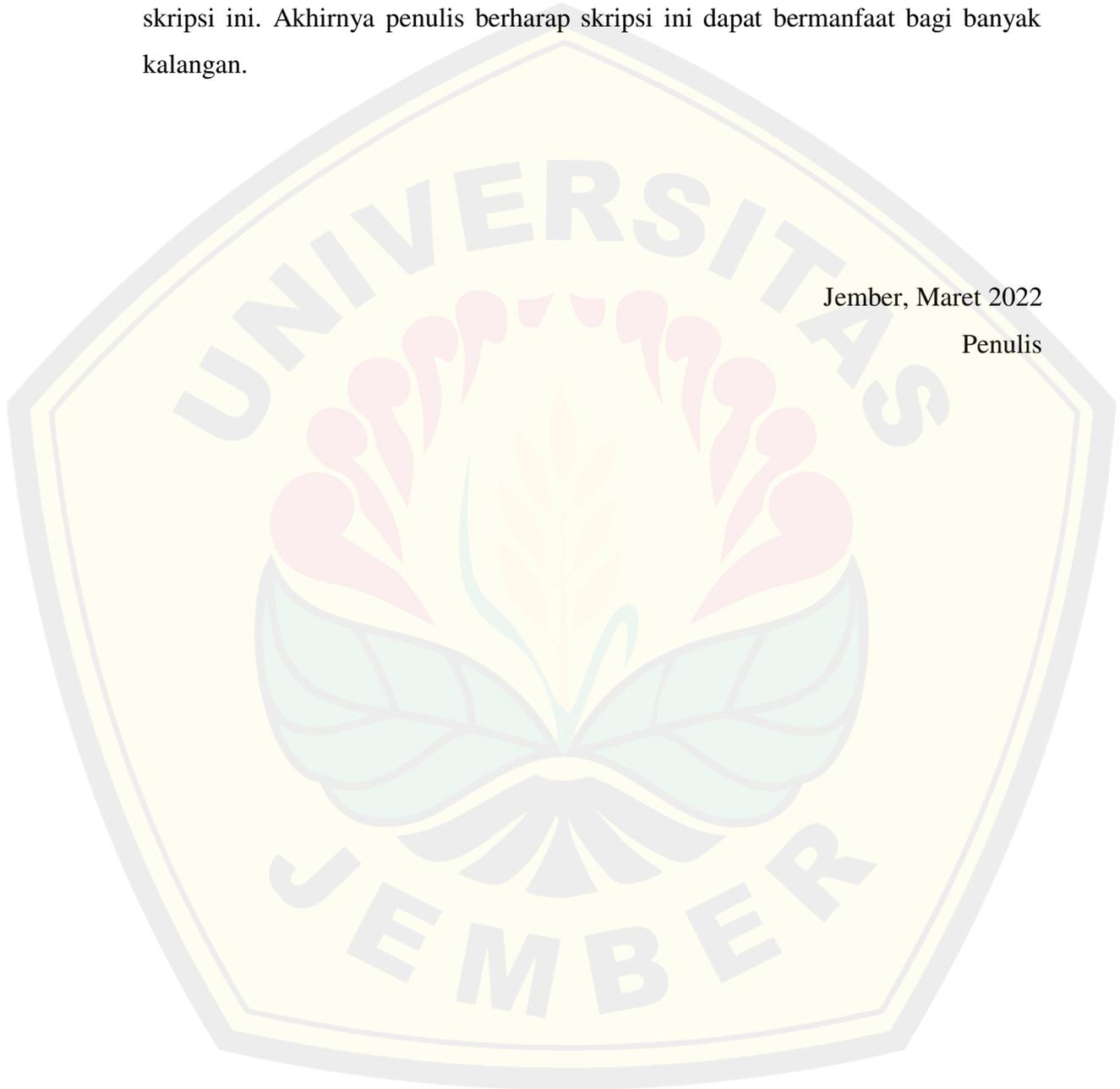
1. Kedua orang tua saya Ayah Luki Tiasanto, S. Kep., Ns., dan Ibunda Anis Setiarini, S. Kep., Ns. beserta adik-adik saya Anky Cahyo Mahendra Putra dan Luanita Aisyah Putri yang telah memberikan doa dan dukungan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik;
2. dr. Supangat, M. Kes., Ph.D., Sp.BA. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah memberikan bimbingan dan bantuan dalam menempuh pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
3. Dr. dr. Enny Suswati M Kes. selaku dosen pembimbing utama dan dr. Ika Rahmawati Sutejo, M. Biotech. selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing saya selama penulisan skripsi ini;
4. dr. Dini Agustina M. Biomed. selaku dosen penguji I dan dr. Ayu Munawaroh Aziz, M. Biomed. selaku dosen penguji II yang telah memberikan saran dan masukan sehingga naskah skripsi ini dapat terselesaikan;
5. Guru-guru saya di jenjang SD, SMP, dan SMA, serta dosen-dosen di Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah memberikan ilmu terbaiknya selama ini;
6. Sahabat seperjuangan saya Nexia Nevarachell O.A. yang selalu membantu dalam keadaan apapun;
7. Samudra dan Ajeng teman kelompok penelitian;
8. Dava, Faliq, Arif, dan Ucup teman yang selalu memberikan dukungan;

9. Rekan-rekan sejawat Cranium, mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember angkatan 2018;
10. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna. Oleh karena itu penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi banyak kalangan.

Jember, Maret 2022

Penulis



**DAFTAR ISI**

|  |      |
|--|------|
| HALAMAN SAMPUL .....   | i    |
| HALAMAN JUDUL.....   | ii   |
| HALAMAN PERSEMBAHAN.....                                     | iii  |
| HALAMAN MOTO.....  | iv   |
| HALAMAN PERNYATAAN .....                                     | v    |
| HALAMAN PEMBIMBINGAN .....                                   | vi   |
| HALAMAN PENGESAHAN.....                                      | vii  |
| RINGKASAN .....  | viii |
| PRAKATA.....   | ix   |
| DAFTAR ISI.....  | xi   |
| DAFTAR GAMBAR .....  | xiv  |
| DAFTAR TABEL.....  | xv   |
| BAB 1. PENDAHULUAN .....                                     | 1    |
| 1.1 Latar Belakang .....                                     | 1    |
| 1.2 Rumusan Masalah .....                                    | 3    |
| 1.3 Tujuan.....  | 3    |
| 1.3.1 Tujuan Umum .....                                      | 3    |
| 1.3.2 Tujuan Khusus.....                                     | 3    |
| 1.4 Manfaat.....   | 3    |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....                                | 5    |
| 2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....                       | 5    |
| 2.1.1 Anatomi <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....             | 5    |
| 2.2 Reaksi Imun IL-10 dan IFN- $\lambda$ .....               | 7    |
| 2.2.1 Interleukin-10.....                                    | 7    |
| 2.3 Vaksin.....  | 11   |
| 2.3.1 Pengenalan Vaksin .....                                | 11   |
| 2.3.2 Pengembangan Vaksin <i>Klebsiella pneumoniae</i> ..... | 12   |
| 2.4 ELISA.....   | 15   |
| 2.4.1 Pengenalan ELISA .....                                 | 15   |
| 2.4.2 Jenis-Jenis ELISA .....                                | 16   |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.5 Kerangka Teori.....  | 19        |
| 2.6 Kerangka Konseptual .....  | 20        |
| 2.7 Hipotesis Penelitian.....  | 21        |
| <b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>   | <b>22</b> |
| 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian .....   | 22        |
| 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian .....  | 22        |
| 3.3 Populasi dan Besar Sampel Penelitian .....                                     | 23        |
| 3.3.1 Populasi Penelitian .....  | 23        |
| 3.3.2 Sampel Penelitian .....  | 23        |
| 3.3.3 Besar Sampel Penelitian.....   | 23        |
| 3.4 Jenis dan Sumber Data .....  | 24        |
| 3.5 Variabel Penelitian .....  | 24        |
| 3.6 Definisi Operasional.....  | 24        |
| 3.7 Instrumen Penelitian.....  | 26        |
| 3.7.1 Alat .....   | 26        |
| 3.7.2 Bahan.....   | 26        |
| 3.8 Teknik Penyajian dan Analisis Data .....                                       | 26        |
| 3.9 Alur Penelitian.....   | 27        |
| 3.9.1 Uji Kelayakan Etik .....   | 27        |
| 3.9.2 Identifikasi Berat Molekul Protein Pili <i>K. pneumoniae</i> .....           | 27        |
| 3.9.3 Pemurnian dan Pengukuran Konsentrasi Protein Pili <i>K. pneumoniae</i> ..... | 28        |
| 3.9.4 Uji Hemaglutinasi .....  | 28        |
| 3.9.5 Induksi Mencit dengan Protein Pili .....                                     | 29        |
| 3.9.6 Pengukuran Kadar IL-10 Hepar dengan Metode <i>Sandwich</i> ELISA .....       | 30        |
| <b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>  | <b>32</b> |
| 4.1 Hasil Penelitian .....   | 32        |
| 4.1.1 Analisis Univariat.....  | 32        |
| 4.1.2 Analisis Statistik.....  | 35        |
| 4.2 Pembahasan.....  | 36        |
| <b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>  | <b>40</b> |
| 5.1 Kesimpulan .....   | 40        |

|     |                      |    |
|-----|----------------------|----|
| 5.2 | Saran .....          | 40 |
|     | DAFTAR PUSTAKA ..... | 41 |
|     | LAMPIRAN .....       | 46 |



**DAFTAR GAMBAR**

|  | Halaman |
|--|---------|
| 2.1 Patogenitas <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....   | 6       |
| 2.2 Adaptasi <i>K. pneumoniae</i> dalam Menghadapi Imun Inang.....                                   | 7       |
| 2.3 Diagram respons imun non-spesifik dan spesifik sesudah terserang mikroorganisme dan antigen..... | 8       |
| 2.4 Respon IL-10 dalam infeksi akut, persisten laten.....  | 10      |
| 2.5 Jenis-Jenis ELISA.....   | 16      |
| 2.6 Kerangka Teori.....  | 19      |
| 2.7 Kerangka Konseptual.....   | 20      |
| 3.1 Total Sampel Menggunakan <i>G power</i> .....  | 23      |
| 4.1 Kurva Larutan Standar.....   | 33      |
| 4.2 Mekanisme Stres dengan Sitokin.....  | 37      |

**DAFTAR TABEL**

|  | Halaman |
|--|---------|
| 3.1 Tabel Definisi Operasional.....  | 24      |
| 4.1 Data absorbansi dan konsentrasi larutan standar.....                               | 32      |
| 4.2 Data absorbansi dan konsentrasi IL-10 pada sampel hepar kelompok<br>Kontrol.....   | 33      |
| 4.3 Data absorbansi dan konsentrasi IL-10 pada sampel hepar kelompok<br>Perlakuan..... | 34      |
| 4.4 Data absorbansi dan konsentrasi IL-10 pada sampel hepar kelompok<br>Adjuvan.....   | 34      |
| 4.5 Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i> .....   | 35      |
| 4.6 Tes homogenitas.....   | 35      |
| 4.7 <i>One way Anova</i> .....   | 36      |
| 4.8 Uji <i>Post Hoc</i> .....  | 36      |

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Klebsiella pneumoniae* termasuk genus *Klebsiella* dalam famili *Enterobacteriaceae*, yang menjadi flora normal kulit dan mulut serta hidup bebas di tanah, air maupun tanaman. Penyakit yang sering disebabkan *K. pneumoniae* adalah infeksi saluran pernafasan, infeksi saluran kemih hingga sepsis. *K. pneumoniae* paling sering ditemukan sebagai penyakit nosokomial di rumah sakit (Dewi *et al.*, 2019). Sebanyak 477 pasien terdiagnosis infeksi *K. pneumoniae*, memiliki tingkat morbiditas tinggi ditandai masuknya pasien ke ICU sebanyak 63,3% dan tingkat kematian sebanyak 28,3%. *K. pneumoniae* merupakan penyumbang terbesar angka penyebab pneumoniae yaitu sebesar 56,25 % dibandingkan dengan *Streptococcus pneumoniae* (18,25 %) dan *Staphylococcus aureus* (12,5 %). Hal ini membuktikan infeksi *K. pneumoniae* merupakan masalah serius bagi kesehatan (Fasciana *et al.*, 2019).

*Klebsiella pneumoniae* termasuk bakteri mudah resisten terhadap antibiotik dikarenakan memiliki enzim *Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase* yang membuat bakteri ini beradaptasi terhadap antibiotik. Penelitian oleh Nirwati (2019) menemukan sebanyak 91 sampel dari 167 sampel (54,5%) *K. pneumoniae* merupakan jenis yang resisten terhadap berbagai jenis antibiotik atau *Multi Drug Resistance* (MDR). Penelitian oleh Thomas (2019) menyimpulkan penyebaran *K. pneumoniae* MDR menyebabkan abses pada hepar dan paru-paru sehingga meningkatkan angka morbiditas pasien. Selain menginfeksi hepar dan paru-paru, *K. pneumoniae* menginfeksi mata sehingga menyebabkan endoftalmitis. Infeksi *K. pneumoniae* yang resisten antibiotik di Indonesia relatif tinggi, terlihat dari penelitian tahun 2019 yang menyimpulkan sebanyak 112 dari 213 sampel *K. pneumoniae* resisten terhadap ampicilin dan 91 sampel resisten terhadap seftriakson (Virawan *et al.*, 2020). Penelitian oleh Osman (2019) juga menemukan tingkat kematian akibat sepsis pada 72 sampel oleh *K. pneumoniae* yang memproduksi  $\beta$ -laktamase. Penelitian sebelumnya membuktikan perlunya pencegahan yang

adekuat, salah satunya adalah vaksin terhadap *K. pneumoniae* (Nirwati *et al.*, 2019; Russo, 2019).

Pili *K. pneumoniae* berfungsi memfasilitasi adhesi pada sel eukariotik. Protein pili *K. pneumoniae* juga digunakan dalam berinteraksi dengan makrofag, pembentukan biofilm, dan agregasi bakteri. Menggunakan mekanisme tersebut, protein pili *K. pneumoniae* dapat memicu pembentukan imun tubuh inang (Arato *et al.*, 2021). *K. pneumoniae* menggunakan faktor virulensinya untuk melakukan kontaminasi dan replikasi. Hal ini menyebabkan *K. pneumoniae* membutuhkan inang untuk bertahan hidup (Dewi *et al.*, 2019). Proses kontaminasi *K. pneumoniae* melibatkan sistem imun seperti sitokin dan kemokin, mencakup TNF- $\alpha$ , IL-6, dan IL-10. Vaksin dari protein pili memiliki beberapa kelebihan yaitu tidak memiliki banyak sub tipe dan dimiliki oleh seluruh strain *K. pneumoniae* sehingga diharapkan vaksin jenis ini memiliki cangkupan yang luas (Joseph *et al.*, 2021).

Vaksin memanfaatkan sitokin sebagai respon kekebalan tubuh. Proses ini melalui hubungan timbal balik antara sitokin pro inflamasi (TNF- $\alpha$ ) dan anti inflamasi (IL-10). *K. pneumoniae* menginfeksi tubuh dan memicu IL-10 (Interleukin-10) melakukan *clearance* terhadap bakteri (Paczosa, 2016; Gonzalez *et al.*, 2021). IL-10 dihasilkan oleh sel Th2 (T helper 2) yang merupakan produsen dari sel B memori yang merupakan hasil akhir yang ingin dicapai dari vaksin. Sel B memori dapat mengingat antigen yang masuk pada masa mendatang sehingga dapat mengurangi penyebaran infeksi. Sel Th2 apabila merespon pengeluaran IL-10, maka sel Th2 juga merespon pada produksi sel B memori (Gonzalez *et al.*, 2021). IL-10 bersirkulasi melalui vaskuler dan deposit terbesar ditemukan pada lien dan hepar. Pemberian intraperitoneal juga memaksa sirkulasi obat untuk melewati vena porta hepatica sehingga detoksifikasi dari antigen dengan IL-10 serta ekskresi antigen dan antibodi akan berfokus pada hepar. Hepar menjadi pusat metabolisme dan detoksifikasi antigen protein pili *K. pneumoniae* menyebabkan pemeriksaan kadar IL-10 melalui ELISA pada hepar menjadi mudah. Oleh karena itu, IL-10 pada hepar dipilih menjadi parameter keberhasilan protein pili *K. pneumoniae* memicu pembentukan imun sebagai promotor vaksin (Produced *et al.*, 2019).

Belum ada vaksin *K. pneumoniae* yang berlisensi FDA (*Food and Drug Administration*) maupun BPOM. Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari penelitian sebelumnya yang menggunakan metode sama, namun dengan penggunaan berat massa protein pili berbeda, yaitu 38,6 kDa dengan pemeriksaan IL-10 melalui serum. Pemilihan 65,5 kDa dikarenakan pemeriksaan berat massa pili penelitian sebelumnya ditemukan band tertebal pada 65,5 kDa yang merupakan tanda berat molekul protein terbanyak, sehingga diharapkan efek pembentukan antibodi dapat maksimal. Beberapa pendekatan teraupetik berfokus pada pembentukan imun terbukti berhasil, sehingga peneliti berharap penelitian ini membuka jalan dalam pengembangan vaksin sebagai salah satu bentuk preventif memerangi infeksi *K. pneumoniae* (Arato *et al.*, 2021).

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah apakah terdapat peningkatan kadar IL-10 pada hepar mencit akibat pemberian protein pili *Klebsiella pneumoniae* 65,5 kDa secara intraperitoneal kepada mencit jantan galur BALB/c?

## 1.3 Tujuan

### 1.3.1 Tujuan Umum

Menemukan hubungan antara peningkatan kadar IL-10 hepar terhadap paparan protein pili *Klebsiella pneumoniae* pada mencit jantan galur BALB/c

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Untuk mengetahui perbandingan peningkatan kadar IL-10 yang ditimbulkan oleh pemberian protein pili *K. pneumoniae* pada masing-masing kelompok mencit.

## 1.4 Manfaat

Manfaat yang didapatkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Bagi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, diharapkan dapat digunakan sebagai data dasar atau pendukung apabila dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai vaksin *Klebsiella pneumoniae*.

2. Bagi akademisi kesehatan, diharapkan menjadi sumber informasi yang benar mengenai infeksi *Klebsiella pneumoniae* dan pembuatan vaksin berdasarkan reaksi imun akibat paparan protein pili *Klebsiella pneumoniae*.
3. Bagi peneliti, diharapkan dapat menjadi pengetahuan baru dan pengalaman dalam pembuatan vaksin *Klebsiella pneumoniae*.
4. Bagi pemerintah, diharapkan dapat menjadi rujukan atau sumber pustaka untuk membuat vaksin berlisensi sehingga dapat mengurangi infeksi *Klebsiella pneumoniae*.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Klebsiella pneumoniae*

#### 2.1.1 Anatomi *Klebsiella pneumoniae*

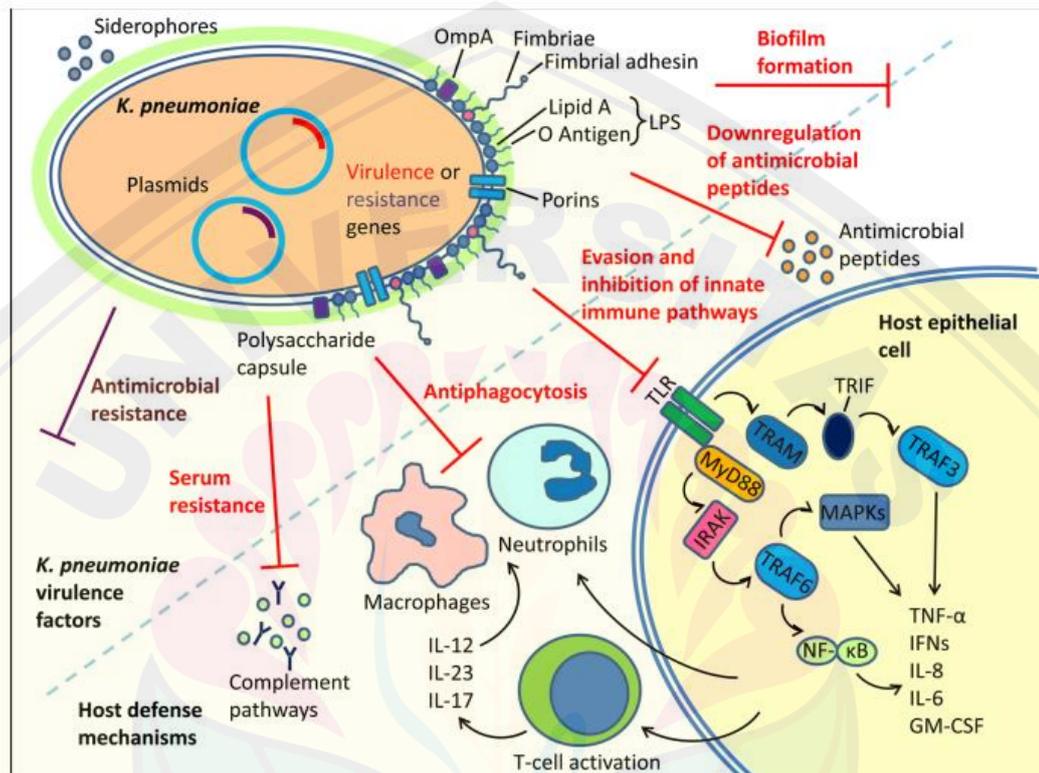
*Klebsiella pneumoniae* adalah bakteri gram negatif oportunistik penyebab *Healthcare Associated Infection (HAIs)*, seperti infeksi saluran kemih hingga pneumonia. Infeksi *HAIs* atau infeksi nosokomial sering terjadi pada negara miskin dan berkembang. *K. pneumoniae* termasuk penyebab terbanyak kasus infeksi nosokomial. Penyakit nosokomial yang paling sering disebabkan bakteri ini adalah pneumonia, infeksi saluran kemih, dan sepsis. Kemampuan bakteri ini menginfeksi sangat dipengaruhi oleh patogenitasnya (Paczosa, 2016).

*Klebsiella pneumoniae* membawa inti gen yang bertanggung jawab pada kemampuan patogenitas bakteri menyerang inang seperti manusia. Inti yang dimaksud adalah *K-antigen locus (cps locus)* dan *O-antigen locus (rfb locus)*. Inti lain seperti *fim* dan *mrk loci* bertanggung jawab untuk biosintesis pili tipe 1 dan 3 yang memediasi proses awal infeksi seperti adhesi, kolonisasi epitel inang, dan pembentukan biofilm (Assoni *et al.*, 2021). Pili *K. pneumoniae* juga memiliki fungsi lain, yaitu interaksi dengan makrofag, pembentukan biofilm, ketahanan organ dalam, dan agregasi bakteri. Pili merupakan tambahan ekstraseluler dengan panjang 0,5-10  $\mu\text{m}$  dengan lebar 2-8 nm (Huynh *et al.*, 2017).

#### 2.1.2 Patogenitas *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* menggunakan berbagai strategi untuk menghindari mekanisme imun sebagai bentuk virulensinya (Gambar 2.1). Secara umum, mekanisme ini memicu berbagai komponen respon imun, mulai dari imun bawaan memberi sinyal terhadap fagositosis hingga sistem imun yang bervariasi menurut strain dan tempat inokulasi. *K. pneumoniae* saat menembus pertahanan inang akan menemukan reseptor pengenalan pola yang diekspresikan oleh sel epitel dan sel imun. Sel-sel tersebut bertanggung jawab memulai kaskade pensinyalan proinflamasi dan perekrutan fagosit seperti neutrofil (Gambar 2.1). Reseptor ini merespons komponen dinding sel seperti LPS, fimbriae, serta DNA bakteri.

Pengikatan ligan di saluran pernafasan memicu jalur pensinyalan inang melalui MyD88 (*Myeloid Differentiation 88*) dan TRIF (*TIR domain-containing adapter inducing IFN $\beta$* ). Ligan mengarah pada aktivasi NF- $\kappa$ B dan *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs) yang selanjutnya memproduksi sitokin dan kemokin proinflamasi (Simmonds, 2017).

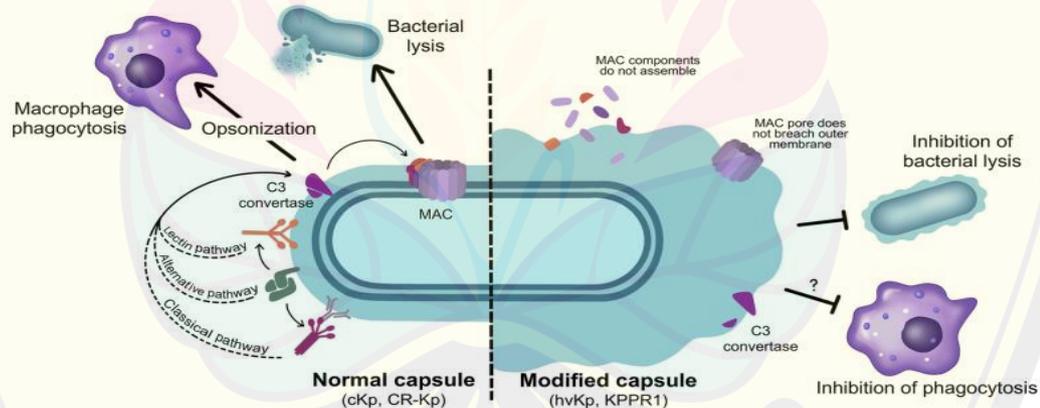


Gambar 2.1 Patogenitas *Klebsiella pneumoniae* (Sumber: Simmonds, 2017)

Mekanisme *K. pneumoniae* menghindari imun telah berkembang, termasuk pengenalan dan mematikan mediator sistem imun humoral dan sistemik. Sistem pertahanan imun bakteri ini melalui 2 jalur utama, yaitu jalur pertama adalah adhesi MAC (*Membrane Attack Complex*) yang terdiri dari protein C5b-C9 yang bertugas melisis membran bakteri. Jalur kedua menyebabkan imun tubuh melakukan opsonisasi dari permukaan sel bakteri untuk memfasilitasi fagositosis sel imun (Gonzalez *et al.*, 2021).

Ada 3 jalur yang memulai kaskade proteolitik dari sistem komplemen tubuh manusia, yaitu cara klasik, lektin, dan jalur alternatif. Ketiga jalur tersebut menyatu dalam formasi konversi C3 yang mengkoordinasi opsonisasi dan eliminasi

patogen. C3b pada imun bertugas untuk opsonisasi amino atau grup hidroksil pada permukaan sel patogen. Komponen klasik dimulai pemicuan kompleks C1 dengan pengikatan ke kompleks antigen antibodi. Jalur lektin diaktifkan jika fikolin, kolektin, dan *mannose binding lectin* (MBLs) inang mengenali dan berikatan dengan gula yang berada pada dinding *K. pneumoniae* seperti *D-mannose*. Jalur lektin bertujuan mengaktifkan *mannan-binding lectin and serin protease* (MASPs). Jalur alternatif mulai aktif saat kaskade proteolitik juga aktif dan berjalan pada kadar sangat rendah. Salah satu mekanisme utama *K. pneumoniae* untuk menghindari komplemen imun inang adalah modifikasi *capsular polysaccharide synthesis* (CPS). Alasan *K. pneumoniae* memodifikasi CPS dikarenakan memiliki fungsi menahan protein C9 untuk menembus membran bakteri. Penebalan dan modifikasi dari CPS juga menahan dari pengenalan *complement-activating surfaces molecules* seperti LPS, O-antigen, dan *Lectin-activating polysaccharide motifs* (Gonzalez *et al.*, 2021).



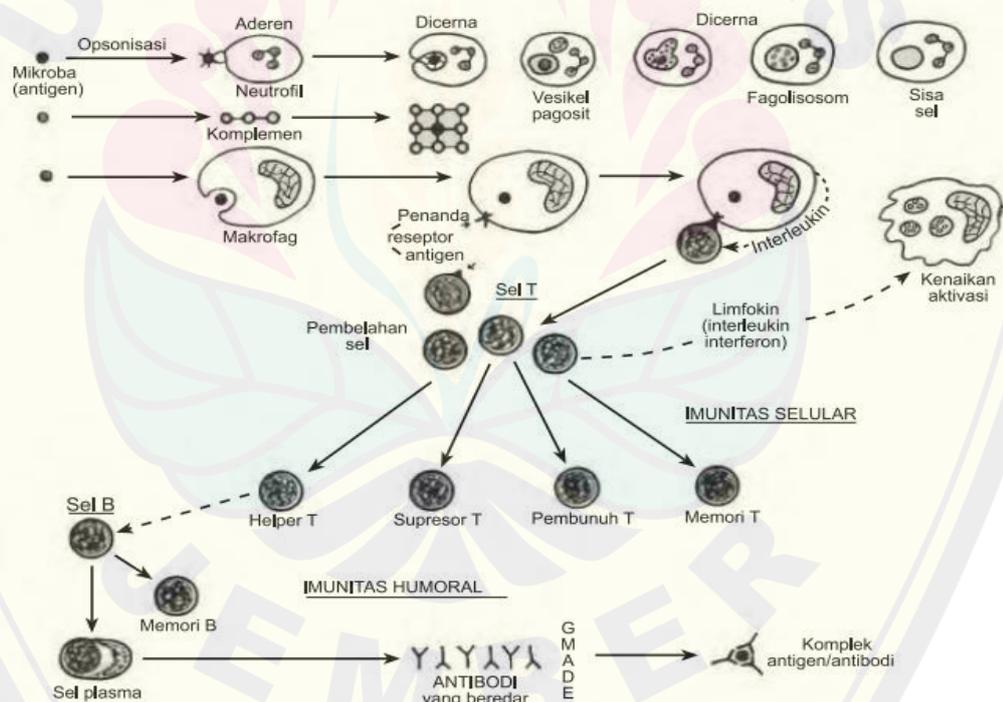
Gambar 2.2 Adaptasi *K. pneumoniae* dalam Menghadapi Imun Inang (Sumber: Gonzalez *et al.*, 2021)

## 2.2 Reaksi Imun IL-10 dan IFN- $\lambda$

### 2.2.1 Interleukin-10

IL-10 atau interleukin 10 merupakan turunan sitokin yang memegang peranan mengatur homeostasis, seperti pembersihan dari neutrofil pasca inflamasi akibat infeksi. Bakteri *K. pneumoniae* saat masuk ke dalam tubuh akan bertemu

dengan makrofag sebagai respon pertama terhadap antigen tubuh. Makrofag ditemplei dengan reseptor penanda atau MHC (*Major Histocompatibility Complex*) untuk ditemplei Sel T. MHC dibagi menjadi 2 tipe yaitu MHC tipe I dan tipe II yang memiliki fungsi berbeda, untuk tipe I ditemukan pada semua sel berinti dan tipe II merupakan sel imun sebagai penanda antigen. Sel T setelah mendapat respon MHC tipe II melakukan pembelahan menjadi T *helper*, T *supresor*, T *killer*, T memori. IL-10 mengatur jumlah dari sel T yang dilepaskan tubuh dan menghentikan proses imunitas. T *helper* mengkodekan sel B membentuk imunitas humoral yang membagi sel B menjadi 2, yaitu sel B memori dan sel plasma. Sel B memori menjadi pengingat apabila ada antigen yang masuk dan sel plasma mengedarkan antibodi ke dalam vaskuler darah (Sudiono, 2014). Penjelasan terkait dapat dilihat pada Gambar 2.3.

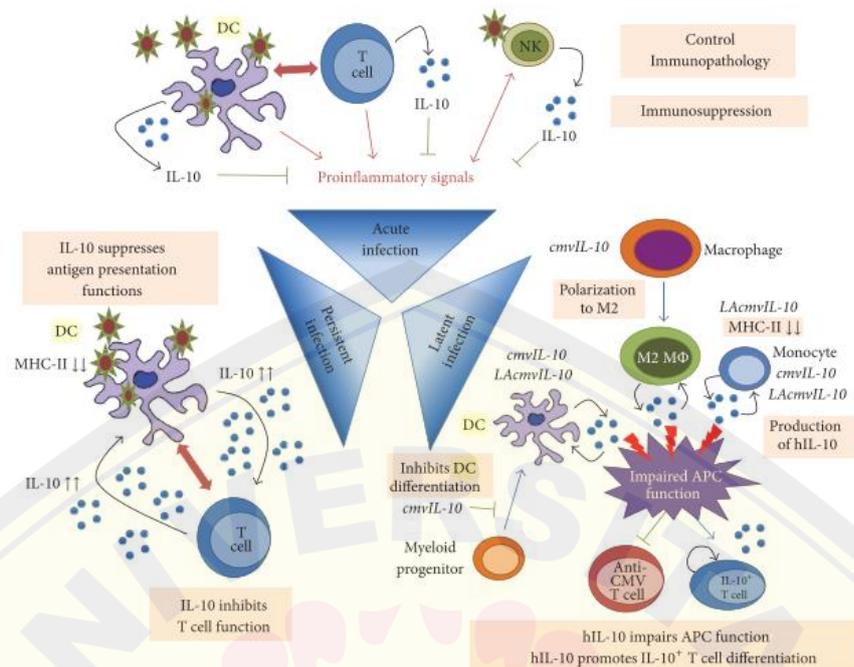


Gambar 2.3 Diagram respons imun non-spesifik dan spesifik sesudah terserang mikroorganisme dan antigen (Sumber: Sudiono, 2014)

Peningkatan IL-10 berguna untuk menghindari penarikan atau produksi neutrofil sebagai respon inflamasi pada tubuh saat terkena infeksi. Infeksi terjadi

karena peningkatan neutrofil *chemoattractant* yang berfungsi menaikkan kadar neutrofil dan IL-10 bertujuan menurunkan kadar neutrofil sebagai efek resolusi. Banyak faktor memengaruhi kadar IL-10 seperti STAT-1 (*Signal Transducer and Activator Of Transcription-1*) dan STAT-3 (*Signal Transducer and Activator Of Transcription-3*) yang meningkatkan kadar NOS<sub>2</sub> yang berguna untuk menekan *myeloid derived suppressor cell* pada sel T. Pada penelitian ini, IL-10 digunakan sebagai parameter infeksi yang diakibatkan oleh bakteri *K. pneumoniae* pada kasus pneumonia (Shantanam, 2018).

IL-10 dapat menyebabkan komplikasi karena aktivasi imun yang berlebihan. Untuk mencegah kerusakan jaringan inang, sitokin sebagai imunoregulator mengontrol besarnya respon imun. IL-10 berperan dalam infeksi virus. Selama infeksi akut, sinyal proinflamasi dihasilkan oleh sel dendritik setelah pengenalan dari patogen. Sel NK (*Natural Killer*) meningkatkan peradangan saat mengenali pola patogenitas dari antigen. DC (*Dendritic Cell*) dapat meningkatkan respons sel T. Aktivasi sel DC, sel T, dan sel NK menghasilkan produksi sitokin imunoregulator IL-10 untuk menyeimbangkan respon inflamasi. Ekspresi IL-10 mengontrol imunopatologi dan mengarah pada resolusi inflamasi dan respons sel T setelah patogen dibersihkan. Selama infeksi persisten, virus mengganggu produksi IL-10. Tingkat IL-10 yang tinggi yang dihasilkan oleh DC menekan kapasitas pengenalan antigen dan menyebabkan aktivasi sel T tidak efisien. Kehadiran antigen kronis menguras sel T dan menginduksi produksi IL-10. Oleh karena itu, sel T menjadi “toleran” terhadap antigen dan infeksi tetap berlanjut. Untuk membuat infeksi terus berlanjut, antigen menghasilkan homolog IL-10 yang mendukung respons anti-inflamasi. Homolog virus IL-10 menginduksi produksi IL-10 (hIL-10) manusia dalam sel myeloid yang berkontribusi pada penurunan fungsi sel penyaji antigen (APC). Untuk lebih lengkap dapat dilihat pada Gambar 2.4. Penelitian ini juga menunjukkan IL-10 mempunyai mekanisme *feedback negative* natural yang mengontrol inflamasi dan merawat homeostasis imun di perifer. Kekurangan IL-10 dapat menyebabkan penyakit autoimun (Rojas *et al.*, 2017).



Gambar 2.4 Respon IL-10 dalam infeksi akut, persisten laten (Sumber: Rojas *et al.*, 2017)

Sistem kekebalan mengenali pola molekuler terkait patogen dan merangsang produksi mediator inflamasi, termasuk ILS, komplemen, TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ), dan neutrofil. NF $\kappa$ B (*Nuclear Factor K-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells*) adalah faktor transkripsi inti berfungsi sebagai dimer dan tersebar luas pada organisme multiseluler. NF $\kappa$ B mengoordinasikan respon inflamasi dan diferensiasi sekaligus proliferasi sel yang terinfeksi *K. pneumoniae* (Cho *et al.*, 2017). Sel Kupffer, sel endotel kapiler, monosit, dan makrofag menghasilkan IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, MIP-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  untuk mengaktifkan jalur sinyal inflamasi. IL-1 $\beta$  dan TNF $\alpha$  adalah mediator inflamasi yang cepat dilepaskan untuk mengaktifkan kaskade reaksi inflamasi atau bahkan menginduksi syok endotoksin (Zhang *et al.*, 2018).

### 2.2.2 Interferon- $\lambda$

Interferon tipe 3 yang merujuk ke berbagai jenis seperti IFN- $\lambda$ , IFNL1, IL-28A/B, dan IL-29 dikenal sebagai kontributor penting pada perlindungan mukosa dan cara kerja yang sangat berkaitan dengan IL-10. Kelompok IFN sering berkaitan dengan infeksi virus meskipun IFN berkontribusi pada imun bawaan berbagai jenis patogen. Fungsi IFN pada infeksi bakteri sebagai bukti tubuh memberikan respon

patogen dengan mengeluarkan IFN tipe 3. Pensinyalan IFN- $\lambda$  sering tumpang tindih dengan IFN tipe I. Perbedaan penting dalam ekspresi IFN- $\lambda$ , yaitu pensinyalan IFN- $\lambda$  unik pada peradangan dan infeksi terutama pada infeksi influenza (Helen, 2019).

Induksi produksi IFN- $\lambda$  berkaitan dengan interferon tipe 1 yang memerlukan stimulasi endosom dari TLRs (*Toll-Like Receptors*). Interferon tipe 1 dan tipe 3 diproduksi dengan respon dari reseptor sel permukaan TLR 4. Reseptor permukaan sel lainnya seperti TLR 2 juga memicu ekspresi yang hampir sama meskipun ada perbedaan kadar ekspresi IFN- $\lambda$ . IFN- $\lambda$  diproduksi oleh epitel dan menjadi sistem perlindungan autonom. IFN- $\lambda$  memiliki fungsi meningkatkan pertahanan epitel. Pensinyalan IFN- $\lambda$  memicu peningkatan pengeluaran protein yang terkait dengan *cytoskeletal*, pengikatan aktin, dan depolimerisasi. IFN- $\lambda$  menargetkan pertahanan epitel, peningkatan permeabilitas, dan *downregulation* ekspresi dari protein *junctional*. Peningkatan ekspresi IFN- $\lambda$  berbarengan dengan jumlah monosit yang diambil dari sumsum tulang. Ketiadaan reseptor IFN- $\lambda$  cenderung menurunkan bakteremia dan *clearance K. pneumoniae*. Hal ini terjadi karena patogenitas IL-22 membantu kerja IFN- $\lambda$  sehingga respon yang dihasilkan juga hampir sama. Pada saat terjadi penurunan respon IFN- $\lambda$ , terjadi peningkatan kadar IL-22 darah yang menimbulkan efek penebalan epitel dan peningkatan ekspresi antimikroba (Ahn, 2020).

## 2.3 Vaksin

### 2.3.1 Pengenalan Vaksin

Vaksin inaktivasi berisi bakteri sudah dimatikan atau inaktivasi. Vaksin ini menyisakan sebagian debris bakteri untuk memicu imun tubuh. Usaha pertama membuat vaksin *K. pneumoniae* dengan bantuan formalin dan aseton pada tahun 1970. Vaksin pertama ini ditujukan mencegah infeksi saluran kemih akibat *K. pneumoniae*. Vaksin inaktivasi memiliki kelemahan yaitu pembentukan imun cenderung lebih lama dibandingkan vaksin aktif, disebabkan tubuh perlu mengenali organ bakteri yang disuntikan (Choi *et al.*, 2019).

Vaksin aktif menggunakan bakteri yang sudah dilemahkan atau masih bisa menginfeksi tapi dalam kadar yang sedikit. Penemuan vaksin *K. pneumoniae* yang

dilemahkan terjadi tahun 2008 melalui penyuntikan bakteri *K. pneumoniae* ke mencit yang akhirnya memicu respon IgG. Setelah itu dilakukan pengujian dengan disuntikan *K. pneumoniae* dosis sub letal dan mencit mampu bertahan hidup. Vaksin berbasis ribosom *K. pneumoniae* juga dikembangkan dengan proses pemberian melalui aerosol atau suntikan subkutan, mampu mencegah infeksi *K. pneumoniae* ke paru-paru (Yang, 2018).

### 2.3.2 Pengembangan Vaksin *Klebsiella pneumoniae*

#### a. Vaksin *K. pneumoniae* Keseluruhan

Pengembangan vaksin ini menggunakan sel bakteri *K. pneumoniae* baik dari bakteri yang dilemahkan, dimatikan ataupun ekstraksi dari bakterinya. Penelitian oleh Victoria (2016) dengan pemberian *K. pneumoniae* hipervirulen kepada mencit secara intraperitoneal menyebabkan penurunan absorpsi zat besi, kemudian meningkatkan pelepasan zat pemicu inflamasi sitokin seperti IL-6, CXCL1, IL-1 $\beta$  dan makrofag. Penelitian lain yang dilakukan oleh Lucas (2021) pada tikus model pneumonia yang diberikan *K. pneumoniae* yang sudah dimatikan (Assoni *et al.*, 2021). Pada model vaksin ini diberikan secara intranasal meningkatkan kadar IgG dan IgM. Penelitian pada tahun 1974 menggunakan MBV atau *Mixed Bacterial Vaccine* (*K. pneumoniae* dan *Streptococcus aureus*) ternyata mampu menurunkan tingkat keparahan penyakit dan menimbulkan imunitas jangka lama. Penelitian Ramirez pada tahun 2019 membuktikan *K. pneumoniae* yang sudah diinaktivasi dapat menurunkan rekurensi penyakit saluran kemih pada 784 sampel dengan minimum efek samping (Sevilla *et al.*, 2019; Assoni *et al.*, 2021).

#### b. Kapsul Polisakarida *Klebsiella pneumoniae*

Kapsul polisakarida terdiri dari oligosakarida linear dan bercabang yang berfungsi sebagai perlindungan fisik. Kapsul ini melindungi *K. pneumoniae* dari paparan komplemen dan makrofag tubuh. Fungsi lainnya adalah melindungi dari respon imun humoral, sulit dikenali oleh makrofag, menghindari opsonisasi, dan menghindari lisis zat peptida antimikroba (Paczosa, 2016; Martin, 2018).

Kapsul polisakarida sudah lama dikenal menjadi faktor virulensi *K. pneumoniae*. Vaksin *K. pneumoniae* berbasis kapsul polisakarida dikembangkan oleh *Swiss Serum and Vaccine Institute* melalui penelitian. Mereka mengambil lebih dari 700 sampel dari 13 rumah sakit di Benua Eropa dan Amerika Utara untuk mengukur tingkat virulensi dari macam-macam kapsul. Penelitian tersebut mendapatkan 24 serotipe hingga mewakili lebih dari 60 persen jumlah total *K. pneumoniae*. Beberapa serotipe ditoleransi oleh tubuh manusia dan juga 80 persen menghasilkan serum darah tahan pada percobaan *K. pneumoniae*. Tipe kapsul yang dikenal menjadi K-antigen dibagi menurut susunan gula, ikatan glikosida, dan bentukan epimerik. Berdasarkan pembagian tersebut, K-antigen dibagi menjadi 77 antigen. Jenis *K. pneumoniae* yang memiliki kapsul lebih tebal membuat sulit dikenali oleh makrofag dan cenderung lebih tahan terhadap antimikroba tubuh (Kunduru, 2016).

#### c. Lipopolisakarida

Lipopolisakarida atau disebut O-antigen merupakan salah satu faktor virulensi *K. pneumoniae* yang termasuk dalam jenis endotoksin. Lapisan ini ditemukan di bagian luar membran luar dan berperan melindungi dari peptida antimikroba (Adamo, 2018). *Klebsiella pneumoniae* memanfaatkan organel ini dengan keberagaman kapsul polisakarida dan lipopolisakarida agar tidak dikenali dari makrofag. Struktur LPS (Lipopolisakarida) terdiri dari lipid A, inti oligosakarida, dan O-antigen. Tidak seperti K-antigen, O-antigen hanya terdiri dari 11 serotipe dan 4 serotipe yang ditemukan pada kasus klinis. O-antigen terdiri dari *D-galactose*, *D-galactofuranose*, *D-mannose*, dan *N acetyl D glucomine sugar*. Penelitian vaksin jenis ini sudah sampai pada uji klinis tahap 2 (Clarke, 2018).

#### d. Outer membrane protein

*Outer mebrane protein* dapat ditemukan pada ekstraselular matriks *Klebsiella pneumoniae* terdiri dari adhesin protein untuk melindungi bakteri dari serangan makrofag dan cairan antimikroba. Susunan exopolisakarida kebanyakan disusun oleh *l-fucose*, *l-rhamnose*, dan *asam uronic*. Sampel yang telah diekstrasi

exopolisakaridanya menunjukkan terdapat keidentikan dengan O1 antigen yang membuktikan exopolisakarida dan lipopolisakarida bersinergi membentuk biofilm pada *K. pneumoniae*. Bagian ini menjadi kandidat vaksin karena aktif memicu CD4+, Th1, dan Th2. Ketahanan imun tubuh akhirnya dapat membentuk respon imun pada *K. pneumoniae* (Bellich *et al.*, 2018).

Vaksin yang termasuk OmpA (*Outer Membrane Protein A*) digabungkan dengan OmpK36 menyebabkan peningkatan sekresi IL-2 dan IFN $\gamma$ . Serum tikus yang diimunisasi mampu mencegah pembentukan biofilm bakteri secara *in vitro*. Meskipun hasil menggembirakan, antibodi yang menginduksi tikus menunjukkan reaktivitas silang dengan OMPs dalam strain *Enterobacteriaceae* sehingga menyebabkan efek tidak diinginkan pada mikrobiota inang (Babu *et al.*, 2017). Faktor virulensi yang penting terhadap perlekatan awal bakteri untuk menginfeksi inang adalah faktor adhesi yang melibatkan pili dan Outer Membrane Protein (OMP). OMP memiliki kemampuan melekat lebih kuat daripada pili. OMP jenis tertentu belum sepenuhnya diketahui keterlibatannya dalam menginfeksi inang, sedangkan pili dapat berikatan cukup spesifik. Secara umum OMP diketahui berperan dalam patogenitas sel inang pada bakteri gram negatif (Hussein *et al.*, 2018).

#### e. Fimbriae

Fimbriae dari *Klebsiella pneumoniae* terdiri dari 2 tipe yaitu tipe 1 dan tipe 3. Gen yang mengatur masing-masing tipe berbeda yaitu tipe 1 diatur oleh gen *fim* dan tipe 3 diatur oleh gen *mrk*. Tipe 1 berfungsi untuk adhesi ke epitel dan membran mukosa sedangkan pada tipe 3 memiliki fungsi pembentukan formasi biofilm. Bagian dari tipe fimbriae lain diduga hanya aksesoris (Gomez, 2020).

Fimbriae tipe 1 diekstraksi dari *K. pneumoniae* sedangkan tipe 3 diekstraksi dari *Klebsiella oxytoca* sebagai kandidat vaksin. Untuk tipe 3 dari *K. oxytoca* telah dievaluasi dan digunakan sebagai protein *carrier* dalam konjugasi dengan *Escherichia coli*. Kebanyakan respon imun ditujukan pada tipe 3 dikenal sebagai MrkA. Pada imunisasi dengan MrkA yang telah dimurnikan terjadi peningkatan IgG. MrkD gen merupakan gen yang mengontrol fimbriae yang bertugas sebagai

adhesi. Penelitian tersebut menunjukkan fimbriae dari *K. oxycota* memicu peningkatan kadar IL-6 dan IFN. Antibodi MrkD juga meningkat setelah pemberian tipe 1 dan tipe 3 konjugat pada mencit (Zandi, 2020).

#### f. Toksin *K. pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* memproduksi sekret toksin terutama golongan strain hipervirulen. Sekret toksin sangat berkaitan dengan faktor virulensi *K. pneumoniae* yang meningkatkan tingkat survivalitas pada saat terkena zat antimikroba. Penelitian yang dilakukan pada tahun 1983 oleh Klipstein menemukan pemberian enterotoksin *K. pneumoniae* membuat tikus bertahan dari *K. pneumoniae*. Toksin *K. pneumoniae* yang berasal dari sitotoksin I endogen meningkatkan perlindungan secara sistemik pada model tikus yang telah terinfeksi. Toksin KCT-I dan PBE memberikan perlindungan terhadap strain *K. pneumoniae* dan *K. oxytoca*. Imunisasi *K. pneumoniae* pada kelinci menyebabkan peningkatan IgG yang juga ditemukan dalam serum keturunan mereka. Imunisasi pasif menggunakan kolostrum dari imunitas sebelumnya menimbulkan imunitas pada kelinci baru lahir (Gorden *et al.*, 2018)

## 2.4 ELISA

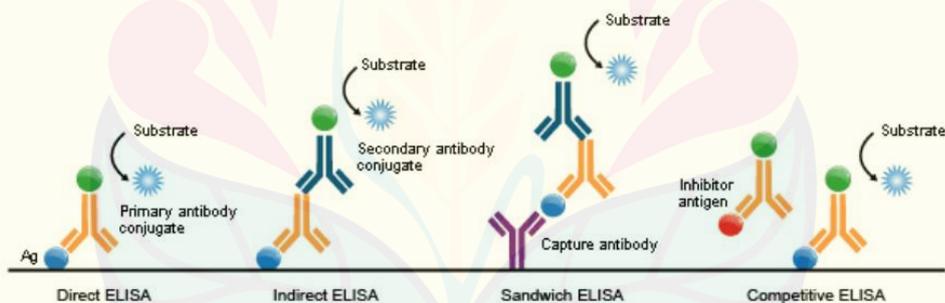
### 2.4.1 Pengenalan ELISA

ELISA merupakan singkatan dari *enzyme-linked immunosorbent assay* merupakan metode pengecekan kadar sebuah antigen dengan memanfaatkan ikatan antigen dan antibodi. ELISA pertama kali diperkenalkan tahun 1971 oleh Peter Perlmann dan Eva Engvall. Pemeriksaan ini bergantung pada sumuran atau *well* yang telah dimodifikasi untuk pemberian sampel bergantung pada jenis ELISA yang digunakan. Aplikasi dari ELISA adalah analisis hormon, metabolisme, dan marker diagnosis. Alat dan bahan pemeriksaan ELISA adalah antigen dan antibodi yang sudah diekstrasi, larutan standar, sampel yang diperiksa, larutan pencuci buffer, dan ELISA *reader* (Shah, 2016).

## 2.4.2 Jenis-Jenis ELISA

ELISA dapat dimodifikasi menjadi 4 tipe pemeriksaan, yaitu *direct* ELISA, *indirect* ELISA, *sandwich* ELISA, dan *competitive* ELISA. Langkah kuncinya adalah imobilisasi antigen yang diinginkan, dapat dilakukan dengan cara *direct* adsorpsi ke pelat uji atau secara *indirect* melalui antibodi penangkap yang telah menempel pada pelat. Antigen kemudian dideteksi *direct* (antibodi primer berlabel enzim) atau *indirect* (sekunder berlabel enzim). Antibodi pendeteksi biasanya diberi label dengan *alkaline phosphatase* (AP) atau *horseradish peroksidase* (HRP). Pilihan substrat tergantung pada sensitivitas pengujian yang diperlukan dan instrumentasi yang tersedia untuk deteksi sinyal (Konstantinou, 2017).

Format pengujian standar yang diilustrasikan pada Gambar 2.4 penting untuk membedakan strategi yang sesuai dengan langkah deteksi. Antigen ditangkap ke *plate* dengan adsorpsi langsung ke permukaan atau melalui antibodi "yang ditangkap" lalu dilapisi seperti *sandwich* ELISA. Langkah deteksi (baik secara *direct* atau *indirect*) sangat menentukan sensitivitas ELISA (Gelkop *et al.*, 2018).



Gambar 2.5 Jenis-Jenis ELISA (Sumber: Gelkop *et al.*, 2018)

### a. Direct ELISA

ELISA *direct* dimulai dengan pelapisan antigen ke *plate* ELISA. Langkah pertama melibatkan penambahan antigen ke *plate* yang diinkubasi selama satu jam pada 37 °C atau diinkubasi pada 4 °C semalam. Setelah langkah inkubasi selesai, langkah selanjutnya adalah mencuci *plate* antibodi tidak terikat dan memblokir situs tidak terikat pada *plate* ELISA menggunakan agen seperti BSA, ovalbumin, aprotinin, atau protein hewani lainnya. Langkah kedua ini penting karena mencegah pengikatan antibodi non-spesifik ke pelat dan meminimalkan hasil positif palsu.

Setelah menambahkan buffer, *plate* dicuci ulang dan antibodi deteksi primer terkonjugasi enzim yang dipilih ditambahkan. *Plate* selanjutnya diinkubasi selama satu jam (Kohl, 2017).

*Direct ELISA* menggunakan antibodi deteksi primer berikatan langsung dengan protein yang diinginkan. *Plate* dicuci ulang untuk menghilangkan antibodi yang tidak terikat dan diikuti dengan penambahan substrat/kromofor seperti *alkaline phosphatase* (AP) atau *horseradish peroxidase* (HRP) ke *plate*. Perubahan warna sampel terjadi baik oleh hidrolisis gugus fosfat dari substrat oleh AP atau oleh oksidasi substrat oleh HRP. Keuntungan menggunakan *direct ELISA* menghindari reaktivitas silang antibodi sekunder dan langkah yang lebih sedikit menyebabkan *direct ELISA* lebih cepat. Kerugian dari *direct ELISA* adalah sensitivitasnya yang rendah dibandingkan dengan jenis ELISA lainnya dan biaya pembentukan reaksinya lebih mahal (Shah, 2016).

#### b. *Indirect ELISA*

Langkah-langkah *indirect ELISA* identik dengan *direct ELISA* kecuali langkah pencucian tambahan dan jenis antibodi yang ditambahkan setelah buffer dihilangkan. *Indirect ELISA* membutuhkan dua antibodi, antibodi deteksi primer yang menempel pada protein yang diinginkan dan antibodi sekunder terkait enzim yang melengkapi antibodi primer. Antibodi primer ditambahkan terlebih dahulu diikuti dengan langkah pencucian, kemudian antibodi sekunder terkonjugasi enzim ditambahkan dan diinkubasi. Langkah-langkahnya sama dengan *direct ELISA* yang meliputi langkah pencucian, penambahan substrat, dan deteksi perubahan warna (Kohl, 2017).

*Indirect ELISA* memiliki sensitivitas lebih tinggi dibandingkan *direct ELISA*. *Indirect ELISA* juga lebih murah dan lebih fleksibel karena banyak kemungkinan antibodi primer yang dapat digunakan. Satu-satunya kelemahan utama dengan jenis ELISA ini adalah resiko reaktivitas silang antara antibodi deteksi sekunder (Shah, 2016).

### c. *Sandwich* ELISA

*Sandwich* ELISA dimulai dengan antibodi yang dilapisi ke *plate*. ELISA ini disebut "*sandwich*" karena antigen terjepit di antara dua lapisan antibodi (antibodi penangkap dan pendeteksi). Setelah menambahkan antibodi ke *plate*, kemudian ditutup dan diinkubasi semalaman pada suhu 4 °C. Setelah tahap pelapisan selesai, pelat dicuci dengan PBS kemudian diblok dengan BSA. Pencucian buffer dilakukan setidaknya selama 1-2 jam pada suhu kamar. *Plate* dicuci dengan PBS sekali lagi sebelum penambahan antigen (Kohl, 2017).

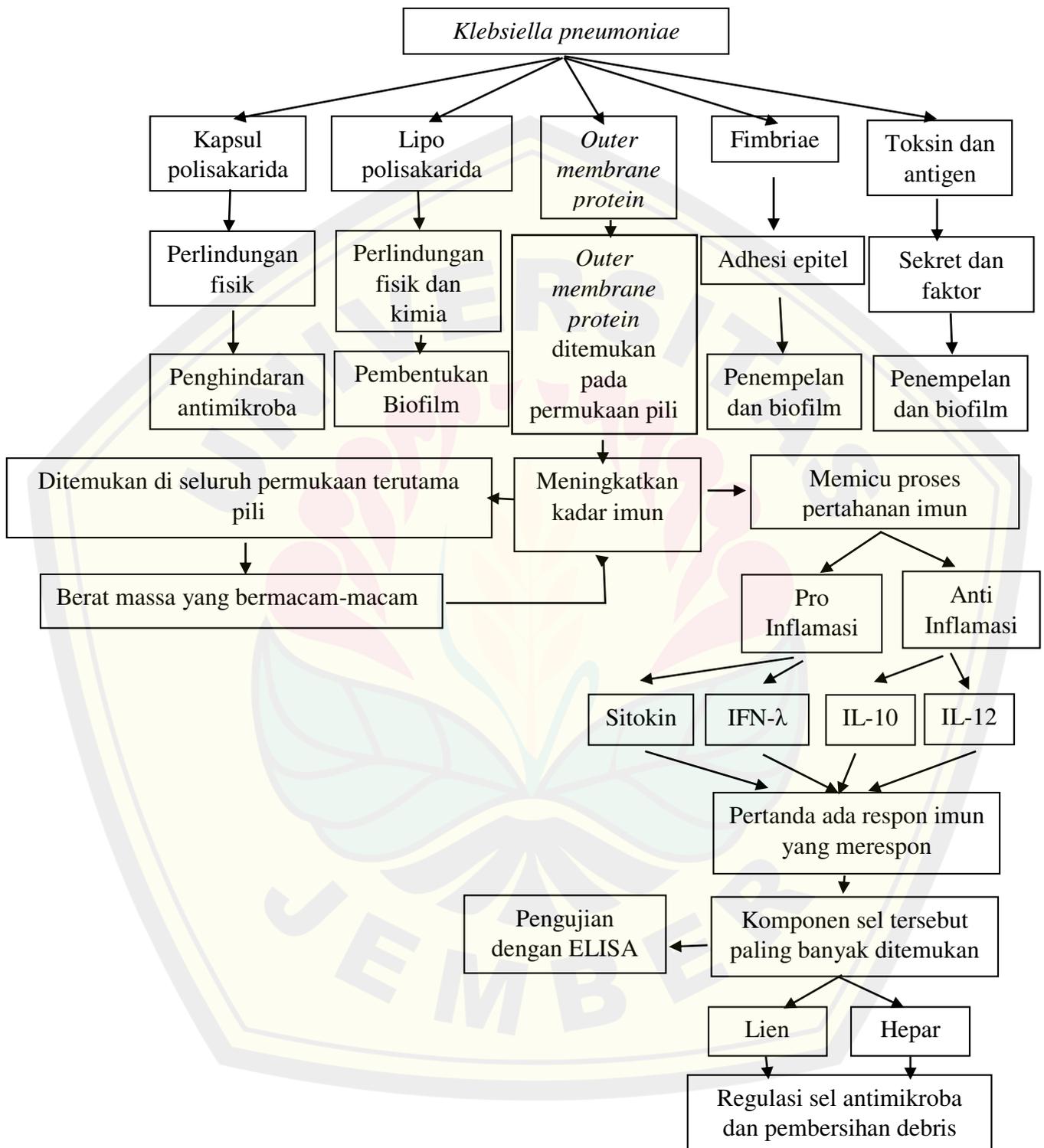
Antigen yang diinginkan kemudian ditambahkan ke *plate* untuk mengikat pada antibodi penangkap dan diinkubasi selama 90 menit pada suhu 37 °C. *Plate* dicuci ulang dan antibodi deteksi primer ditambahkan ke *plate* dan diinkubasi lagi selama 1 hingga 2 jam. Antibodi terkonjugasi enzim sekunder kemudian ditambahkan dan diinkubasi selama 1 sampai 2 jam. *Plate* dicuci ulang dan substrat ditambahkan untuk menghasilkan perubahan warna. *Sandwich* ELISA memiliki sensitivitas tertinggi di antara semua jenis ELISA. Kerugian utama jenis ELISA ini adalah waktu dan biaya. Penelitian ini menggunakan metode ini karena dianggap paling mudah dan tingkat keakuratan tinggi (Shah, 2016).

### d. *Competitive* ELISA

Tes *Competitive* ELISA digunakan untuk mengecek keberadaan antibodi spesifik untuk antigen dalam serum tes. Jenis ELISA ini menggunakan dua antibodi spesifik, antibodi terkonjugasi enzim dan antibodi lain yang ada dalam serum uji (jika serum positif). Menggabungkan dua antibodi ke dalam sumur memungkinkan kompetisi untuk mengikat antigen. Adanya perubahan warna berarti tes negatif karena antibodi terkonjugasi enzim mengikat antigen. Tidak adanya warna menunjukkan tes positif dan adanya antibodi dalam serum tes. *Competitive* ELISA memiliki spesifisitas rendah dan tidak dapat digunakan dalam sampel encer. Keuntungannya adalah pemurnian sampel lebih sedikit, dapat mengukur berbagai macam antigen dalam sampel tertentu, dan memiliki variabilitas rendah (Kohl, 2017)

### 2.5 Kerangka Teori

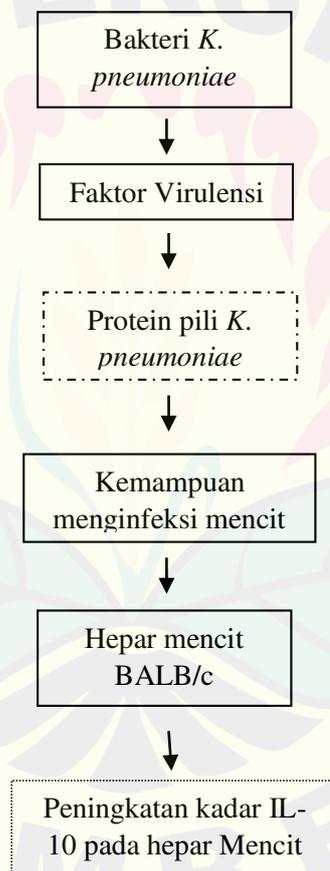
Kerangka teori dari penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Kerangka Teori

## 2.6 Kerangka Konseptual

Bakteri *K. pneumoniae* memiliki faktor virulensi berupa protein pili yang memiliki kemampuan untuk menginfeksi dari mencit hewan coba. Fokus utama dari penelitian ini adalah hepar mencit dimana pada hepar terjadi proses detoksifikasi antigen terutama IL-10 serta pengatur metabolisme utama dari protein pili yang diberikan secara intraperitoneal. Protein pili diharapkan dapat meningkatkan kadar IL-10 pada hepar mencit. Sesuai paparan sebelumnya, protein pili ditetapkan sebagai variabel bebas dan kadar IL-10 pada hepar ditetapkan sebagai variabel terikat. Kerangka konseptual dari penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2.7.



Keterangan:

⋯ = variabel bebas

⋯ = variabel terikat

Gambar 2.7 Kerangka Konseptual

Kerangka konsep menjelaskan bahwa *K. pneumoniae* memiliki faktor virulensi pada protein pili. Protein pili meningkatkan kadar IL-10 pada hepar dikarenakan mampu memicu faktor imunitas dari inang. Variabel bebas penelitian ini adalah kadar IL-10 pada hepar. Peningkatan kadar IL-10 merupakan variabel terikat yang diakibatkan pemberian protein pili *K. pneumoniae*. Peningkatan kadar IL-10 merupakan efek pemberian protein pili dalam menimbulkan respon imun tubuh. IL-10 adalah faktor resolusi pasca infeksi yang timbul setelah aktivasi sel B dan sel T. Parameter dikatakan berhasil apabila terjadi peningkatan IL-10 hepar. Perlakuan dengan pemberian pili serta waktu dan perlakuan sampel dimasukan sebagai variabel terkontrol karena dapat diukur oleh peneliti. Faktor kesalahan pada alat dan reaksi imun masing-masing mencit menjadi variabel luar yang tidak dapat dikendalikan oleh peneliti.

### **2.7 Hipotesis Penelitian**

Hipotesis dalam penelitian ini yaitu terdapat peningkatan pada kadar IL-10 pada hepar mencit galur BALB/c setelah pemberian protein pili *Klebsiella pneumoniae* dengan berat 65,5 kDa.

### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimental murni dengan *randomized post test only controlled grup design*. Beberapa alur rancangan penelitian sudah dilaksanakan pada penelitian sebelumnya seperti identifikasi berat molekul untuk mendapatkan protein pili 65,5 kDa *K. pneumoniae*, uji hemaglutinasi untuk mengukur tingkat patogenitas dari protein pili, induksi mencit secara intraperitoneal sebanyak 3 kali dengan interval 14 hari dan terminasi mencit (Abdollahi *et al.*, 2013; Care Committee, 2017). Penelitian ini melakukan pengajuan uji etik dan pengukuran kadar IL-10 pada hepar mencit melalui ELISA setelah diinduksi dengan protein pili *K. pneumoniae* 65,5 kDa. Pengukuran kadar IL-10 menggunakan produk dari BT LAB yang menggunakan metode *Sandwich* ELISA dengan jumlah sumuran yang digunakan berjumlah 96. *Sandwich* ELISA dipilih dikarenakan memiliki tingkat sensitivitas tertinggi. Untuk rancangan lengkap dapat dilihat pada Lampiran 1.

#### 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia untuk pemeriksaan kadar IL-10 hepar melalui ELISA, Rumah Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada tahun 2021. Injeksi perlakuan atau induksi mencit untuk pertama kali dilaksanakan pada 4 Februari 2021, yang kedua pada 18 Februari 2021, dan yang terakhir pada 4 Maret 2021. Terminasi mencit dilakukan pada tanggal 18 Maret 2021. Penyimpanan sampel hepar pada *freezer* dengan suhu  $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$  pada 18 Maret 2021.

### 3.3 Populasi dan Besar Sampel Penelitian

#### 3.3.1 Populasi Penelitian

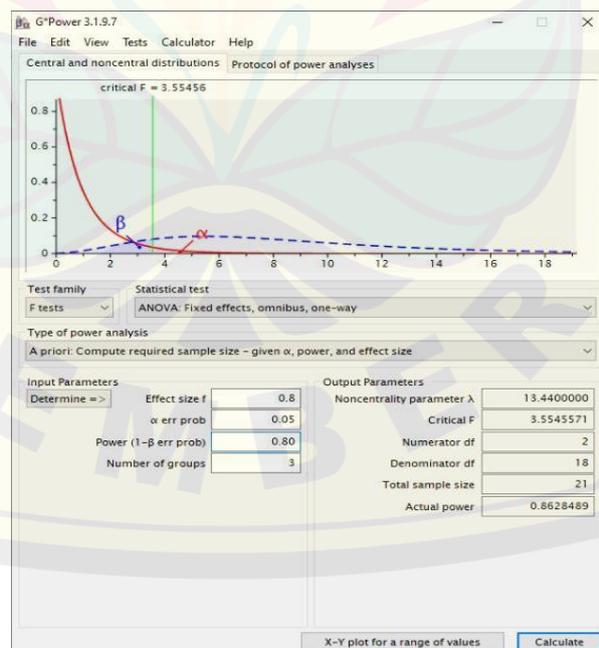
Populasi penelitian ini adalah mencit jantan putih galur BALB/c yang akan diekstraksi organ hatinya.

#### 3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah 21 buah hepar dari mencit jantan galur BALB/c berusia 6-8 minggu dengan berat  $\pm 25$  gram yang berada dalam keadaan baik tanpa adanya kerusakan pada sampel. Kriteria eksklusi penelitian ini adalah sampel rusak dikarenakan penyimpanan pada penelitian sebelumnya. Sampel rusak ditandai dengan perubahan warna menjadi kekuningan dan adanya deposit debris berlebih pada permukaan sampel (Ratundima *et al.*, 2012).

#### 3.3.3 Besar Sampel Penelitian

Besar sampel keseluruhan yang dibutuhkan dalam penelitian ini yaitu 21 buah yang dibagi dalam 3 kelompok, masing-masing terdiri dari 7 buah. Total sampel dihitung dengan menggunakan G power (Faul, 2007) sebagai berikut:



Gambar 3.1 Total Sampel Menggunakan G power (Faul, 2007)

### 3.4 Jenis dan Sumber Data

Jenis data pada variabel yang diukur dalam penelitian ini merupakan data primer. Data primer berupa pemeriksaan kadar IL-10 pada hepar mencit yang telah diinduksi protein pili *K. pneumoniae* 65,5 kDa. Hepar berasal dari stok penelitian sebelumnya dari mencit setelah tahap induksi.

### 3.5 Variabel Penelitian

Variabel dependen pada penelitian ini adalah kadar IL-10 pada hepar mencit dari 3 kelompok. Variabel independen pada penelitian ini adalah konsentrasi protein pili 65,5 kDa *K. pneumoniae* dan substrat yang berbeda pada tiap kelompok induksi mencit. Perlakuan kelompok kontrol digunakan larutan PBS, kelompok perlakuan diberi antigen protein pili ditambah *freund's adjuvant*, kelompok adjuvan diberi *freund's adjuvant*. *Freund's adjuvant* adalah air yang berada di emulsi minyak (*W/O emulsions*) dengan tujuan membentuk imunitas pada inang. *Freund's adjuvant* dibagi menjadi 2 jenis, yaitu jenis IFA (*incomplete freunds's adjuvant*) yang hanya berisi *W/O emulsions* dan CFA (*complete freunds's adjuvant*) berisi *K. pneumoniae* utuh yang dimatikan *W/O emulsions* (Gregoriadis *et al.*, 2018). *Freunds's adjuvant* digunakan sebagai pembanding efektivitas antara kelompok perlakuan dan kelompok adjuvan pada penelitian ini.

### 3.6 Definisi Operasional

Berikut Definisi Operasional dipaparkan dalam tabel 3.1

Tabel 3.1 Definisi Operasional

| No. | Variabel                        | Definisi Operasional   | Alat Pengukuran       | Hasil Ukur   | Skala Data |
|-----|---------------------------------|--|-----------------------|--|------------|
| 1.  | Kelompok pemberian protein pili | Protein pada pili yang berguna sebagai faktor perlekatan pada <i>K. pneumoniae</i> . Protein pili didapatkan dengan melakukan pengukuran berat molekul menggunakan <i>SDS-page</i> terlebih dahulu dan didapatkan 65,5 kDa. Protein pili diberikan | Pipet ukur mikroliter | Konsentrasi protein pili, larutan PBS, dan adjuvant dalam satuan | Nominal    |

| No. | Variabel                            | Definisi Operasional  | Alat Pengukuran | Hasil Ukur  | Skala Data |
|-----|-------------------------------------|---|-----------------|---|------------|
|     |                                     | pada kelompok 2 perlakuan sedangkan kelompok 1 diberikan larutan PBS serta kelompok 3 diberikan larutan adjuvant. Untuk masing masing total volume yang diberikan adalah 200 $\mu$ L dengan rincian pada kelompok 1 diberikan 200 $\mu$ L PBS, kelompok 2 diberikan 8 $\mu$ L antigen dengan 192 $\mu$ L PBS, dan pada kelompok 3 diberikan 100 $\mu$ L adjuvant serta 100 $\mu$ L. Penyuntikan diberikan secara intraperitoneal sebanyak 3 kali dengan interval 14 hari. Pembagian 3 kelompok untuk melihat hubungan masing-masing kelompok. |                 | mikroliter yang dibagi dalam 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol dengan PBS, kelompok perlakuan dengan antigen, kelompok adjuvant dengan pemberian adjuvant. |            |
| 2.  | Konsentrasi IL-10 pada hepar mencit | Mencit diterminasi terlebih dahulu. Konsentrasi IL-10 yang diukur pada hepar yang sudah dihomogenisasi dengan Larutan PBS ( <i>phosphate buffer saline</i> ). Diukur menggunakan metode <i>sandwich</i> ELISA lalu dimasukan kedalam ELISA <i>reader</i> untuk diukur absorbansinya. Kurva larutan standar elisa digunakan sebagai patokan dalam menentukan konsentrasi IL-10.  | ELISA reader    | Kadar IL-10 dengan satuan pg/mL   | Rasio      |
| 3.  | Protein Pili 65,5 kDa               | Protein pili <i>K. pneumoniae</i> merupakan protein yang ditemukan pada permukaan pili yang termasuk dalam kategori <i>Outer Membrane protein</i> . Potein pili 65,5 kDa dipilih dikarenakan saat dilakukan <i>running SDS page</i> , <i>band</i> tertebal ditemukan pada 65,5 kDa yang menandakan protein immunogen terbanyak pada 65,5 kDa. Hal ini memungkinkan protein pili 65,5 kDa memiliki tingkat pemicuan imun lebih tinggi disbanding berat molekul lain.   | SDS Page        | Berat molekul dalam Kilo Dalton (kDa)   | Rasio      |

### 3.7 Instrumen Penelitian

#### 3.7.1 Alat

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini yaitu vortex, *beaker glass*, *refrigerator*, tabung *falcon*, *mikroplate V 96* sumuran, seperangkat alat dialisis, *ELISA reader*, gunting, gelas ukur, mikropipet, pipet tip, dan tabung *eppendorf*.

#### 3.7.2 Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini yaitu, organ hepar mencit, *tris-base*, akuades, streptavidin, *horseperoksidase*, anti IL-10, Substrat A, Substrat B, *stop solution*, dan *phosphate buffer saline* (PBS).

### 3.8 Teknik Penyajian dan Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis untuk menyimpulkan hasil penelitian. Peneliti memilih uji normalitas *Shapiro wilk* karena data berjumlah <50 dan uji homogenitas data menggunakan *Bartlett Test* dikarenakan ada >2 kelompok sampel dan jika memenuhi data distribusi normal. Apabila data tidak terdistribusi normal, pengujian homogenitas menggunakan *Levene Test*. Data variabel independen menggunakan data kualitatif yaitu pengujian dari kelompok mencit dibagi dalam 3 kelompok serta variabel dependen menggunakan data kuantitatif yaitu kadar IL-10 pada hepar mencit masing-masing kelompok. Oleh karena itu, peneliti menggunakan uji korelasi *One way Anova* jika memenuhi persyaratan uji parametrik atau dengan uji korelasi *Kruskals Wills* jika tidak memenuhi persyaratan uji parametrik (Swarjana, 2016).

Analisis data menggunakan SPSS dengan melihat perbedaan rerata kadar dari masing-masing kelompok lalu dihubungkan dengan kesesuaian dari masing-masing kelompok. Pada kelompok perlakuan diharapkan kadar IL-10 naik dan kadar kelompok lain memiliki kadar dibawah kelompok perlakuan dan didapatkan perbedaan rerata kadar IL-10 masing-masing kelompok. Hubungan kadar IL-10 setiap kelompok diukur tingkat korelasinya dengan melihat jumlah p apakah <0,05 (pemberian IL-10 ada pengaruh) atau p >0,05 (pemberian IL-10 tidak berpengaruh).

Pemeriksaan melalui SPSS (Ostertagová, 2013). Setelah dilakukan uji *One way Anova* maka dilakukan uji *Post Hoc*.

*Post Hoc* merupakan sebuah uji yang dilakukan melalui aplikasi SPSS untuk melihat kelompok mencit yang memiliki peningkatan atau kadar yang berbeda. Data yang berdistribusi normal dilakukan uji *Bonferroni* (Jika data Homogen) dan uji *Games-Howell* jika data tidak homogen. Data tidak terdistribusi normal akan dilakukan uji *Mann-Whitney* sebagai uji *Post Hoc* pada uji *Kruskals Wills*. Uji *Post Hoc* dilakukan jika data *One way Anova* ada pengaruh ditandai dengan  $p < 0,05$ . Interpretasi data uji *Post Hoc* adalah  $p < 0,05$  maka terdapat perbedaan signifikan antar kelompok dan ditandai dengan tanda bintang pada kolom *mean difference* (Faadlilah, 2016).

### 3.9 Alur Penelitian

#### 3.9.1 Uji Kelayakan Etik

Peneliti mengajukan persetujuan etik kepada Komisi Etik FK UNEJ karena menggunakan organ hewan coba. Organ didapatkan dari penelitian yang dilaksanakan sebelumnya. Penelitian telah mendapatkan izin etik dari Komisi Etik FK UNEJ dengan nomor 1.540/H25.1.11/KE/2021.

#### 3.9.2 Identifikasi Berat Molekul Protein Pili *K. pneumoniae*

Identifikasi berat protein pili *K. pneumoniae* molekul dilakukan dengan SDS PAGE menurut metode penelitian Laemmli (Podmirseg *et al.*, 2016). Komponen gel yang digunakan yaitu *separating* 12,5% dan *stacking* 4%. Sampel protein yang disimpan dalam *deep freeze* dicairkan terlebih dahulu dan dilakukan elektroforesis tanpa presipitasi. Sampel yang dibutuhkan sekali *running* dengan 10 sumuran dengan 9 sumuran berisi sampel dan 1 sumuran berisi protein marker yaitu sebesar 45  $\mu$ L, *buffer sample* juga dalam volume sama. Warna yang digunakan yaitu *bromophenol blue*. Setelah sampel ditambahkan *buffer sample*, sampel dipanaskan hingga 95 °C selama 4 menit baru kemudian siap dimasukkan ke tiap sumuran setelah gel terendam elektroforesis *buffer*. Voltase yang digunakan sebesar 120 mV,

arus 400 mA kemudian di *running* dalam waktu 60 menit. Langkah penelitian ini hingga induksi mencit dengan protein pili *K. pneumoniae* 65,5 kDa sudah dilaksanakan pada penelitian sebelumnya. Pada penelitian sebelumnya ditemukan berat molekul dengan tingkat protein paling banyak pada 65,5 kDa. Identifikasi protein pili dilaksanakan pada 20-29 Oktober 2020.

### 3.9.3 Pemurnian dan Pengukuran Konsentrasi Protein Pili *K. pneumoniae*

Berat protein yang membentuk *band* gel hasil elektroforesis dihitung dan dipotong sesuai berat yang diperlukan. Hasil potongan *band* dikumpulkan dan dimasukkan dalam lembar *nitrocellulosa* untuk dilakukan elektroelusi dalam elektroforesis horizontal *chamber* yang telah terisi *buffer*. Atur *power supply* hingga voltase menjadi 125 mV, tegangan 0,3 A selama 120 menit. Siapkan *beaker glass* berisi 1 L PBS steril dengan pH 7,4 untuk dilakukan dialisis sampel hasil elektroelusi. Dimasukkan *magnetic stirrer* dan pastikan tetap berputar setelah dimasukkan *refrigerator* selama 2 x 24 jam. Setiap 24 jam PBS steril diganti dengan PBS steril yang baru. Sampel yang telah dielektroelusi dan dialisis siap digunakan (Sukarjati *et al.*, 2018). Pada pemurnian didapatkan protein pili *K. pneumoniae* dan didapatkan konsentrasi protein pili 6500 pg/ $\mu$ L dan akan digunakan pada penghitungan volume antigen yang diberikan. Pengukuran konsentrasi protein menggunakan metode *Kingsley*. Metode ini menggunakan *Kingsley reagent* yang digunakan sejak 1948. Menyiapkan 3 tabung dari *Blank*, sampel, dan standar. Ukur tabung *Blank* pada spektrofotometer 540 nm dan catat. Ukur tabung standar dengan disii 1 ml normal saline 0,9% dan ukur dan kurangi standar dengan *Blank*. Pada tabung sampel diisi dengan larutan standar 1 ml dan 20  $\mu$ L sampel lalu diamkan selama 5 menit pada suhu 25 °C dan ukur pada spektrofotometer (Use *et al.*, 2014). Pemurnian protein pili *K. pneumoniae* dilaksanakan pada 18-20 November 2020 dan pengukuran konsentrasi pada 29 Desember 2020.

### 3.9.4 Uji Hemaglutinasi

Lakukan serial pengenceran pada *mikroplate* V dengan cara memasukkan 50  $\mu$ L PBS pada tiap sumuran A1-A10, kosongi sumuran A11 dan masukkan 50  $\mu$ L

PBS pada A12. Kemudian tambahkan 50  $\mu\text{L}$  protein pili pada sumuran A1, kemudian pipetting agar larutan tercampur. Ambil 50  $\mu\text{L}$  larutan dari A1 dan masukkan ke A2. Lanjutkan dengan mengambil 50  $\mu\text{L}$  larutan A2 ke dalam A3 dan seterusnya hingga A10. Tambahkan 50  $\mu\text{L}$  eritrosit pada sumuran A1-A10, kosongi sumuran A11 dan masukkan 50  $\mu\text{L}$  eritrosit pada A12. Homogenkan suspensi pada *mikroplate* V dengan rotator *plate* selama 1 menit. Amati hasilnya dalam 1 jam (Sukarjati *et al.*, 2018). Pada penelitian sebelumnya telah dilaksanakan uji hemaglutinasi dengan hasil titer tertinggi yaitu 1/8. Uji hemaglutinasi digunakan sebagai sarana untuk mengukur tingkat patogenitas dari bakteri *K. pneumoniae* (Ratundima *et al.*, 2012). Uji hemaglutinasi dilaksanakan pada bulan 11 Januari 2021.

### 3.9.5 Induksi Mencit dengan Protein Pili

Lakukan aklimatisasi selama 7 hari pada mencit. Setelah 7 hari, mencit dirandomisasi sebelum dilakukan induksi sesuai kelompok perlakuan. Adapun terdapat tiga kelompok perlakuan yakni kelompok 1 diberi PBS, kelompok 2 diberi antigen protein pili dan *freund's adjuvant*, kelompok 3 diberi *freund's adjuvant* saja. Induksi dilakukan secara intraperitoneal sebanyak 3x dengan interval selama 14 hari (Stevani, 2016). Dosis antigen yang digunakan untuk tiap ekor yaitu 50  $\mu\text{g}$  (Greenfield, 2020), dengan *freund's adjuvant* dalam volume yang sama dengan antigen yang diencerkan dalam PBS. *Priming* digunakan CFA, sementara untuk *booster* digunakan IFA. Berikut merupakan pengukuran dosis induksi untuk setiap mencit. Pada penelitian sebelumnya digunakan 27 mencit sehingga peneliti memiliki jumlah sampel berlebih dengan rincian jumlah per kelompok 9 mencit. 27 Mencit hidup hingga setelah tahap induksi protein pili.

i. Kelompok 1

PBS 200  $\mu\text{L}$

ii. Kelompok 2

Volume antigen:  $\frac{6500}{1} = \frac{50}{x}$

6500 x = 50

$$X = 0,00769 \text{ mL} \sim 8 \mu\text{L}$$

$$\text{Volume CFA/IFA} = 1:1 \text{ Antigen}$$

$$\text{Volume PBS} = 0,1 \text{ mL atau } 200 \mu\text{L} - 8 \mu\text{L}$$

$$= 192 \mu\text{L}$$

### iii. Kelompok 3

$$\text{Volume PBS} \quad : 100 \mu\text{L}$$

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

### 3.9.6 Pengukuran Kadar IL-10 Hepar dengan Metode *Sandwich* ELISA

Penelitian ini menggunakan produk dari BT LAB dengan metode yang digunakan adalah *Sandwich* ELISA. Persiapan pengukuran terdiri dari preparasi organ terlebih dahulu, yaitu buat sayatan pada daerah abdomen mencit dengan menggunakan gunting sampai bagian peritoneal terbuka. Hepar diambil dengan menggunakan pinset secara hati hati. Organ hepar dicuci dengan PBS pH 7,4 kemudian ditimbang. Organ lalu dicincang dan dihomogenkan dengan PBS dengan homogenizer kaca di atas es dan di *sentrifuge* 2000-3000 RPM selama 20 menit. Sampel dari hepar siap diuji sesuai *assay procedure* yang ada. Langkah awal siapkan reagen ELISA, larutan standar, dan sampel. Tempatkan semua reagen pada suhu kamar sebelum digunakan dan lakukan pengujian. Tambahkan standar 50  $\mu\text{L}$  ke sumur standar dengan catatan jangan tambahkan antibodi ke standar dengan baik karena larutan standar mengandung antibodi terbiotinilasi. Tambahkan 40  $\mu\text{L}$  sampel ke sumur sampel dan kemudian tambahkan 10  $\mu\text{L}$  anti-IL-10 antibodi ke sampel sumur, lalu tambahkan 50  $\mu\text{L}$  streptavidin-HRP ke sumur sampel dan sumur standar. Tutupi pelat dengan sealer dan inkubasi selama 60 menit pada 37 °C (Lab, 2010).

Selanjutnya, lepaskan penyegel dan cuci 5 kali dengan larutan penyangga. Rendam sumur dengan setidaknya 0,35 mL buffer pencuci selama 30 detik hingga 1 menit untuk setiap pencucian. Untuk pencucian otomatis, aspirasi semua sumur dan cuci 5 kali dengan bufer pencuci, isi sumur secara berlebihan dengan buffer pencuci. Tepuk piring ke atas handuk kertas atau bahan penyerap lainnya. 50  $\mu\text{L}$  ditambahkan larutan substrat A ke masing-masing wadah lalu tambahkan 50  $\mu\text{L}$  larutan substrat B ke setiap wadah. Pelat inkubasi ditutup dengan

sealer baru selama 10 menit pada suhu 37 °C dalam gelap. Tambahkan 50 µL *stop solution* ke setiap lubang, warna biru akan segera berubah menjadi kuning. Tentukan densitas optik (nilai OD) setiap sumur segera menggunakan pembaca pelat mikro yang disetel ke 450 nm dalam 10 menit setelah menambahkan *stop solution* (Lab, 2010).



## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil Penelitian

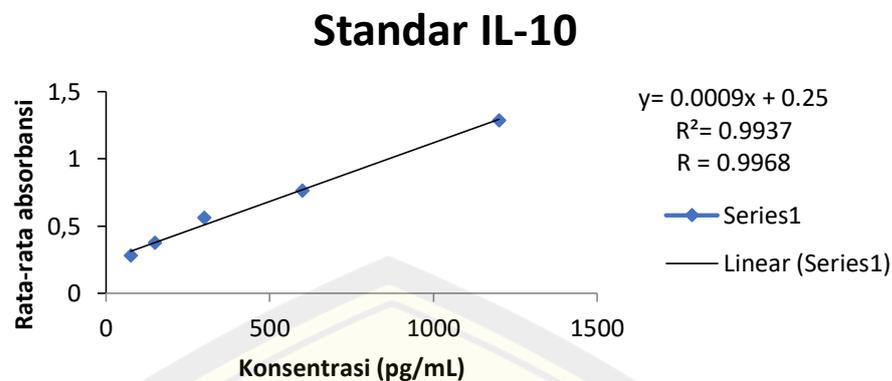
Penelitian ini dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada bulan September tahun 2021. Jumlah sampel total adalah 21 sampel. Semua sampel hepar dalam keadaan baik dan tidak ditemukan debris sehingga disimpulkan sampel tidak ada perubahan.

#### 4.1.1 Analisis Univariat

Data sampel menggunakan data duplet atau melakukan pengulangan sebanyak 2 kali pada setiap sampel. Hal itu juga dilaksanakan pada larutan standar sehingga absorbansi dimasukan rumus pada kurva larutan standar. Pengambilan data absorbansi menggunakan ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). Data larutan standar dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 1. Gambar 1 adalah kurva dari larutan standar yang digunakan sebagai acuan dari larutan sampel. Persamaan regresi linier adalah  $y=bx + a$ . Absorbansi dinyatakan sebagai  $y$  dan konsentrasi dinyatakan sebagai  $x$  dengan faktor korelasi ( $R$ ) mendekati 1 ( $R=0,9968$ ).

Tabel 4.1 Data absorbansi dan konsentrasi larutan standar

| No. | Absorbansi (nm) | Rata-rata absobansi (nm) | Konsentrasi (pg/mL) |
|-----|-----------------|--------------------------|---------------------|
| 1   | 1,322           | 1,288                    | 1200                |
| 2   | 1,254           |                          |                     |
| 3   | 0,772           | 0,7655                   | 600                 |
| 4   | 0,759           |                          |                     |
| 5   | 0,587           | 0,5635                   | 300                 |
| 6   | 0,54            |                          |                     |
| 7   | 0,372           | 0,3765                   | 150                 |
| 8   | 0,381           |                          |                     |
| 9   | 0,284           | 0,281                    | 75                  |
| 10  | 0,278           |                          |                     |
| 11  | 0,154           | 0,172                    | 0                   |
| 12  | 0,19            |                          |                     |



Gambar 4.1 Kurva larutan standar

Tabel 4.2, tabel 4.3, dan tabel 4.4 menunjukkan data konsentrasi IL-10 setelah data dimasukkan pada rumus  $y=0,0009x+0,25$ ,  $y$  menggambarkan absorbansi IL-10 dan  $x$  menggambarkan konsentrasi IL-10. Kurva standar digunakan sebagai dasar penentuan konsentrasi IL-10. Kurva standar sangat berpengaruh pada konsentrasi sampel.

Kelompok kontrol menunjukkan konsentrasi terendah pada 344,44 pg/mL dan kadar tertinggi adalah 472,22 pg/mL. Mean pada kelompok kontrol adalah  $394,6 \pm 43,9$  pg/mL. Konsentrasi juga hampir merata pada setiap kelompok sampel. Rata-rata dari nilai normal digunakan sebagai nilai normal penelitian.

Tabel 4.2 Data absorbansi dan konsentrasi IL-10 pada sampel hepar kelompok kontrol

| No   | Pengulangan | Absorbansi (nm) | Konsentrasi (pg/mL) |
|------|-------------|-----------------|---------------------|
| 1.   | K1.1.1      | 0,662           | 344,4444444         |
|      | K1.1.2      | 0,56            |                     |
| 2.   | K1.2.1      | 0,774           | 405,5555556         |
|      | K1.2.2      | 0,615           |                     |
| 3.   | K1.3.1      | 0,598           | 386,6666667         |
|      | K1.3.2      | 0,626           |                     |
| 4.   | K1.4.1      | 0,735           | 425,5555556         |
|      | K1.4.2      | 0,633           |                     |
| 5.   | K1.5.1      | 0,58            | 366,6666667         |
|      | K1.5.2      | 0,601           |                     |
| 6.   | K1.6.1      | 0,725           | 472,2222222         |
|      | K1.6.2      | 0,675           |                     |
| 7.   | K1.7.1      | 0,579           | 361,1111111         |
|      | K1.7.2      | 0,575           |                     |
| Mean |             |                 | $394 \pm 43,9$      |

Kelompok perlakuan menunjukkan konsentrasi terendah pada 365,6 pg/mL dan kadar tertinggi adalah 598,9 pg/mL. Mean pada kelompok perlakuan adalah  $454,3 \pm 74,1$  pg/mL (Tabel 4.3). Terjadi peningkatan pada kadar tertinggi dan rata-rata apabila dibandingkan dengan data pada kelompok kontrol.

Tabel 4.3 Data absorbansi dan konsentrasi IL-10 pada sampel hepar kelompok perlakuan

| No.  | Pengulangan | Absorbansi (nm) | Konsentrasi (pg/mL) |
|------|-------------|-----------------|---------------------|
| 1.   | K2.1.1      | 0,497           | 365,5555556         |
|      | K2.1.2      | 0,579           |                     |
| 2.   | K2.2.1      | 0,582           | 405,5555556         |
|      | K2.2.2      | 0,615           |                     |
| 3.   | K2.3.1      | 0,677           | 474,4444444         |
|      | K2.3.2      | 0,577           |                     |
| 4.   | K2.4.1      | 0,656           | 451,1111111         |
|      | K2.4.2      | 0,616           |                     |
| 5.   | K2.5.1      | 0,789           | 598,8888889         |
|      | K2.5.2      | 0,684           |                     |
| 6.   | K2.6.1      | 0,536           | 418,8888889         |
|      | K2.6.2      | 0,627           |                     |
| 7.   | K2.7.1      | 0,669           | 465,5555556         |
|      | K2.7.2      | 0,534           |                     |
| Mean |             |                 | 454,3 $\pm$ 74,1    |

Kelompok adjuvan menunjukkan konsentrasi terendah pada 237,2 pg/mL dan kadar tertinggi adalah 412,7 pg/mL. Mean pada kelompok adjuvan adalah  $340,5 \pm 56,6$  pg/mL (Tabel 4.4). Data pada kelompok adjuvan cenderung rendah dibandingkan kelompok kontrol dan perlakuan.

Tabel 4.4 Data absorbansi dan konsentrasi IL-10 pada sampel hepar kelompok adjuvan

| No. | Pengulangan | Absorbansi (nm) | Konsentrasi (pg/mL) |
|-----|-------------|-----------------|---------------------|
| 1.  | K3.1.1      | 0,625           | 412,7777778         |
|     | K3.1.2      | 0,618           |                     |
| 2.  | K3.2.1      | 0,543           | 325                 |
|     | K3.2.2      | 0,542           |                     |
| 3.  | K3.3.1      | 0,619           | 385                 |
|     | K3.3.2      | 0,574           |                     |
| 4.  | K3.4.1      | 0,602           | 362,2222222         |
|     | K3.4.2      | 0,55            |                     |
| 5.  | K3.5.1      | 0,585           | 345,5555556         |
|     | K3.5.2      | 0,537           |                     |

| No.  | Pengulangan | Absorbansi (nm) | Konsentrasi (pg/mL) |
|------|-------------|-----------------|---------------------|
| 6.   | K3.6.1      | 0,445           | 237,2222222         |
|      | K3.6.2      | 0,482           |                     |
| 7.   | K3.7.1      | 0,438           | 315,5555556         |
|      | K3.7.2      | 0,63            |                     |
| Mean |             |                 | 340,5 ±56,6         |

#### 4.1.2 Analisis Statistik

Uji normalitas data dilakukan terlebih dahulu agar peneliti mengetahui apakah distribusi data penelitiannya normal atau tidak. Peneliti menggunakan 21 sampel sebagai sampel penelitian, sehingga uji normalitasnya menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* ( $\leq 50$  data). Hasil uji normalitas data penelitian dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

| Variabel  | Nilai p |
|-----------|---------|
| Kontrol   | 0,686   |
| Perlakuan | 0,373   |
| Adjuvan   | 0,796   |

Ket: \*distribusi normal jika  $p > 0,05$

Tabel 4.5 menunjukkan hasil uji normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dengan nilai  $p=0,686$ ,  $p=0,373$ , dan  $p=0,796$  ( $p > 0,05$ ) sehingga distribusi data penelitian normal. Tes homogenitas menunjukkan nilai 1,612 (Tabel 4.6) dan membuktikan  $p < 7,815$ . Hasil ini menunjukkan data bersifat homogen sehingga dapat diolah dengan menggunakan *One way Anova*.

Tabel 4.6 Tes homogenitas

| Karakteristik antar kelompok | Nilai p |
|------------------------------|---------|
| Kadar IL-10                  | 1,612   |

Ket: \*data homogen jika  $p < 7,815$  (tabel chi kuadrat)

Tabel 4.7 menunjukkan hasil  $p=0,008$  dengan menggunakan uji *One way Anova*. Data menunjukkan secara statistik terdapat peningkatan kadar IL-10 pada mencit setelah pemberian protein pili *K. pneumoniae*. Nilai p dikatakan ada perbedaan mean signifikan pada setiap kelompok pada hepar mencit akibat pemberian protein pili apabila  $p < 0,05$ .

Tabel 4.7 *One way Anova*

| Karakteristik antar kelompok | Nilai p |
|------------------------------|---------|
| Kadar IL-10                  | 0,008   |

Hasil uji *Post Hoc* menggunakan metode *Bonferonni* dapat dilihat pada tabel 4.8. Perbandingan variabel kontrol dengan perlakuan menunjukkan nilai  $p=0,231$  yang berarti kadar IL-10 pada kelompok kontrol tidak memiliki perbedaan mean yang signifikan dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Uji selanjutnya membandingkan antara kelompok perlakuan dan kelompok adjuvan menunjukkan nilai  $p=0,006$  yang berarti adanya perbedaan mean yang signifikan antara kelompok perlakuan dengan adjuvan. Uji terakhir adalah kelompok adjuvan dengan kelompok kontrol menunjukkan nilai  $p=0,318$  berarti nilai mean yang tidak signifikan berbeda antara adjuvan dan kontrol.

Tabel 4.8 Uji *Post Hoc*

| Variabel             | Nilai p |
|----------------------|---------|
| Kontrol >< perlakuan | 0,231   |
| Perlakuan >< adjuvan | 0,006   |
| Adjuvan >< kontrol   | 0,318   |

Ket: \*data memiliki mean berbeda jika  $p < 0,05$

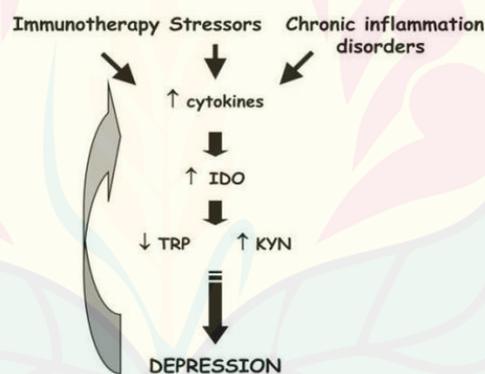
## 4.2 Pembahasan

Peneliti menyimpulkan terjadi peningkatan kadar IL-10 dan kadar IL-10 tertinggi pada kelompok perlakuan. Kelompok kontrol menjadi nilai normal IL-10 pada suatu percobaan. Nilai normal IL-10 kurang dari mean kelompok perlakuan namun lebih dari kelompok adjuvan (Rofii *et al.*, 2012). Urutan mean kadar IL-10 tertinggi seharusnya mulai dari kelompok perlakuan, kelompok adjuvan, dan diikuti kelompok kontrol namun pada penelitian ini urutan mean kadar IL-10 tertinggi dari kelompok perlakuan, kelompok kontrol dan kelompok adjuvan.

Uji *Post Hoc* menunjukkan hasil perbedaan signifikan pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok adjuvan. Hasil ini disebabkan karena tingkat imunogen dari protein pili jauh lebih tinggi dibandingkan dengan adjuvan. Protein pili memicu sistem imun secara spesifik dengan membentuk anti-*K. pneumoniae*. Adjuvan menggunakan *freund's adjuvant* memicu sistem imun secara menyeluruh

dan tidak spesifik. Hal ini membuat perbedaan mean kadar IL-10 antara kelompok perlakuan dan kelompok adjuvan terdapat perbedaan signifikan (Gregoriadis *et al.*, 2018).

Kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dibanding adjuvan tidak menunjukkan perbedaan mean yang signifikan. Ada dua faktor yang kemungkinan memengaruhi hasil uji kadar IL-10 pada mencit. Faktor yang pertama, mencit merasa stres akibat pemberian larutan PBS, protein pili, dan adjuvan secara intraperitoneal. Stres memicu peningkatan kadar sitokin pada mencit melalui mekanisme *positive feedback*. Sitokin dikeluarkan saat terjadi respon stres untuk menurunkan permeabilitas *triptofan* dan menyebabkan penurunan neurotransmisi serotonergik yang berakibat pada stres (Gambar 4.2). Faktor tersebut dapat memengaruhi hasil yang diberikan terutama pada kelompok kontrol yang seharusnya memiliki kadar IL-10 terendah (Shantanam, 2018; Rosyanti, 2017).



Gambar 4.2 Mekanisme Stres dengan Sitokin (Sumber: Shantanam, 2018)

Faktor yang kedua terdapat perbedaan mekanisme pertahanan imun pada masing-masing mencit. Perbedaan mekanisme imunitas menimbulkan kadar IL-10 yang berbeda masing individu. Setiap mencit memiliki variasi antibodi yang memberikan respon imun berbeda. Perbedaan imunitas ini dapat kita lihat pada salah satu individu pada kelompok adjuvan dengan kadar IL-10 237,22 pg/mL. Perbedaan ini terpaut jauh apabila kita bandingkan dengan mean kelompoknya. Hal ini dapat mengaburkan hasil penelitian meskipun peneliti sudah memilih galur mencit BALB/c yang memiliki variasi paling rendah dibandingkan dengan galur

lain, namun kemungkinan perbedaan variasi antibodi masih ada (Kadek *et al.*, 2012).

Penelitian lain yang dilaksanakan oleh Won-Hee Lee (2015) mendapatkan peningkatan yang signifikan pada kadar IL-4 yang merupakan satu keluarga dengan IL-10. IL-4 berfungsi sebagai *anti inflammatory* dengan hasil akhir berupa pengeluaran sel B memori yang akan diedarkan ke seluruh tubuh. Penelitian Won-Hee Lee menggunakan vesikel ekstraseluler dari *K. pneumoniae* yang disuntikan secara intra peritoneal ke dalam mencit dengan tujuan mencari kandidat vaksin terbaik namun pada penelitian ini tingkat kematian dari mencit masih terlalu tinggi dengan pemberian *lethal dose K. pneumoniae* sebesar ( $1 \times 10^8$  CFU) sehingga masih diperlukan penelitian lebih lanjut (Lee *et al.*, 2015). Penelitian serupa oleh Gaowei Hu (2022) yang membandingkan efektivitas antara pemberian *K. pneumoniae* secara IWB (*inactivated whole bacteria*) dengan *outer membrane phosphoprotein* dengan 3x pemberian secara intraperitoneal. Penelitian ini menggunakan strain dengan berat molekul 38 kDa dan didapatkan peningkatan IL-4 3x lebih tinggi dari normal dan mencit yang telah diimunisasi diberikan *K. pneumoniae* dengan dosis letal. IL-4 masih satu keluarga dengan IL-10 dengan efek yang hampir sama. Mencit yang telah diimunisasi dengan IWB dan *outer membrane phosphoprotein* memiliki tingkat survivalitas tinggi dengan minim kerusakan organ mencit. Penelitian ini membuktikan *Outer membrane protein* memiliki kemungkinan untuk dapat digunakan sebagai kandidat vaksin (Hu *et al.*, 2022).

Hasil penelitian ini berbeda, seharusnya terdapat perbedaan mean signifikan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol secara statistik. Protein pili *K. pneumoniae* sebenarnya berhasil menimbulkan respon imun inang diperlihatkan dengan peningkatan mean kadar IL-10 pada kelompok perlakuan yang melebihi nilai mean kelompok kontrol. Hal ini dapat terjadi karena protein pili memicu sel T dan sel B untuk opsonisasi protein pili dan menimbulkan peningkatan kadar pada IFN (*Interferon*) sebagai pro inflamasi. Respon humoral (antibodi) berperan penting mengendalikan infeksi *K. pneumoniae*. Pada mencit yang telah diinfeksi *K. pneumoniae*, antibodi anti-*K. pneumoniae* mencit menyebabkan respons protektif berupa sel T *helper* yang akhirnya menjadi IL-10 (Pennini *et al.*,

2017). Infeksi dianggap tidak ada apabila tidak terjadi peningkatan kadar IL-10 dan pemberian protein pili *K. pneumoniae* sebagai pemicu pembentukan sistem imun dianggap gagal (Sudiono, 2014).

Kelompok adjuvan menunjukkan mean kadar IL-10 terendah pada penelitian ini. Secara teori, mean kadar IL-10 kelompok adjuvan harus lebih tinggi dari mean kelompok kontrol. Kelompok adjuvan pada penelitian ini berfungsi untuk melihat dan membandingkan efektivitas protein pili sebagai antigen. Adjuvan kedepannya akan ditambahkan ke antigen untuk membantu memicu imun. Protein pili dianggap sebagai pemicu imun lemah dibandingkan dengan organel lain dari *K. pneumoniae* sehingga dibutuhkan *booster* dari pemicu imun (*immunopotentiator*) yaitu *freund's adjuvant*. Kadar pemberian adjuvan sudah sesuai yaitu kadar maksimal <0,2 mL pada pemberian hanya CFA (*Complete Freund's Adjuvant*). Penelitian ini adjuvan dicampur antara CFA dan IFA (*Incomplete Freund's Adjuvant*) sebanyak 0,05 ml masing-masing. IFA diharapkan mampu memicu Th2 (T helper 2) yang bertugas membentuk sel B memori. IFA berisi organel dari *M. tuberculosis* sehingga tidak seimunopoten CFA. Hal ini dapat menjadi salah satu faktor rendahnya peningkatan kadar IL-10 selain adanya perbedaan variasi imunitas pada mencit pada kelompok adjuvan (Care Committee, 2017).

Penelitian ini memperlihatkan protein pili sebagai kandidat vaksin *K. pneumoniae* berhasil memicu respon imun jika membandingkan mean dengan kelompok adjuvan namun tidak memiliki perubahan mean yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan tetap memiliki mean paling tinggi. Alasan tidak signifikannya mean antara kelompok kontrol dan perlakuan karena adanya faktor stres pada mencit saat pemberian PBS (*Phosphate Buffer Saline*) secara IP (*Intraperitoneal*) sehingga meningkatkan kadar IL-10 jauh melebihi dari kelompok adjuvan dan mendekati mean pada kelompok kontrol dan juga faktor perbedaan variasi imunitas pada mencit.

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan penelitian ini adalah:

1. Terdapat peningkatan kadar IL-10 pada mencit jantan galur BALB/c yang diberikan protein pili 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae* secara intraperitoneal. Kelompok perlakuan atau kelompok dengan pemberian protein pili 65,5 kDa *K. pneumoniae* menunjukkan kadar IL-10 tertinggi diantara semua kelompok;
2. Terdapat hubungan antara peningkatan kadar IL-10 hepar terhadap paparan protein pili *K. pneumoniae* pada mencit jantan galur BALB/c apabila melihat data peningkatan kadar IL-10 secara kasar;
3. Perbandingan peningkatan IL-10 antar kelompok tertinggi dimulai dari kelompok perlakuan, kelompok kontrol, lalu kelompok adjuvan;
4. Ada perbedaan mean total setiap kelompok pada kadar interleukin-10 setelah pemberian protein pili *K. pneumoniae*, perbedaan mean kurang signifikan ditemukan pada kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol yang membuat tidak adanya hubungan pemberian protein pili 65,5 kDa terhadap kadar IL-10 pada mencit secara signifikan.

### 5.2 Saran

Saran pada penelitian selanjutnya diperlukannya penelitian lebih lanjut tentang efek samping dan sifat imunogenik protein pili 65,5 kDa *Klebsiella pneumoniae* pada mencit galur BALB/c.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdollahi, S. H., F. Ayoobi, H. Khorramdelazad, G. Hassanshahi, B. N. Ahmadabadi, M. Rezayati, A. Ravary, A. Shamsizadeh, dan M. K. Arababadi. 2013. Interleukin-10 Serum Levels After Vaccination With in Vivo Prepared Toxoplasma Gondii Excreted/Secreted Antigens. *Oman Medical Journal*. 28(2):112–115.
- Adamo, R. 2018. Fighting Antibiotic-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with “Sweet” Immune Targets. *American Society for Microbiology*. 9(3):874-880.
- Ahn, D. 2020. Participation of the Il-10rb Related Cytokines, Il-22 and Ifn- $\Lambda$  in Defense of The Airway Mucosal Barrier. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10(2):1–11.
- Arato, V., M. M. Raso, G. Gasperini, F. B. Scorza, dan F. Micoli. 2021. Prophylaxis And Treatment Against *Klebsiella pneumoniae*: Current Insights on This Emerging Anti-Microbial Resistant Global Threat. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(8):4042
- Assoni, L., R. Girardello, T. R. Converso, dan M. Darrieux. 2021. Current Stage in the Development of *Klebsiella pneumoniae* Vaccines. *Infectious Diseases and Therapy*. 20(6):1-19
- Babu, L., S. Uppalapati, M. Sripathy, dan P. Redy. 2017. Evaluation of recombinant Multi-Epitope Outer Membrane Protein-Based *Klebsiella pneumoniae* Subunit Vaccine in Mouse Model. *Frontiers in Microbiology*. 8(3):1805.
- Bellich, B., C. Lagatolla, A. Tossi, M. Benincasa, dan P. Cescutti. 2018. Influence of Bacterial Biofilm Polysaccharide Structure on Interactions with Antimicrobial Peptides: A Study on *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Mol. Sci*. 19(6):1685.
- Care, I. A. dan U. Committee. 2017. Policy For Adjuvant Use with Special Emphasis on Complete Freund’s Adjuvant. *UNMC Animal Care and Use Program*. 1–5.
- Cho, Y., B. Kim, H. Le, dan S. Cho. 2017. Antiinflammatory Effects On Murine Macrophages Of Ethanol Extracts of Lygodium Japonicum Spores via Inhibition of Nfkb and P38. *Mol Med Rep*. 16(4):4362–4370.
- Choi, M., S. M. Tennant, R. Simon, dan A. S. Cross. 2019. Progress Towards the Development of *Klebsiella* Vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 18(7):681–691.
- Clarke, B. et al. 2018. Molecular Basis For The Structural Diversity in Serogroup

O2-Antigen Polysaccharides in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 293(2):4666–4679.

Dewi, N., N. M. A. Tarini, dan N. N. D. Fatmawati. 2019. Deteksi Gen Fimh pada Isolat Klinis *Klebsiella pneumoniae* di RSUP Sanglah Denpasar. *E-Jurnal Medika*. 8(4):1-19

Faadlilah, N. dan M. Ardiaria. 2016. Efek Pemberian Seduhan Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus Polyrhizus*) Terhadap Kadar HDL Tikus Sprague Dawley Dislipidemia. *Journal of Nutrition College*. 5(4):280–288.

Fasciana, T., B. Gentile, M. Aquilina, A. Ciammaruconi, C. Mascarella, A. Anselmo, A. Fortunato, S. Fillo, G. Petralito, F. Lista, dan A. Giammanco. 2019. Co-existence of virulence Factors and Antibiotic Resistance in New *Klebsiella pneumoniae* Clones Emerging in South of Italy. *BMC Infectious Diseases*. 19(1):1–10.

Faul, F. 2007. G\*Power 3: A Flexible Statistical Power Analysis Program for The Social, Behavioral, and Biomedical Sciences. *Behavior Research Methods*. 2(39):175–191.

Gelkop, S., A. Sobarzo, dan P. Brangel. 2018. The Development and Validation Of A Novel Nanobody-Based Competitive Elisa for The Detection of Foot and Mouth Disease 3abc Antibodies in Cattle. *Front Vet Sci*. 5(6):250.

Gomez, P. 2020. Functional insights From Kpfr, A New Transcriptional Regulator of Fimbrial Expression That Is Crucial for *Klebsiella pneumoniae* Pathogenicity. *Frontiers in Microbiology*. 11:3347.

Gonzalez, S., H. F. Peñaloza, J. A. Budnick, W. G. Bain, H. R. Nordstrom, J. S. Lee, dan D. Van Tyne. 2021. Finding Order in The Chaos: Outstanding Questions in *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis. *Infection and Immunity*. 89(4):1–17.

Gorden, P., M. Kleinhenz, dan et al Ydstie JA. 2018. Efficacy of Vaccination With A *Klebsiella pneumoniae* Siderophore Receptor Protein Vaccine for Reduction of *Klebsiella* Mastitis in Lactating Cattle. *J Dairy Sci*. 101(11):398–408.

Greenfield. 2020. Standard Immunization Of Mice, Rats, and Hamsters. *Cold Spring Harb Protocol*. 3(2)

Gregoriadis, G., M. O. Popovic, L. Centar, dan Y. Perrie. 2018. Vaccine Adjuvants Preparation Methods. 2<sup>nd</sup> Ed. New Jersey.

Helen, M. L. 2019. Shared and Distinct Functions of Type I and Type Iii Interferons. *HHS Public Access*. 50(4):907–923.

- Hu, G., X. Chen, W. Chu, Z. Ma, Y. Miao, X. Luo, dan Y. Fu. 2022. Immunogenic Characteristics Of The Outer Membrane Phosphoprotein As A Vaccine Candidate Against *Klebsiella Pneumoniae*. *Veterinary Research*. 53(1):5.
- Hussein, K., M. Bahey-El-Din, dan S. Sheweita. 2018. Immunization with the Outer Membrane Proteins Ompk17 And Ompk36 Elicits Protection Against *Klebsiella pneumoniae* in The Murine Infection Model. *Microbiology Pathology*. 12(8):119.
- Huynh, D. T. N., A. Y. Kim, dan Y. R. Kim. 2017. Identification of Pathogenic Factors in *Klebsiella pneumoniae* Using Impedimetric Sensor Equipped with Biomimetic Surfaces. *Sensors (Switzerland)*. 17(6):1–13.
- Joseph, L., T. Merciecca, C. Forestier, D. Balestrino, dan S. Miquel. 2021. From *Klebsiella pneumoniae* Colonization to Dissemination: An Overview of Studies Implementing Murine Models. *Microorganisms*. 9(6):240-270
- Kadek, E., E. Purnama, dan R. Anas. 2012. Stereototocin Berulang Sebagai Hewan Model Multiple Dose Streptozotocin-Induced Diabetes In Balb-C Mice ( *Mus Musculus* ): An Effort To. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 6(1):47–50.
- Kohl, T. 2017. Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Cold Spring Harb Protoc*. 7(2):100
- Kohl, T. 2017. *Indirect Immunometric ELISA*. 5:172
- Kohl, T. 2017. *Immunometric Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Edisi 6. Cold Spring Harb Protoc. New York.
- Konstantinou, G. 2017. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol*. 15(92):79–94.
- Kunduru, B. 2016. Ek3d: An E. Coli K Antigen 3-Dimensional Structure Database. *Kunduru, B. R., Nair, S.* 44:675–681.
- Lab, B. 2010. Mouse Interleukin 10 ELISA Kit. Bioassay Technology Laboratory Publication. <https://www.btlaboratory.com/Upload/manual/kit/E0022Mo.doc>. [Diakses pada 28 September 2021]
- Lee, W. H., H. Il Choi, S. W. Hong, K. S. Kim, Y. S. Gho, dan S. G. Jeon. 2015. Vaccination with *Klebsiella Pneumoniae*-Derived Extracellular Vesicles Protects Against Bacteria-Induced Lethality Via Both Humoral And Cellular Immunity. *Experimental and Molecular Medicine*. 47(9)
- Martin, R. M., and B. 2018. Colonization, Infection, and The Accessory Genome Of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 8(4)

- Nirwati, H., K. Sinanjung, F. Fahrnunissa, F. Wijaya, S. Napitupulu, V. P. Hati, M. S. Hakim, A. Meliala, A. T. Aman, dan T. Nuryastuti. 2019. Biofilm Formation And Antibiotic Resistance of *Klebsiella Pneumoniae* Isolated from Clinical Samples in A Tertiary Care Hospital, Klaten, Indonesia. *BMC Proceedings*. 13(Suppl 11):1–8.
- Ostertagová, E. dan O. Ostertag. 2013. Methodology and Application Of Oneway Anova. *American Journal of Mechanical Engineering*. 1(7):256–261.
- Paczosa, M. K. 2016. *Klebsiella pneumoniae* : Going on The Offense With A Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80(3):629–661.
- Pennini, M. E., A. De Marco, M. Pelletier, J. Bonnell, R. Cvitkovic, M. Beltramello, E. Camerini, S. Bianchi, F. Zatta, W. Zhao, X. Xiao, M. M. Camara, A. DiGiandomenico, E. Semenova, A. Lanzavecchia, P. Warrener, J. Suzich, Q. Wang, D. Corti, dan C. K. Stover. 2017. Immune Stealth-Driven O2 Serotype Prevalence And Potential For Therapeutic Antibodies Against Multidrug Resistant *Klebsiella Pneumoniae*. *Nature Communications*. 8(1):1–12.
- Podmirseg SR, Jäkel H, Ranches GD, K. M. dan H. L. Sohm B, Villunger A, Lindner H. 2016. Caspases Uncouple P27kip1 from Cell Cycle Regulated Degradation and Abolish Its Ability to Stimulate Cell Migration and Invasion. *Oncogen*. 35(35):4580–4590.
- Produced, I.-, M. S. Cells, H. F. Peñaloza, L. P. Noguera, D. Ahn, O. P. Vallejos, R. M. Castellanos, dan Y. Vazquez. 2019. Interleukin-10 Produced by Myeloid-Derived Suppressor Cells Provides Protection to Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 258 By Enhancing Its Clearance in The Airways. *Infection and Immunity*. 87(5):1–15.
- Ratundima, E., I. Suartha, dan I. Ngurah Kade Mahardhika. 2012. Deteksi antibodi Terhadap Virus Classical Swine Fever dengan Teknik Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Indonesia Medicus Veterinus*. 1(2):217–227.
- Rofii, M., H. Satoto, dan M. S. Harahap. 2012. Perbandingan Kadar Il-10 Serum Dengan dan Tanpa Infiltrasi Levobupivakain Pada Nyeri Pasca Insisi. *JAI (Jurnal Anestesiologi Indonesia)*. 2(2)
- Rojas, J. M., M. Avia, V. Martín, dan N. Sevilla. 2017. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. *Journal of Immunology Research*. 2017
- Rosyanti, L., R. Devianti, I. Hadi, dan S. Syahrianti. 2017. Hubungan Antara Depresi Dengan Sistem Neuroimun (Sitokin-Hpa Aksis). *Health Information : Jurnal Penelitian*. 9(2):35–52. masukan ae
- Russo, T. 2019. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Microbiology*.

32(3):1–42.

Sevilla, R., L. E. Gomez, J. Manzanera, dan S. M. Martin JAR. 2019. Active Immunoprophylaxis with Uromune Decreases The Recurrence of Urinary Tract Infections at Three and Six Months After Treatment Without Relevant Secondary Effects. *BMC Infect Dis.* 19(1):901.

Shah, K. 2016. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): The Basics. *Br J Hosp Med (Lond).* 77(7):98–101.

Shantanam, S. 2018. IL-10 as Chemoattractant On Mice With Pneumonia . *Physiology & Behavior.* 176(1):139–148.

Simmonds, A. 2017. Clinical Implications of Genomic Adaptation and Evolution of Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae*. *Journal Of Infectious Diseases.* 215(1):18–27.

Stevani, H. 2016. *Praktikum Farmakologi*. Edisi 1. Jakarta: Kemenkes RI.

Sudiono, J. 2014. Sistem Kekebalan Tubuh. *Penerbit Buku Kedokteran EGC.* 1–86.

Sukarjati, S. Amilah, dan Sudjarwo. 2018. TOXICITY of 32.2 kda mw Escherichia Coli Pili Adhesin Isolated from Infertile. *Folia Medica Indonesiana.* 54(2):146–154.

Swarjana, I. K. 2016. *Statistik Kesehatan*. Edisi 1. Yogyakarta: Penerbit Andi.

Use, I., M. History, M. Provided, R. Deterioration. 1942. Total Protein Reagent Set Total Protein ( Biuret ) Reagent Set

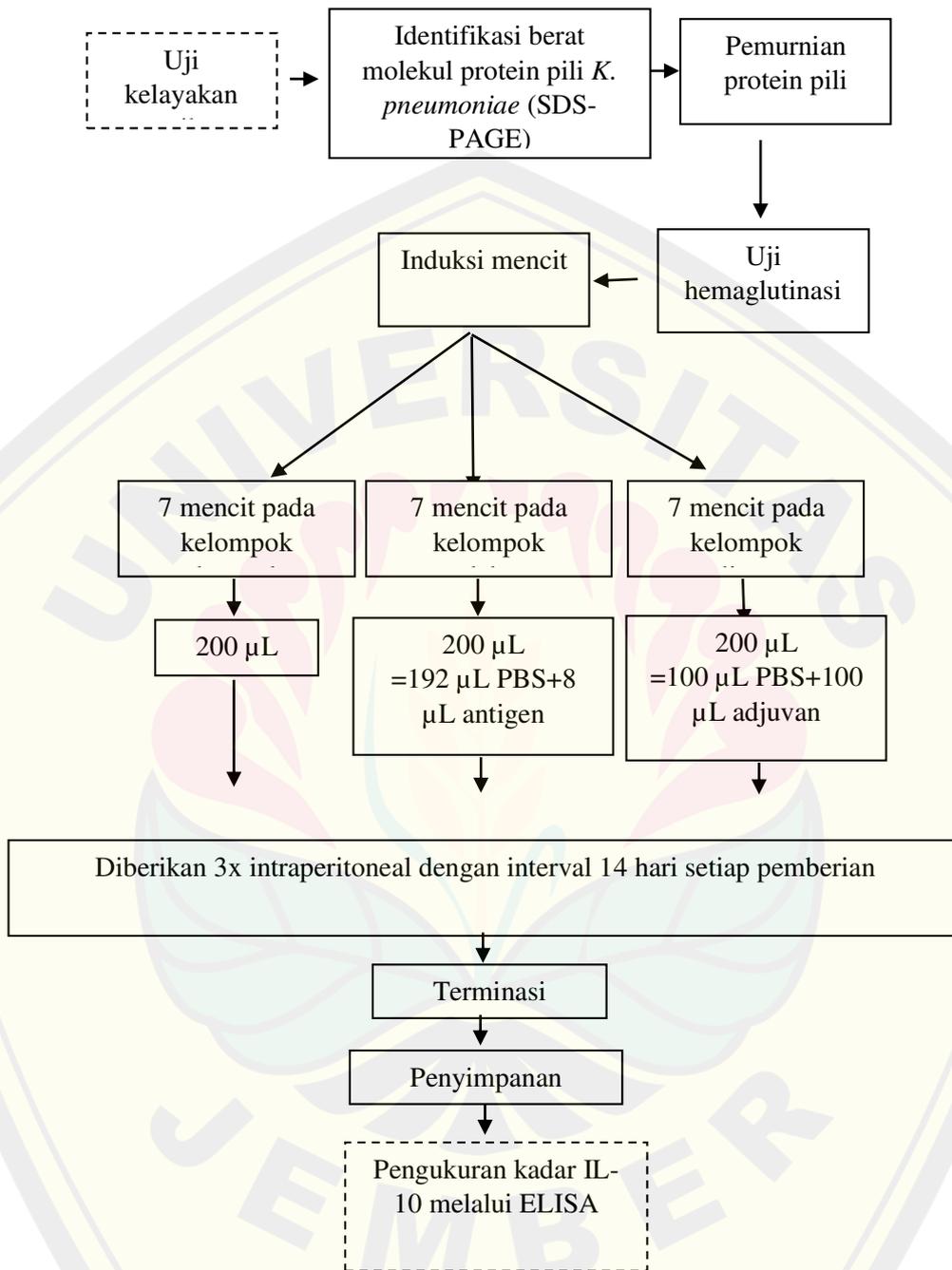
Virawan, H., T. Nuryastuti, dan H. Nirwati. 2020. Multidrugresistant *Klebsiella pneumoniae* from Clinical Isolates at Dr. Soeradji Tirtonegoro Central Hospital Klaten. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan Indonesia.* 11(2):109–120.

Yang, B. 2018. First experience in The Uk of Treating Women with Recurrent Urinary Tract Infections with The Bacterial Vaccine Uromune®. *BJU Int.* 121(2):289–292.

Zandi, M. 2020. Construction and Development of Fimh Lectin Domain for Rising Immune Response After Injection by Uropathogenic E. Coli. *Hum Antibodies.* 28(2):168–178.

Zhang, M., L. Pan, D. Xu, C. Cao, R. Shi, S. Han, J. Liu, X. Li, dan M. Li. 2018. The Nfkb Signaling Pathway Serves An Important Regulatory Role in *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscesses. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 15(6):5443–5449.

**Lampiran 1 Rancangan Penelitian**



Keterangan:

□ = sudah diteliti/dilakukan    - - - - - = akan diteliti/dilakukan

Lampiran 2 Hasil Uji ELISA



|   | 1            | 2            | 3            | 4            | 5            | 6            |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| A | 001<br>1.322 | 002<br>1.254 | 003<br>0.772 | 004<br>0.759 | 005<br>0.587 | 006<br>0.540 |
| B | 013<br>0.662 | 014<br>0.560 | 015<br>0.774 | 016<br>0.615 | 017<br>0.598 | 018<br>0.626 |
| C | 025<br>0.579 | 026<br>0.575 | 027<br>0.497 | 028<br>0.579 | 029<br>0.582 | 030<br>0.615 |
| D | 037<br>0.536 | 038<br>0.627 | 039<br>0.669 | 040<br>0.534 | 041<br>0.625 | 042<br>0.618 |
| E | 049<br>0.585 | 050<br>0.537 | 051<br>0.445 | 052<br>0.482 | 053<br>0.438 | 054<br>0.630 |
| F | 061<br>0.601 | 062<br>0.603 | 063<br>0.534 | 064<br>0.559 | 065<br>0.635 | 066<br>0.570 |
| G | 073<br>0.556 | 074<br>0.600 | 075<br>0.522 | 076<br>0.514 | 077<br>0.535 | 078<br>0.581 |
| H | 085<br>0.534 | 086<br>0.536 | 087<br>0.533 | 088<br>0.514 | 089<br>0.503 | 090<br>0.791 |

7-12>> Send Result Print Exit

|   | 7            | 8            | 9            | 10           | 11           | 12           |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| A | 007<br>0.372 | 008<br>0.381 | 009<br>0.284 | 010<br>0.278 | 011<br>0.154 | 012<br>0.190 |
| B | 019<br>0.735 | 020<br>0.633 | 021<br>0.580 | 022<br>0.601 | 023<br>0.725 | 024<br>0.675 |
| C | 031<br>0.677 | 032<br>0.577 | 033<br>0.656 | 034<br>0.616 | 035<br>0.789 | 036<br>0.684 |
| D | 043<br>0.543 | 044<br>0.542 | 045<br>0.619 | 046<br>0.574 | 047<br>0.602 | 048<br>0.550 |
| E | 055<br>0.640 | 056<br>0.587 | 057<br>0.582 | 058<br>0.715 | 059<br>0.512 | 060<br>0.572 |
| F | 067<br>0.657 | 068<br>0.571 | 069<br>0.666 | 070<br>0.582 | 071<br>0.835 | 072<br>0.522 |
| G | 079<br>0.657 | 080<br>0.508 | 081<br>0.585 | 082<br>0.526 | 083<br>0.717 | 084<br>0.594 |
| H | 091<br>0.586 | 092<br>0.679 | 093<br>0.613 | 094<br>0.524 | 095<br>0.499 | 096<br>0.614 |

1-6<< Send Result Print Exit

**Lampiran 3 Tabel Uji Deskriptif, Tes Homogenitas, Tes Normalitas, *One way Anova*, dan Uji *Post Hoc***

**Descriptives**

DATA

|           | Mean      | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|-----------|-----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|           |           |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| Kontrol   | 394.60317 | 43.938924      | 16.607352  | 353.96645                        | 435.23990   | 344.444 | 472.222 |
| perlakuan | 454.28571 | 74.110441      | 28.011114  | 385.74499                        | 522.82644   | 365.556 | 598.889 |
| adjuvant  | 340.47619 | 56.613472      | 21.397881  | 288.11746                        | 392.83492   | 237.222 | 412.778 |
| Total     | 396.45503 | 73.871025      | 16.119979  | 362.82934                        | 430.08071   | 237.222 | 598.889 |

**Test Results**

|         |              |
|---------|--------------|
| Box's M | 1.612        |
| F       | Approx. .750 |
| df1     | 2            |
| df2     | 729.000      |
| Sig.    | .473         |

Tests null hypothesis of equal population covariance matrices.

**Tests of Normality**

|      | Kelompok  | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |       | Shapiro-Wilk |    |      |
|------|-----------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
|      |           | Statistic                       | df | Sig.  | Statistic    | df | Sig. |
| DATA | Kontrol   | .166                            | 7  | .200* | .945         | 7  | .686 |
|      | perlakuan | .250                            | 7  | .200* | .907         | 7  | .373 |
|      | adjuvant  | .187                            | 7  | .200* | .957         | 7  | .796 |

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

a. Lilliefors Significance Correction

**ANOVA**

DATA

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | 45370.135      | 2  | 22685.068   | 6.403 | .008 |
| Within Groups  | 63768.430      | 18 | 3542.691    |       |      |
| Total          | 109138.566     | 20 |             |       |      |

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: DATA

|            | (I)<br>Kelompok | (J)<br>Kelompok | Mean                | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |                |
|------------|-----------------|-----------------|---------------------|------------|------|-------------------------|----------------|
|            |                 |                 | Difference<br>(I-J) |            |      | Lower<br>Bound          | Upper<br>Bound |
| Bonferroni | Kontrol         | perlakuan       | -59.682540          | 31.815048  | .231 | -143.64706              | 24.28198       |
|            |                 | adjuvant        | 54.126984           | 31.815048  | .318 | -29.83754               | 138.09150      |
|            | perlakuan       | Kontrol         | 59.682540           | 31.815048  | .231 | -24.28198               | 143.64706      |
|            |                 | adjuvant        | 113.809524*         | 31.815048  | .006 | 29.84500                | 197.77404      |
|            | adjuvant        | Kontrol         | -54.126984          | 31.815048  | .318 | -138.09150              | 29.83754       |
|            |                 | perlakuan       | -113.809524*        | 31.815048  | .006 | -197.77404              | -29.84500      |
|            | adjuvant        | adjuvant        | 54.126984           | 27.086407  | .157 | -18.73934               | 126.99331      |
|            |                 | perlakuan       | 59.682540           | 32.564193  | .210 | -29.95586               | 149.32094      |
|            | adjuvant        | adjuvant        | 113.809524*         | 35.248997  | .020 | 18.88730                | 208.73174      |
|            |                 | Kontrol         | -54.126984          | 27.086407  | .157 | -126.99331              | 18.73934       |
|            | adjuvant        | perlakuan       | -113.809524*        | 35.248997  | .020 | -208.73174              | -18.88730      |

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## Lampiran 4 Lembar Persetujuan Etik Penelitian



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
UNIVERSITAS JEMBER

KOMITE ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember  
68121 – Email : fk\_unej@telkom.net

**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK**  
**ETHICAL APPROVAL**

Nomor : 1.540 /H25.1.11/KE/2021

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 :*

**INDUKSI INTRAPERITONEAL PROTEIN PILI 65 kDa *Klebsiella pneumoniae* PADA MENCIT GALUR BALB/c UNTUK MENINGKATKAN KADAR IL-10 DAN IFN  $\lambda$ .**

Peneliti Utama : dr. Dini Agustina, M.Biomed.  
*Name of the principal investigator*

NIM : 198308012008122003

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember  
*Name of institution*

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

Jember, 23 Juli 2021  
Ketua Komite Etik Penelitian  
  
Dr. dr. Rini Riyanti, Sp.PK