



**PERAN *OUTER MEMBRANE PROTEIN* (OMP) 23 kDa
BAKTERI *Klebsiella pneumoniae* SEBAGAI PROTEIN
HEMAGLUTININ DAN ADHESIN**

SKRIPSI

Oleh

**Astri Mutia Saraswati
NIM 152010101087**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**PERAN *OUTER MEMBRANE PROTEIN* (OMP) 23 kDa
BAKTERI *Klebsiella pneumoniae* SEBAGAI PROTEIN
HEMAGLUTININ DAN ADHESIN**

SKRIPSI

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

Oleh

**Astri Mutia Saraswati
NIM 152010101087**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, Tuhan satu-satunya yang saya miliki. Dzat yang menggenggam hidup dan mati saya. Dzat yang maha mulia yang tidak pernah dzalim terhadap hambaNya dan Dzat yang Maha benar. Tuhan yang menjamin rezeki setiap hambaNya yang selalu ada, menyayangi dan menjaga saya. Dzat yang sangat saya cintai satu-satunya tempat saya berharap dan bersimpuh;
2. Nabi Muhammad SAW, seorang rasul yang sangat saya kagumi baik sifat dan perangainya. Kecintaan kepada umatnya yang begitu besar membuat saya rindu padanya. Seseorang yang selalu menjadi panutan saya untuk bertindak dan berperilaku;
3. Ibunda Eni Retnowati dan ayahanda Raspan yang selalu tulus menyayangi dan mencintai saya serta kakak satu-satunya yang saya miliki Eka Dharma Rasiawan dan keponakan saya Nararya Dewabrata Al Khalid yang saya sayangi, semoga selalu dalam perlindungan Allah SWT;
4. Seluruh guru dan dosen yang telah dengan sabar mendidik saya sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTO

Dialah yang menciptakan langit dan bumi dalam enam masa: Kemudian Dia bersemayam di atas ‘Arsy. Dia mengetahui apa yang masuk ke dalam bumi dan apa yang keluar daripadanya dan apa yang turun dari langit dan apa yang naik kepada-Nya. Dan dia bersama kamu di mana saja kamu berada. Dan Allah Maha Melihat apa yang kamu kerjakan.

[Terjemahan QS. *Al-Hadid* ayat 4]

*)Departemen Agama Republik Indonesia. 2011. *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Bandung: CV Diponegoro

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Astri Mutia Saraswati

NIM : 152010101087

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Peran *Outer Membrane Protein* (OMP) 23 kDa Bakteri *Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, 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 mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Januari 2019
Yang menyatakan,

Astri Mutia Saraswati
NIM 152010101087

SKRIPSI

**PERAN *OUTER MEMBRANE PROTEIN* (OMP) 23 kDa
BAKTERI *Klebsiella pneumoniae* SEBAGAI PROTEIN
HEMAGLUTININ DAN ADHESIN**

Oleh

Astri Mutia Saraswati
NIM 152010101087

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : dr. Dini Agustina, M. Biomed
Dosen Pembimbing Anggota : dr. Yudha Nurdian, M. Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Peran *Outer Membrane Protein* (OMP) 23 kDa Bakteri *Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemaglutinin dan Adhesin” karya Astri Mutia Saraswati telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

Dr. dr. Diana Chusna Mufida, M. Kes
NIP 197203182003122001

dr. Angga Mardro Raharjo, Sp. P
NIP 198003052008121002

Anggota II,

Anggota III,

dr. Dini Agustina, M. Biomed
NIP 198308012008122003

dr. Yudha Nurdian, M. Kes
NIP 197110191999031001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

dr. Supangat, M.Kes, Ph.D, Sp.BA
NIP 19730424 199903 1002

RINGKASAN

Peran *Outer Membrane Protein* (OMP) 23 kDa Bakteri *Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin; Astri Mutia Saraswati,
152010101087; 2019; 51 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Klebsiella pneumoniae merupakan patogen oportunistik yang dapat menyebabkan infeksi pada alveoli paru (pneumonia), infeksi saluran kencing, bakterimia, abses liver dan beberapa penyakit lain (Brisse, 2009; Pacsoza dan Meczaz, 2016). *Klebsiella pneumoniae* memiliki beberapa faktor virulensi yang digunakan untuk melawan pertahanan tubuh inang yang terdiri dari kapsul polisakarida, lipopolisakarida, faktor adhesin fimbrial dan nonfimbrial (Brisse, *et al.*, 2009). Pili dan *Outer Membrane Protein* (OMP) merupakan contoh dari protein adhesin.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui peran OMP 23 kDa *K. pneumoniae* sebagai protein hemagglutinin dan adhesin. Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian observasional untuk mengetahui berat molekul OMP *K. pneumoniae* dan mengetahui OMP 23 kDa berperan sebagai protein hemagglutinin dan adhesin. Sampel berupa bakteri *K. pneumoniae* yang diambil dari isolat malang yang terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Variabel bebas pada uji adhesi pada penelitian ini adalah beberapa konsentrasi OMP 23 kDa yang dilakukan dengan pengenceran OMP 23 kDa, sedangkan variabel tergantung adalah indeks adhesi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel bakteri isolat malang adalah bakteri *K. pneumoniae*. Dibuktikan dengan pewarnaan Gram menunjukkan gambaran bakteri Gram negatif dan berbentuk batang. Selain itu dibuktikan dengan uji biokimiawi didapatkan hasil pada uji TSIA pada media terjadi perubahan warna kuning pada bagian *butt dan slant*. Pada uji Indol didapatkan hasil negatif, Methyl Red (MR) negatif, Voges-proskauer (VP) positif dan sitrat positif. Kemudian bakteri dilakukan elektroforesis untuk mengetahui berat molekul OMP pada bakteri tersebut. Pada penelitian ini OMP *K. pneumoniae* memiliki berat molekul 32 kDa, 26 kDa, 23 kDa, 20 kDa, 17 kDa dan 12 kDa.

Band dengan protein yang menunjukkan 23 kDa dipotong kemudian dilakukan elektroelusi dan dialisis dilanjutkan dengan uji hemaglutinasi dan uji adhesi.

Pada uji hemaglutinasi didapatkan hasil bahwa proses hemaglutinasi terjadi pada pengenceran 1/2 dan 1/4 dengan titer hemaglutinasi pada pengenceran 1/4. Uji adhesi dilakukan dengan cara mencampurkan sel enterosit mencit dengan OMP 23 kDa yang diencerkan dengan titer pengenceran 0 (kontrol), 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000. Didapatkan hasil bahwa semakin tinggi konsentrasi maka indeks adhesi semakin kecil. Sehingga pada uji adhesi ini dibuktikan bahwa protein hemaglutinin OMP 23 kDa berperan sebagai protein adhesin. Hasil perhitungan indeks adhesi kemudian dilakukan uji normalitas, uji korelasi dan regresi. Didapatkan hasil uji normalitas dengan data yang terdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$. Karena data terdistribusi normal maka dilakukan uji korelasi dengan menggunakan uji korelasi pearson. Hasil uji korelasi didapatkan nilai $p < 0,05$ yaitu $p = 0,006$ dan nilai $r = - 0,667$ yang artinya besar konsentrasi dan indeks adhesi memiliki hubungan yang signifikan dan memiliki kekuatan hubungan yang tergolong kuat dengan arah hubungan yang negatif. Karena memiliki hubungan yang kuat maka dilanjutkan dengan uji regresi linier untuk mengetahui seberapa besar pengaruh titer pengenceran terhadap indeks adhesi. Hasil uji regresi didapatkan nilai $R^2 = 0,459$ (45,9%) artinya konsentrasi OMP 23 kDa berpengaruh 45,9% terhadap indeks adhesi.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat serta karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Peran *Outer Membrane Protein (OMP)* 23 kDa Bakteri *Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terimakasih kepada pihak-pihak sebagai berikut:

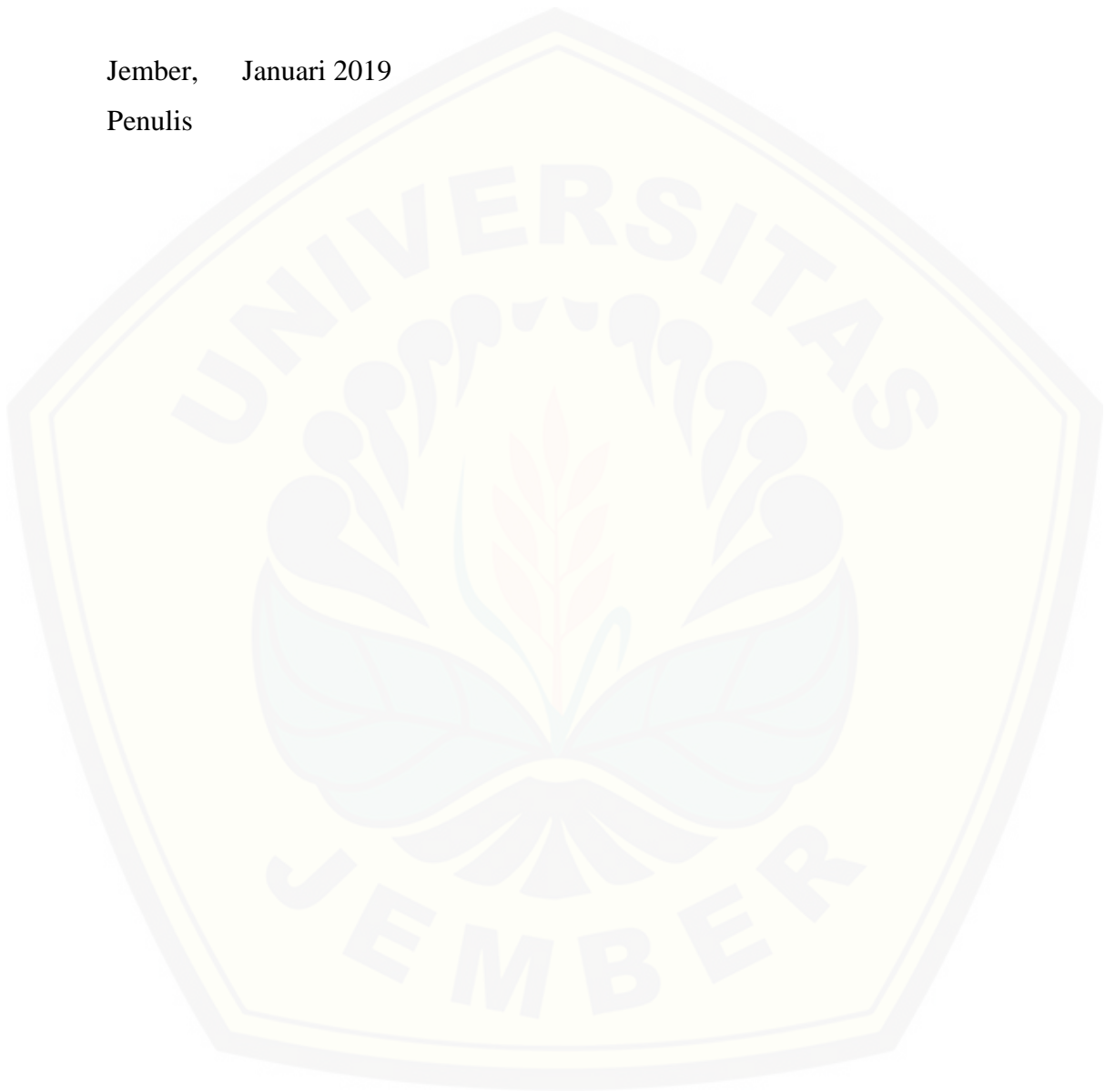
1. dr. Dini Agustina, M. Biomed selaku dosen pembimbing utama dan dr Yudha Nurdian, M. Kes selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
2. Dr. dr. Diana Chusna Mufida, M. Kes selaku Dosen Penguji I dan dr. Angga Mardro Raharjo, Sp. P selaku Dosen Penguji II atas segala saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
3. dr. Rena Normasari, M. Biomed selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
4. Kedua orang tua penulis yaitu Ayah Raspan dan Ibu Eny Retnowati yang telah mencintai dengan tulus, merawat dan mendidik penulis dengan penuh kasih sayang, tidak pernah lelah memberikan dukungan serta semangat kepada penulis;
5. Kakak saya Eka Dharma Rasiawan dan keponakan Nararya Dewabrata Al khalid serta keluarga besar penulis, yang mencintai, mendoakan, dan salah satu sumber motivasi penulis untuk mengusahakan yang terbaik untuk menjadi dokter;
6. teman-teman rekan kerja saya selama penelitian dalam keris mikrobiologi, Bima Setia Sandya Nugraha, Hanifa Rizki, Kirana Nadyatara, Regina Finka Dita dan Laila Rizqi Kurniawati, terimakasih atas kerjasama dan dukungan yang diberikan kepada penulis selama penelitian;

7. teman-teman kos BARA 12, Adisty Norandari, Nanda Hardienningrum, Yoshe Gassarine dan Fika Murti yang telah menemani sehari-hari saya selama berada di kosan;
8. sahabat-sahabat terbaik saya, Adisty Norandari, Indah Permata Solicha, Laila Rizqi Kurniawati, Azizah Mursyidati, Habib Mustofa, Bima Setia Sandya Nugraha, yang selalu menyayangi, ada di saat saya membutuhkan, dan menggandeng saya untuk selalu berbuat baik dan mendekatkan diri pada Allah;
9. Teman-teman grup liburan sekaligus sahabat saya, Adinningtyas Intansari, Fatihah Mardiana, Ika Aulia, Rangga Okta, Mizan Maulana, Eko Dakholal, Miftakhul Huda, dan beberapa teman yang lain yang sudah disebutkan di atas, yang selalu membuat suasana liburan saya menjadi menyenangkan dan berkesan;
10. Teman-teman lain, Laila Aulia Noviyanti, Rida rufaida, Aditya Primadana, Cagar Irwin Taufan, Toyibatul Hidayati, Asri Ayu Firdausi, Indi Kamilia, Nuno Febrian, Prilia Widyana Putri dan Asyifa Hilda yang mendukung, membantu penulis dalam memenuhi persyaratan skripsi dan mengajarkan banyak hal;
11. Teman-teman yang membantu saya dalam perhitungan variabel, Adisty Norandari, Rezza Putri, Fais Dina Artika, Britta Fatika, Erviana, Dria Candra, dan Nuno Febrian terimakasih telah meluangkan waktu istirahat sampai begadang untuk membantu penulis;
12. Teman-teman KKN 04 desa Purwoasri Kecamatan Gumukmas, yang telah mendukung dan menyemangati saya untuk mengerjakan skripsi dan lulus tepat waktu;
13. rekan sejawat mahasiswa Fakultas Kedokteran Coccyx angkatan 2015 atas kebersamaan dan persaudaraan selama ini;
14. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terimakasih atas segala bantuan dan kerjasamanya.

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

Jember, Januari 2019

Penulis

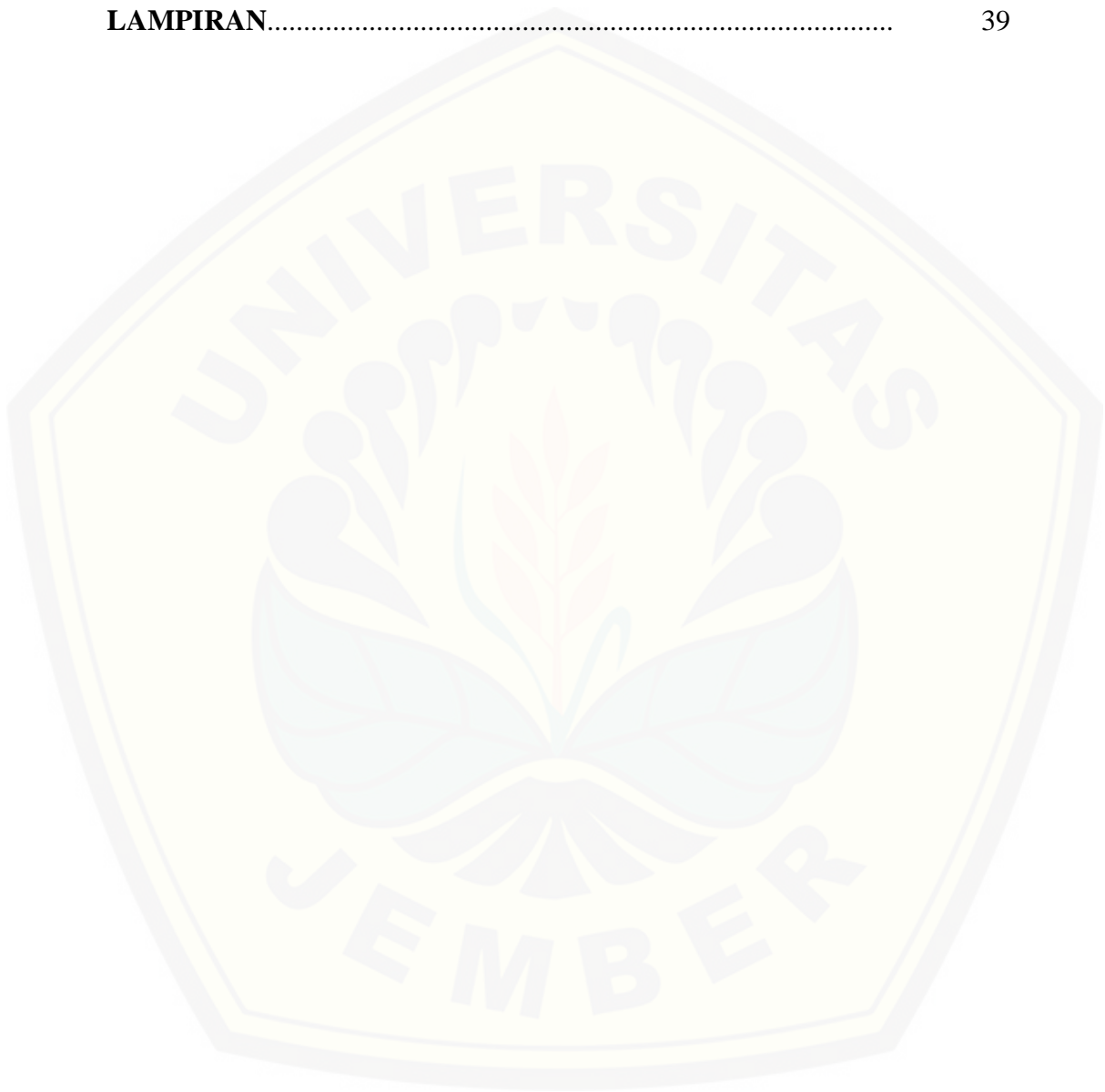


DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	3
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
1.4.1 Manfaat Teoritis	3
1.4.2 Manfaat Aplikatif	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 <i>Klebsiella Pneumoniae</i>	4
2.1.1 Morfologi dan Taksonomi	4
2.1.2 Epidemiologi dan Transmisi	4
2.1.3 Faktor Virulensi	5
2.2 Sistem Imun	9
2.3 Kerangka Konsep Penelitian	13

2.4 Hipotesis	14
BAB 3. METODE PENELITIAN	15
3.1 Jenis Penelitian	15
3.2 Rancangan Penelitian	15
3.3 Sampel Penelitian	15
3.4 Tempat dan Waktu Penelitian	16
3.5 Variabel Penelitian	16
3.5.1 Variabel Dependen	16
3.5.2 Variabel Independen	16
3.6 Definisi Operasional dan Skala Pengukurannya	16
3.7 Instrumen Penelitian	17
3.7.1 Alat Penelitian	17
3.7.2 Bahan Penelitian	17
3.8 Prosedur Penelitian	17
3.8.1 Identifikasi dan Kultur <i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
3.8.2 Isolasi OMP	18
3.8.3 Identifikasi berat molekul OMP dengan elektroforesis (SDS-PAGE)	18
3.8.4 Pemurnian OMP dengan Metode Elektroelusi dan Dialisis	19
3.8.5 Uji Hemaglutinasi OMP	19
3.8.6 Isolasi Sel Enterosit Mencit	20
3.8.7 Uji Adhesi OMP	20
3.9 Analisis Data	21
3.10 Alur Penelitian	21
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1 Identifikasi Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
4.2 Identifikasi Berat Molekul <i>Outer Membrane Protein</i>	26
4.3 Uji Hemaglutinasi	28
4.4 Uji Adhesi	29

BAB 5. PENUTUP	33
5.1 Kesimpulan.....	33
5.2 Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN	39



DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Definisi Operasional.....	16
3.2 Hasil Perhitungan Indeks Adhesi OMP 23 kDa.....	30



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Sel-sel yang terlibat dalam sistem imun	10
2.2 Kerangka Konsep Penelitian	13
3.2 Skema Alur Penelitian.....	22
4.1 Hasil Pewarnaan Gram Bakteri Isolat Malang dengan Mikroskop Perbesaran 1000x.....	23
4.2 Uji Biokimia Sampel Bakteri Malang.....	24
4.3 Hasil <i>Gel Doc</i> Berat Molekul Pili dan OMP Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i>	27
4.4 Uji Hemaglutinasi	28
4.5 Uji Adhesi	29
4.6 Grafik Korelasi Antara Indeks Adhesi dengan Titer Pengenceran	31

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Prosedur Kultur <i>Klebsiella pneumoniae</i>	39
3.2 Prosedur Isolasi OMP	40
3.3 Prosedur Identifikasi berat molekul OMP dengan elektroforesis (SDS-PAGE)	41
3.4 Prosedur Pemurnian OMP dengan Metode Elektroelusi dan Dialisis	42
3.5 Prosedur Uji Hemaglutinasi OMP	43
3.6 Prosedur Isolasi Sel Enterosit Mencit	44
3.7 Prosedur Uji Adhesi OMP	45
3.8 Penggunaan Alat Pelindung Diri (APD)	46
3.9 Tata Cara Pembuangan Limbah Mikrobiologi.....	47
3.10 Hasil Statistik Uji Adhesi.....	48
3.11 Keterangan Bebas Plagiasi.....	49
3.12 Etik Keris Mikrobiologi	50
3.13 Etik Penelitian	51

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi merupakan salah satu permasalahan dalam bidang kesehatan bagi negara-negara berkembang khususnya Indonesia yang beriklim tropis. Salah satu penyebab infeksi pada manusia adalah bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Bakteri ini merupakan bakteri Gram negatif yang biasa ditemukan di mulut, kulit, usus serta juga terdapat di lingkungan alam (Wu dan Li, 2015). Ketika *K. pneumoniae* keluar dari habitatnya kemudian masuk ke jaringan lain, maka bakteri yang awalnya berperan sebagai flora normal akan menyebabkan infeksi berat pada manusia. Bakteri ini bersifat oportunistik sehingga lebih sering menyerang pasien yang imunokompromais dan pasien yang menderita penyakit dasar berat seperti diabetes mellitus atau penyumbatan saluran pernafasan kronis. Namun baru-baru ini ditemukan strain yang hipervirulen yang tidak hanya menyebabkan infeksi pada seseorang yang imunokompromais tetapi juga dapat menyerang seseorang yang *immunosufficient* (Podschun dan Ullmann, 1998; Paczosa dan Meccas, 2016).

Klebsiella pneumoniae dapat menyebabkan infeksi pada alveoli paru (pneumonia), infeksi saluran kencing, bakterimia, abses liver dan beberapa penyakit lain (Brise, 2009; Paczosa dan Meccas, 2016). Menurut Pedoman Diagnosis dan Penatalaksanaan di Indonesia (PDPI) tahun 2014 menyatakan bahwa pada tahun 2010 dari beberapa rumah sakit di Indonesia, *K. pneumoniae* merupakan salah satu bakteri terbanyak penyebab *Community-Acquired Pneumonia* (CAP) yang ditemukan pada sputum pasien di beberapa rumah sakit di Indonesia. Bakteri *K. pneumoniae* dapat menimbulkan CAP yang menyebabkan infeksi serius serta bersifat progresif dengan angka morbiditas dan mortalitas tinggi. Angka kematian yang tinggi ini di berbagai negara disebut agen *friedlander's* (Tarina dan Kusuma, 2017). Selain menyebabkan CAP, Bakteri *K. pneumoniae* dapat menyebabkan 11.8% *Hospital-Acquired Pneumonia* (HAP) di 183 rumah sakit di Amerika (Magill, dkk., 2014). *Klebsiella pneumoniae*

merupakan bakteri terbanyak ketiga penyebab infeksi saluran kencing *complicated* setelah *E. coli* dan *enterococcus spp.* dan menjadi penyebab kedua infeksi saluran kencing *uncomplicated* dan bakterimia nosokomial setelah *E. Coli*. Apabila bakteri *K. pneumoniae* menginfeksi paru-paru, infeksi beresiko menyebar ke aliran darah sebesar 50% (Flores-Mireles dkk., 2015; Paczosa dan Mecsas, 2016).

Seiring dengan angka kejadian infeksi akibat *K. pneumoniae* yang cukup tinggi, saat ini telah banyak dikembangkan berbagai pengobatan. Obat-obat golongan beta laktam seperti meropenem, kloramfenikol, siprofloksasin dan ampicilin digunakan untuk mengatasi infeksi akibat *K. pneumoniae* (Tarina dan Kusuma, 2017). Namun, *K. pneumoniae* telah mengalami banyak resistensi terhadap antibiotik. Bakteri ini mengekspresi ESBLs (*Extended-Spectrum B-Lactamases*) atau mengekspresi carbapenemases. Menurut pendapat Paczosa dan Meczsa (2016) yang dikutip dari penelitian CDC tahun 2013 menyebutkan bahwa berdasarkan survei tahun 2011 dari 183 rumah sakit Amerika, strain yang memproduksi ESBL menyebabkan 23% infeksi nosokomial akibat *K. pneumoniae* yang setara dengan 17.000 infeksi dengan 1100 kematian. Sedangkan pada *K. pneumoniae* yang resisten terhadap carbapenem menyebabkan 11% infeksi nosokomial yang setara dengan 7900 infeksi dengan 520 kematian.

Selain disebabkan karena resistensi antibiotik, *K. pneumoniae* memiliki beberapa faktor virulensi yang digunakan untuk melawan pertahanan tubuh inang. Faktor virulensi tersebut terdiri dari kapsul polisakarida, lipopolisakarida, *iron scavenging system/sidherophore*, protein adhesin fimbrae dan afimbrae (Brisse dkk., 2009). Fimbrae/pili dan afimbrae/ *Outer Membrane Protein* (OMP) merupakan contoh dari protein adhesin. *Outer Membrane Protein* memiliki daya perlekatan yang lebih kuat daripada pili (Pertiwi, dkk., 2009). Jika faktor adhesin ini tidak ada maka bakteri tidak dapat memulai untuk menginfeksi sel inang. Oleh karena itu salah satu cara untuk mencegah infeksi *K. pneumoniae* yaitu dengan menghambat protein adhesin untuk melakukan perlekatan dengan sel hospes. Penelitian tentang protein adhesin pada OMP *K. pneumoniae* masih terbatas, di Indonesia penelitian ini hanya dilakukan pada OMP dengan berat molekul 20

kDa, dan 40 kDa (Susilo, dkk., 2004; Pertiwi, dkk., 2009). Namun penelitian mengenai OMP dengan berat molekul 23 kDa serta karakterisasinya masih belum ada. Selain itu, OMP 23 kDa ini bersifat imunogenik karena protein yang bersifat imunogenik memiliki berat molekul 20 kDa – 100 kDa, sedangkan protein dengan berat molekul kurang dari 10 kDa biasanya tidak bersifat imunogenik (Pertiwi, dkk., 2009). Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui peran OMP 23 kDa *K. pneumoniae* sebagai protein hemagglutinin dan adhesin yang nantinya diharapkan dapat menjadi vaksin sebagai agen pencegahan infeksi *K. pneumoniae*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka permasalahan yang dapat dirumuskan adalah apakah OMP 23 kDa *K. pneumoniae* memiliki peran sebagai protein hemagglutinin dan adhesin?

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui peran OMP 23 kDa *K. pneumoniae* sebagai protein hemagglutinin dan adhesin.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan mengenai OMP 23 kDa *K. pneumoniae* sebagai protein hemagglutinin dan adhesin yang merupakan faktor virulensi.

1.4.2 Manfaat Aplikatif

Hasil penelitian diharapkan dapat menjadi dasar untuk penelitian lebih lanjut, setelah mengetahui berat molekul OMP *K. pneumoniae* dan fungsinya sebagai protein hemagglutinin dan adhesin maka dapat dilanjutkan dengan penelitian secara *in vivo* yang kemudian dapat menjadi bahan untuk pembuatan vaksin dan dapat dijadikan kit diagnostik untuk berbagai infeksi akibat *K. pneumoniae*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Klebsiella Pneumoniae*

2.1.1 Morfologi dan Taksonomi

Klebsiella pneumoniae merupakan salah satu bakteri Gram negatif golongan enterobacteriae. Berukuran 0,5-0,5x1,2 μ dan berbentuk batang pendek, tidak membentuk spora dan memiliki kapsul polisakarida yang besar. Bakteri ini bersifat nonmotil karena tidak memiliki flagela dan termasuk dalam bakteri fakultatif anaerob. Bakteri tersebut dapat menghasilkan gas dan asam hasil fermentasi dari karbohidrat serta juga dapat memfermentasikan laktosa (Tarina dan Kusuma, 2017). Selain itu *K. pneumoniae* memproduksi lysine decarboxylase namun tidak memproduksi ornithine decarboxylase. Pada media tanam bakteri ini membentuk koloni yang mukoid (Kumar dkk., 2013).

Menurut *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) , *K. pneumoniae* memiliki taksonomi sebagai berikut;

Domain	Bacteriae
Phylum	Proteobacteria
Class	Gammaproteobacteria
Order	Enterobacterales
Family	Enterobacteriaceae
Genus	<i>Klebsiella</i>
Species	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Schroeter

Selain itu, bakteri ini memiliki nama lain seperti *Bacillus pneumoniae*, *Bacterium pneumoniae crouposae*, *Hyalococcus pneumoniae*, *K. aerogenes* dan *K. pneumoniae aerogenes*.

2.1.2 Epidemiologi dan Transmisi

Klebsiella pneumoniae biasanya ditemukan pada 2 habitat yaitu lingkungan dan mukosa mamalia. Di lingkungan biasanya ditemukan di permukaan air, vegetasi dan tanah. Sedangkan pada mukosa sering sebagai saprofit pada nasofaring dan mukosa usus. Bakteri ini bersifat oportunistik

biasanya menyerang pasien dengan imunokompromais. *K. pneumoniae* sering berkoloni di saluran pencernaan dan orofaring. Pada kondisi tertentu, dari organ tersebut bakteri dapat masuk ke jaringan lain yang kemudian menjadi patogen (Pacsoza dan Mecsas, 2016).

Klebsiella pneumoniae dapat menyebabkan infeksi saluran kencing, pneumonia maupun infeksi nosokomial. Transmisi bakteri ini dapat melalui peralatan medis yang sudah terkontaminasi bakteri, produk darah dan dari tangan petugas kesehatan di rumah sakit (Podschun dan Ullmann, 1998). Bakteri tersebut dapat ditemukan dalam sampel urin, darah, cairan pleura dan luka. Pada manusia baik yang mengalami immunodefisiensi atau imunokompromais semakin meningkatkan resiko ditemukannya bakteri *K. pneumoniae* pada paru-paru, saluran kencing, darah, hati dan organ lain. Selain itu bakteri oportunistik ini dapat menyebabkan meningitis dan abses prostat walaupun jarang (Brisse, 2009; Wu dan Li, 2015).

2.1.3 Faktor Virulensi

Terdapat 5 faktor patogenesitas utama dari bakteri *K. pneumoniae* yaitu terdapat kapsul polisakarida, lipopolisakarida, *iron scavenging system/sidherophore*, protein adhesin yaitu fimbrae dan afimbrae (Brisse dkk., 2009). Proses infeksi bermula dari kontak langsung bakteri dengan sel hospes melalui protein adhesin pada pili atau dengan afimbriae adhesi. Cara kerja protein adhesin pada bakteri Gram negatif yaitu dengan cara mengaglutinasi eritrosit sehingga disebut protein hemaglutinin (Hidayati, 2010).

Faktor virulensi pada *K. pneumoniae* antara lain :

a. Kapsul Polisakarida

Kapsul polisakarida merupakan lapisan luar tebal yang berfungsi sebagai pelindung bakteri terhadap C3 terutama dalam penghambatan makrofag dan fagositosis. Kapsul ini bagi bakteri berfungsi untuk menghambat dan menghindari fagositosis dari sel inang, menginduksi pematangan sel dendritik dan menetralkan aktivitas antibakteri dari hospes. Kapsul polisakarida pada *Klebsiella spp.* menghasilkan beberapa tipe antigen spesifik. Baru-baru ini ditemukan 77 antigen

spesifik sehingga dapat digunakan untuk membedakan antar strain pada infeksi klinis (Cleeg dan Murphy, 2016). Sedangkan menurut Pacsoza dan Meczaz (2016) menyebutkan bahwa strain spesifik kapsul polisakarida disebut antigenik k1 dan k2 sampai k78. Namun, k1 dan k2 memiliki tingkat virulensi paling tinggi dibandingkan dengan antigen lain. Sedangkan pada *K. pneumoniae*, k2 lebih banyak diisolasi dibandingkan dengan k1. Antigen k1 dan k2 menginduksi ROS pada sel inang, lebih resisten terhadap fagositosis dan intraseluler *killing* oleh neutrofil dan makrofag di alveolar serta antigen ini memproduksi asam sialic yang mirip dengan asam sialat yang diproduksi oleh sel inang sehingga terhindar dari respon imun inang.

b. Lipopolisakarida

Lipopolisakarida merupakan komponen utama pada membran luar dari semua bakteri Gram negatif. Dikenal juga dengan nama endotoksin. Lipopolisakarida terdiri dari lipid A, antigen O, dan inti (evrard dkk., 2010). Faktor virulensi ini penting untuk melindungi bakteri dari pertahanan humoral sel hospes tetapi juga dapat memicu aktivasi dari kekebalan hospes. Lipid A merupakan ligan yang poten untuk TLR4. Ketika TLR4 teraktivasi maka memicu produksi sitokin dan kemokin yang kemudian mengaktifkan respon seluler termasuk neutrofil dan makrofag. Oleh karena itu, ada beberapa strain *K. pneumoniae* memodifikasi lipid A atau menggunakan kapsul untuk melindungi lipopolisakarida agar tidak terdeteksi oleh TLRs. Antigen O menyebabkan resistensi terhadap *complement-mediated killing*, sehingga *K. pneumoniae* dengan antigen O yang kurang, menjadikan strainnya kurang virulen (Paczosa dan Meczaz, 2016).

c. Protein Adhesin

Adhesi merupakan tahap awal patogen untuk bisa melakukan kolonisasi. Infeksi tidak dapat terjadi apabila bakteri tidak menempel/ adhesi pada sel inang (Anderson, dkk., 2007). Kemampuan adhesi pada sel inang dapat bersifat spesifik atau non spesifik. Dikatakan spesifik, apabila perlekatan bakteri diperantarai oleh reseptor sel inang yang mampu berikatan dengan antigen permukaan bakteri yang disebut dengan adhesin. Bakteri Gram negatif memiliki adhesin yang

diklasifikasikan menjadi 2 tipe yaitu fimbrial dan nonfimbrial. Sedangkan perlekatan yang tidak spesifik tidak melibatkan reseptor permukaan (Abrar dkk., 2013; Ray, dkk., 2002; Wibawan dkk., 1993).

1. Pili

Bakteri Gram negatif menghasilkan salah satu faktor adhesi yang disebut dengan pili atau fimbriae. Fungsi dari pili yaitu sebagai perantara interaksi bakteri dengan sel hospes. Fimbriae tipe 1 tipis berbentuk seperti benang yang terdapat pada permukaan sel bakteri. Tipe ini ditemukan pada 90% *K. pneumoniae* namun ditemukan pada hampir semua bakteri golongan enterobacteriae. Sedangkan fimbriae tipe 3 berbentuk helix dan hampir ditemukan pada semua isolat *K. pneumoniae*. Selain itu, fimbriae tipe 1 mengikat glikoprotein D-mannosylated sehingga sering disebut *mannose-sensitive*, sedangkan fimbriae tipe 3 bersifat *mannose-insensitive* namun mengikat protein matriks ekstraseluler. Setelah melakukan adhesi dengan sel hospes maka bakteri mulai membentuk koloni dan akhirnya terjadilah infeksi (Santoso, 2002).

2. OMP

Bakteri Gram negatif memiliki 2 membran yaitu membran dalam dan membran luar. Bagian membran terluar disebut juga dengan *outer membrane*. Pada strain yang patogen, OMP berfungsi sebagai faktor virulensi dan mekanisme pertahanan terhadap sel hospes. *Outer membrane protein* merupakan bagian luar dari bakteri yang berkontak pertama kali dengan sekelilingnya. *Outer membrane protein* memiliki peran yang beragam, yaitu berperan sebagai faktor adhesi dalam virulensi, transportasi/ perantara dalam penyerapan nutrisi, reseptor *siderophore*, dan terdapat enzim seperti protease dan lipase (Rollauer dkk., 2015).

Kemampuan adhesi suatu bakteri dipengaruhi oleh keberadaan hemagglutinin pada permukaan bakteri. Hemagglutinin ini merupakan suatu zat yang memiliki peran dalam proses penggumpalan eritrosit (Naka dkk., 1995). Karena mampu mengaglutinasi eritrosit, protein yang memiliki hemagglutinin ini dapat melakukan adhesi pada inang karena reseptor dari membran eritrosit sama dengan reseptor pada mukosa inang (Fitrianingsih dan Milliana, 2016). Bakteri yang tidak memiliki hemagglutinin memiliki daya adhesi yang lemah dibanding

bakteri yang memiliki hemaglutinin yang menyebabkan bakteri akan semakin sulit untuk menyebabkan infeksi (Guli, 2016).

Pola-pola adhesi pada golongan enterobakteria secara *in vitro* sudah diteliti secara luas. *E. coli* yang diisolasi dari kotoran pasien yang mengalami diare, memiliki 3 pola adhesi, yaitu adhesi lokal, agregatif dan difus. Tipe pola adhesi lokal ditandai dengan bakteri yang membentuk mikrokoloni yang hanya berlekatan dengan sel. Pola adhesi agregatif ditandai dengan adhesi bakteri ke sel epitel dengan bertumpuk seperti batu bata. Pola difus ditandai dengan perlekatan yang hanya ke sel tidak ke *glass* tetapi terdistribusi secara merata ke sel (Gonzales dkk., 1997; Favre-Bonte dkk., 1995). Namun, berdasarkan penelitian Favre-Bonte dkk. (1995) menyebutkan bahwa dari 3 tipe adhesi tersebut, *K. pneumoniae* memiliki 2 tipe adhesi yaitu difus dan agregatif.

d. *Siderophore*

Setiap bakteri *K. pneumoniae* membutuhkan besi dari lingkungan untuk berkembang selama infeksi, namun besi yang berada di inang jumlahnya sedikit dalam plasma. Besi ini diikat oleh transport besi yang disebut transferin. Cara *K. pneumoniae* mendapatkan besi yaitu dengan mensekresi *siderophore* yang memiliki afinitas lebih tinggi daripada transferin dalam pengikatan besi. *Siderophore* ini mampu mencuri besi dari inang atau mengaisnya dari lingkungan. Strain-strain *K. pneumoniae* mengkode beberapa *siderophore* yang menimbulkan faktor virulensi yang berbeda-beda. Semakin banyak *siderophore* yang diproduksi maka kolonisasi bakteri tersebut akan semakin optimal.

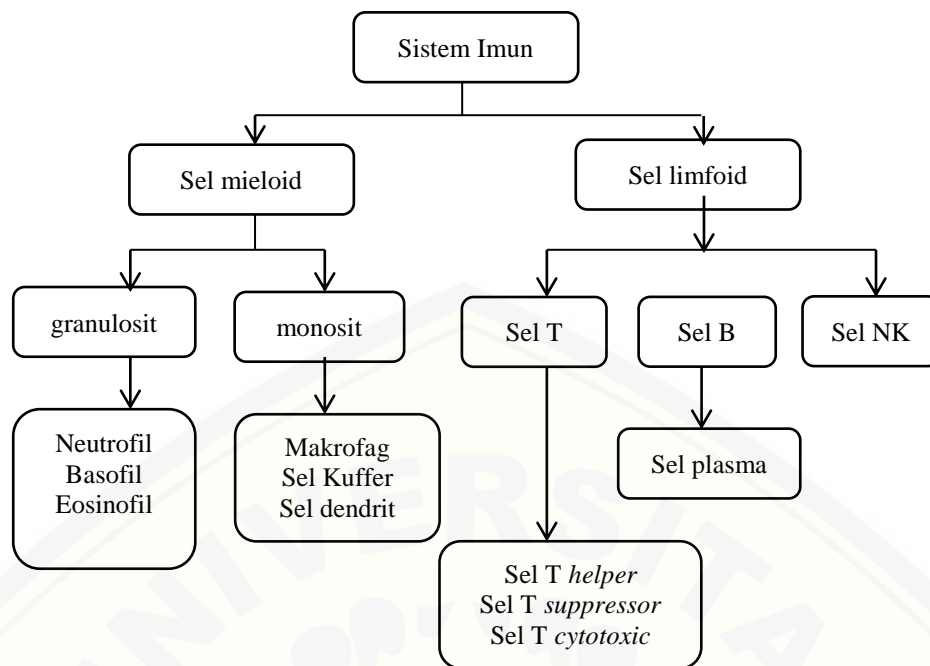
Beberapa *siderophore* yang diekspresikan *K. pneumoniae* dari aktivitasnya yang tertinggi ke terendah, yaitu: enterobactin, yersiniabactin, salmochelin dan aerobactin. Enterobactin merupakan *siderophore* yang memiliki sistem penyerapan besi utama pada *K. pneumoniae*. Namun untuk mengatasinya, tubuh memproduksi lipocalin-2 yang merupakan protein multifungsi yang dikeluarkan oleh beberapa tipe sel termasuk neutrofil dengan kemampuan antimikrobanya mampu mengatasi enterobactin. Yersinabactin ditemukan pada *K. pneumoniae* yang menyebabkan infeksi pada paru. Salmochelin merupakan modifikasi dari enterobactin dan resisten terhadap lipocalin-2. *Siderophore* ini biasanya

meningkatkan kolonisasi di nasofaring. Sedangkan aerobactin lebih sering ditemukan pada *K. pneumoniae* yang hipervirulen daripada klasik (Pacsoza dan Mecsas, 2016).

2.2 Sistem Imun

Tubuh manusia memiliki suatu sistem untuk mempertahankan tubuh dari benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Sistem ini disebut dengan sistem imun yang terbagi menjadi sistem imun nonspesifik biasa disebut “*innate*” dan sistem imun spesifik yang disebut dengan “*adaptive*”. Kedua sistem ini bekerja sama dalam tubuh dan tidak dapat dipisahkan satu dengan lainnya (Baratawidjaja dan Rengganis, 2013).

Pertahanan lini pertama terhadap benda asing pada tubuh manusia adalah sistem imun nonspesifik yang pada umumnya secara langsung segera mengatasi adanya proses infeksi pada tubuh akibat berbagai jenis organisme tanpa menghasilkan *immunological memory*. Sedangkan sistem imun spesifik berespon beberapa hari setelah zat asing masuk, membentuk *imunological memory*, dan terjadi produksi antibodi yang akan berikatan spesifik dengan antigen yang masuk serta memicu pergerakan sel-sel spesifik lainnya yang dapat mengenali dan mengatasi patogen (Radji, 2010). Sel yang terlibat dalam respon imun spesifik dan nonspesifik dapat dilihat pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Sel-sel yang terlibat dalam sistem imun (Radji, 2010)

Seluruh sel pada sistem imun berasal dari susmsum tulang yang terdiri dari sel mieloid (neutrofil, basofil, eosinofil, sel dendrit dan makrofag) dan sel limfoid (limfosit T, limfosit B dan *natural killer cell*). Sel limfosit T akan berdiferensiasi menjadi sel CD4+ disebut juga sel Th (sel T helper) dan sel CD8+ *pre-cytotoxic T cell* di dalam timus. Kemudian sel Th akan berdeferensiasi menjadi sel Th1 dan Th2. Sel TH1 akan memicu sel CD8+ *pre-cytotoxic T cell* untuk berdiferensiasi menjadi *cytotoxic T cell* sedangkan sel Th2 akan memicu sel limfosit B berdiferensiasi menjadi sel plasma yang akan menghasilkan antibodi (Radji, 2010).

2.2.1 Sistem Imun Nonspesifik

Sistem imun nonspesifik didapat seseorang sejak lahir untuk mempertahankan tubuh secara non selektif terhadap senyawa asing atau organisme patogen. Elemen penting pada sistem imun spesifik yaitu anatomi tubuh, barier humoral dan barier seluler terhadap infeksi. Barier humoral dapat berupa sistem komplemen, koagulasi, interferon, transferin dan lisozim. Sedangkan pada barier seluler, tubuh akan memproduksi sel neutrofil, basofil, makrofag, monosit, *Natural Killer (NK)* dan *lymphokine activated killer (LAK) cells* (Radji, 2010).

2.2.2 Sistem Imun Spesifik

Sel-sel yang berperan dalam sistem imun spesifik adalah limfosit T dan limfosit B. Sistem imun spesifik dapat dirangsang dengan keberadaan antigen. Ketika antigen masuk ke dalam tubuh maka respon tubuh adalah dengan membentuk antibodi yang spesifik terhadap antigen tersebut. Antigen biasanya terdiri dari protein dan polisakarida, namun lipid dan asam nukleat dapat menjadi antigenik apabila berikatan dengan protein dan polisakarida. Antigen biasanya memiliki berat molekul lebih dari 10.000. Keberadaan protein karier yang terikat dengan substansi asing dengan berat molekul lebih rendah juga dapat bersifat antigenik. Senyawa tersebut disebut juga dengan hapten (Radji, 2010).

Setiap antigen memiliki determinan antigenik/epitop yang dapat dikenali oleh antibodi yang spesifik. Apabila mikroorganisme memiliki beberapa determinan antigenik maka tubuh juga akan memproduksi beberapa antibodi sesuai dengan epitop pada patogen tersebut. Sedangkan antibodi memiliki antigen-binding sites yang merupakan situs untuk berikatan dengan determinan antigenik (Radji, 2010).

Imunitas tubuh terhadap patogen dapat diperoleh secara aktif atau pasif. Baik aktif maupun pasif dapat diperoleh secara alamiah maupun buatan. Imunitas tubuh alamiah yang didapat secara aktif akan menimbulkan sistem kekebalan tubuh seumur hidup terhadap beberapa jenis mikroorganisme seperti virusa polio dan virus cacar. Namun pada patogen saluran pencernaan, imunitasnya hanya berlangsung sementara dalam beberapa tahun. Imunitas tubuh alamiah yang didapat secara pasif dapat diperoleh melalui transfer antibodi dari ibu kepada anaknya melalui plasenta dan air susu ibu terutama air susu yang pertama kali keluar yang disebut dengan *colostrum*. Namun antibodi ini tidak bertahan lamanya beberapa bulan sampai bayi tersebut dapat memproduksi antibodi sendiri (Radji, 2010).

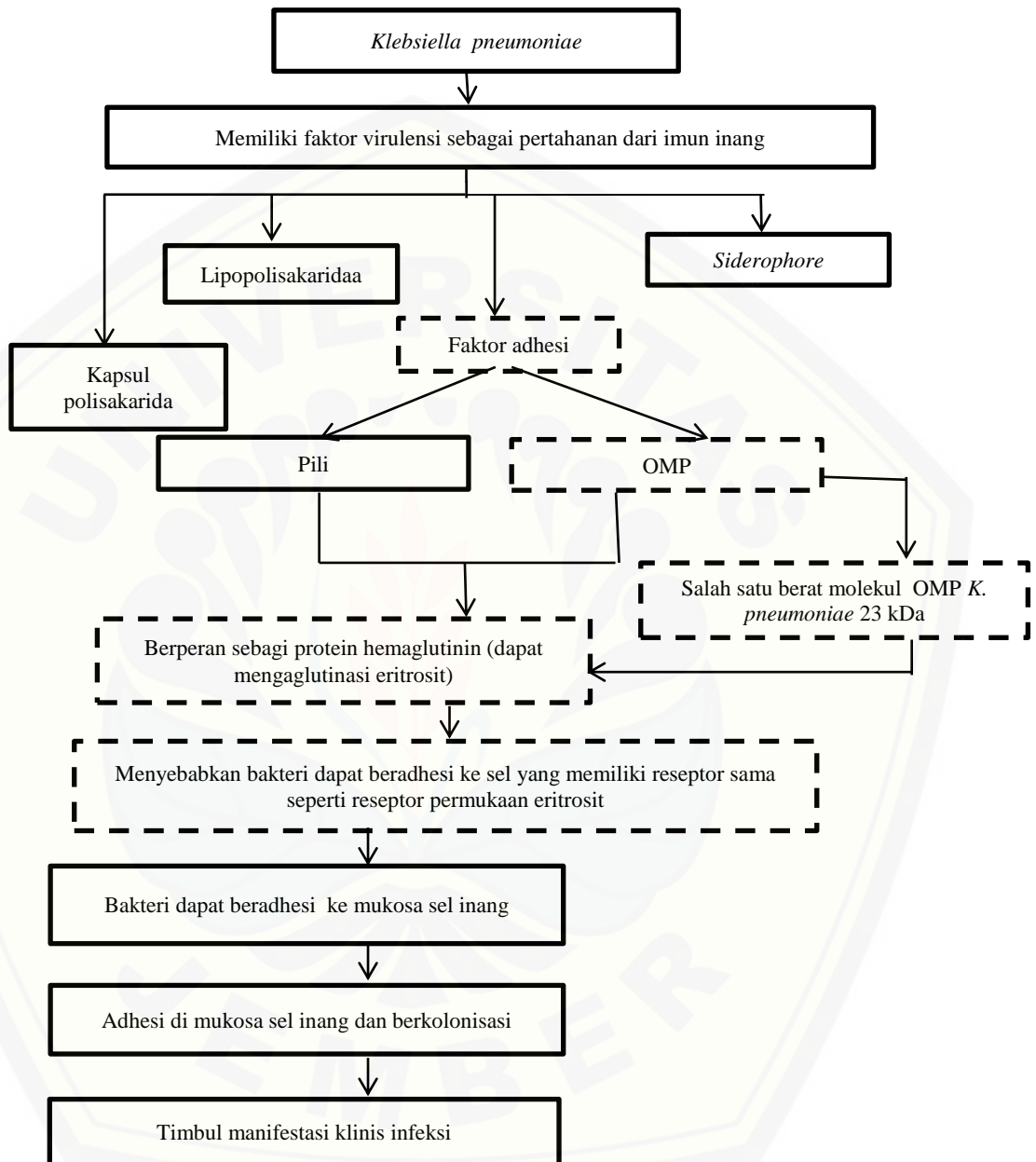
Imunitas tubuh buatan yang didapat secara aktif, dapat diperoleh melalui pemberian vaksin atau imunisasi. Vaksin yang biasa dimasukkan ke dalam tubuh dapat berupa toksoid (toksin bakteri yang telah diinaktifkan), mikroorganisme

yang telah dilemahkan atau dimatikan serta substansi tertentu dari mikroorganisme. Ketika dimasukkan ke dalam tubuh, vaksin ini tidak menimbulkan penyakit namun akan memicu terbentuknya antibodi yang spesifik di dalam tubuh. Sedangkan imunitas buatan yang didapatkan secara pasif dapat diperoleh dengan cara menyuntikkan antibodi ke dalam tubuh seseorang. Namun imunitas ini tidak menimbulkan kekebalan dalam jangka waktu yang lama hanya memiliki waktu paruh sekitar 3 minggu karena antibodi tersebut dapat didegradasi oleh penerima (Radji, 2010).



2.3 Kerangka Konsep Penelitian

Kerangka konsep pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2.2



Gambar 2.2 Kerangka Konsep Penelitian

- = yang tidak diteliti
- = yang diteliti

Klebsiella pneumoniae memiliki beberapa faktor virulensi dalam mempertahankan diri terhadap respon imun sel inang. Faktor virulensi tersebut di antaranya adalah kapsul polisakarida, lipopolisakarida, *siderophore*, dan faktor adhesi pili dan OMP. Salah satu faktor adhesi adalah OMP dengan berat molekul yang berbeda-beda salah satunya adalah 23 kDa. OMP dengan berat moleku 23 kDa akan diteliti apakah memiliki peran sebagai protein hemaglutinin yang dapat mengaglutinasi eritrosit. Peran sebagai protein hemaglutinin akan menyebabkan bakteri dapat beradhesi ke sel mukosa yang memiliki reseptor yang sama dengan permukaan eritrosit oleh karena itu perlu dilakukan uji adhesi untuk mengetahui apakah OMP 23 kDa dapat memperantarai bakteri melakukan adhesi ke sel. Jika OMP 23 kDa berperan sebagai protein adhesin maka bakteri dapat melakukan adhesi dan kolonisasi di mukosa sel inang yang akan menimbulkan gejala infeksi.

2.4 Hipotesis

OMP 23 kDa *K. pneumoniae* memiliki peran sebagai protein hemaglutinin dan adhesin.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian observasional untuk mengetahui berat molekul OMP *K. pneumoniae* dan membuktikan OMP 23 kDa merupakan protein hemagglutinin dan adhesin.

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksploratif laboratorium yang terdiri dari beberapa prosedur sebagai berikut.

A. Tahap identifikasi dan kultur bakteri *K. pneumoniae*

Tahap ini dilakukan untuk memastikan bakteri yang didapat adalah bakteri *K. pneumoniae* dengan dilakukan pengecatan Gram kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop serta dilakukan uji biokimiawi. Setelah dipastikan bahwa sampel yang diperoleh bakteri *K. pneumoniae* maka dilakukan perbanyak koloni untuk proses selanjutnya.

B. Tahap isolasi protein adhesin pada OMP *K. pneumoniae* dan identifikasi protein hemagglutinin OMP *K. pneumoniae*

Tahap ini dilakukan untuk mencari berat molekul OMP *K. pneumoniae* dengan cara elektroforesis menggunakan SDS-PAGE dan membuktikan protein yang diperoleh merupakan protein hemagglutinin.

C. Tahap Uji Adhesi

Tahap ini bertujuan untuk membuktikan protein yang diperoleh adalah protein adhesin. Dalam penelitian ini indeks adhesi akan dibandingkan dengan beberapa konsentrasi protein hemagglutinin OMP.

3.3 Sampel Penelitian

Sampel berupa bakteri *K. pneumoniae* yang diambil dari Malang yang terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di dua tempat. Identifikasi bakteri, isolasi OMP, uji hemaglutinasi, dan uji adhesi pada OMP dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Namun profiling berat molekul OMP dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Brawijaya Malang. Penelitian direncanakan dilakukan 2 bulan mulai bulan November 2018 sampai bulan Desember 2018.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada uji adhesi pada penelitian ini adalah beberapa konsentrasi OMP 23 kDa yang dilakukan dengan pengenceran, sedangkan variabel tergantungan adalah indeks adhesi.

3.6 Definisi Operasional dan Skala Pengukurannya

Definisi Operasional pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat ukur	Cara ukur	Hasil ukur	Jenis data
1.	<i>K. pneumoniae</i>	Bakteri Gram negatif berbentuk batang yang telah diuji biokimia	Mikroskop, uji biokimiawi	Mengamati morfologi dan ciri-ciri biokimia	Kualitatif	Nominal
2.	Outer Membrane Protein	Protein yang terdapat pada bagian membran luar dari <i>K. pneumoniae</i>	Elektroforesis (SDS-PAGE)	Membandingkan dengan marker	Kuantitatif	Rasio
3.	Indeks Adhesi	Jumlah bakteri yang menempel tiap 100 sel enterosit yang diamati dengan 3 kali pengulangan	Mikroskop perbesaran 1000x	Menghitung jumlah bakteri yang menempel pada enterosit	Kuantitatif	Rasio
4.	Titer Hemaglutinin	Pengenceran terendah yang masih menunjukkan adanya aglutinasi eritrosit	-	Pengamatan dengan cara membandingkan aglutinasi pada tiap pengenceran	Kuantitatif	Rasio

3.7 Instrumen Penelitian

3.7.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, *plate*, gelas objek, *cover glass*, *sentrifuge*, mikroskop, makropipet, tabung *falcon*, *waterbath*, *shaker* *waterbath*, *incubator*, *shaking incubator*, SDS-PAGE elektroforesis, *magnetic stirrer*, *shaker*, *pili cutter*, *dialisa tube*, *electroelusion chamber*, *eppendorf*, *beaker glass*, gunting, pinset dan *refrigerator*.

3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah bakteri *K. pneumoniae* strain Malang, mencit BALB/C betina dengan berat badan 25 gram, sel darah merah mencit, media *MacConkey*, pewarnaan Gram, media laktosa broth, media *Brain Heart Infusion (BHI) Broth*, medium *Tryptone Casitone Agar (TCG)*, medium *Trichloroacetic acid (TCA)*, *Phospat Buffered Saline (PBS)*, *n-octyl-B-D-glucopyranoside (NOG)*, SDS-PAGE, Tris Hcl, 2 *mercapto ethanol* 2,5%, gliserol 10%, *bromophenol blue*, *Commassie Brilliant Blue*, EDTA, *dithiothriol*, membran nitroselulosa, dan etanol absolut dingin.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Identifikasi dan Kultur *K. pneumoniae*

Sampel diperoleh dari isolat malang yang berada di media *MacConkey* dilakukan pewarnaan Gram dan diamati dengan mikroskop untuk memastikan morfologi bakteri yang tumbuh pada media. Setelah yakin morfologi bakteri yang tumbuh di *MacConkey* tersebut merupakan bakteri Gram negatif dan berbentuk batang dilanjutkan dengan uji bikomiawi untuk memastikan bahwa bakteri yang tumbuh di media tersebut adalah *K. pneumoniae* (Sikarwar dan Batra, 2011; Afifah, dkk., 2017).

PBS steril PH 7,4 dituangkan secukupnya (sekitar 10 ml) pada media yang sudah ditumbuhi koloni *K. pneumoniae* kemudian dipanen dengan cara dikerok. Suspensi hasil kerokan tersebut dimasukkan ke dalam botol yang telah berisi BHI 1000 ml. Kemudian botol dikocok pada suhu 37°C pada *waterbath* selama 30

menit. Suspensi tersebut diambil 10 ml, dimasukkan ke dalam botol 250 ml yang telah berisi medium TCG 50 ml sebanyak 20 botol. Media yang telah berisi suspensi bakteri tersebut diinkubasi 48 jam dengan suhu 37°C (Ehara, dkk., 1987; Fitriyaningsih, 2016).

3.8.2 Isolasi OMP

Isolasi OMP bertujuan untuk mendapatkan OMP yang terpisah dari pili bakteri *K. pneumoniae*, sehingga untuk mendapatkan OMP, pili bakteri harus dipotong terlebih dahulu. Metode ini merujuk dari Ehara (1987) pili bakteri diperoleh dari kultur bakteri di media TCG kemudian dilakukan pemanenan. Kemudian ditambahkan *Tri Chloroacetic Acid* (TCA) sehingga konsentrasi mencapai 3%, dihomogenkan dan diinkubasi. Setelah 1 jam, suspensi disentrifugasi pada 6000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Pelet hasil sentrifusi tersebut di resuspensi dengan PBS PH 7,4 dengan perbandingan antara pelet dan PBS yaitu 1:10. Setelah itu pili bakteri dicukur dengan *pili cutter* 5000 rpm pada suhu 4°C selama 30 detik. Prosedur tersebut diulang sampai supernatan jernih dengan jeda istirahat 1 menit setiap perlakuan (Sumarno, 2000)

Bahan yang digunakan untuk isolasi protein OMP adalah endapan dari pemotongan pili yang terakhir. Pelet tersebut ditambahkan PBS dengan PH 7,4. Kemudian suspensi ditambahkan NOG dengan konsentrasi 0,05%, dihomogenkan dengan vortex selama 1 menit. Setelah itu, suspensi disentrifus pada suhu 4°C kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit. Supernatan hasil sentrifus didialisis 24 jam pertama dengan menggunakan H₂O sebanyak 2 L kemudian dilanjutkan dengan PBS PH 7,4 pada 24 jam kedua dengan volume yang sama (Sumarno, 2000).

3.8.3 Identifikasi berat molekul OMP dengan elektroforesis (SDS-PAGE)

Setelah dilakukan isolasi protein OMP, sampel protein yang diperoleh dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit dalam larutan penyangga. Larutan penyangga tersebut berisi 5 mM *Tris HCl* PH 6,8, 2,5% w/v *Sodium dodecyl Sulfate*, 2-*mercapto ethanol* 5%, 10%v/v *glyserol* dengan warna pelacak

bromophenol blue. Mini slab yang digunakan yaitu mini slab gel 12,5% dengan *tracking gel* 4%. Voltage yang digunakan adalah 125 mV dan bahan pewarna yang digunakan yaitu *Commassie Brilliant Blue*. Berat molekul dari antigen yang digunakan diketahui dengan menggunakan metode molekul *standard sigma low range marker* (Laemli, 1970).

3.8.4 Pemurnian OMP dengan Metode Elektroelusi dan Dialisis

Metode pemurnian OMP merujuk pada Thomas dan Rice (1989). Gel yang dihasilkan dari metode SDS-PAGE berupa pita-pita protein yang diketahui berat molekulnya. Gel yang menunjukkan molekul OMP 23 kDa dipotong melintang dan ditampung dalam *dialise tube* yang berisi larutan buffer. Kemudian dalam *electroelusion chamber* pada tegangan 20 V arus 0,3 A, suspensi dielektroelusi. Setelah 2 jam, suspensi dipindahkan ke *beaker glass* yang berisi aquades steril dengan cara diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Pemindahan dan pengadukan ini dilakukan di *refrigerator* dan proses tersebut dibiarkan selama 24 jam kemudian dilanjutkan dengan PBS steril selama 24 jam. Protein tersebut ditampung dalam *ependorf* kemudian ditambahkan etanol dingin dan didiamkan di *refrigerator* semalaman. Setelah itu, protein disentrifus pada suhu 4°C selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Di dalam *refrigerator* dengan cara *tapping*, supernatan berupa etanol dibuang sampai etanol habis menguap. Dengan larutan buffer PH 6,8 *Tris HCL* 0,5 M dalam *deep freeze*, *crude protein* ini dapat disimpan.

3.8.5 Uji Hemaglutinasi OMP

Protein yang dihasilkan dari elektroelusi dan dialisis dilakukan uji hemaglutinasi untuk membuktikan bahwa OMP 23 kDa adalah protein hemaglutinin. Uji hemaglutinasi ini dilakukan berdasarkan petunjuk Li, dkk. (1999). Sampel yang berupa protein yang dihasilkan dari proses elektroelusi dan dialisis diencerkan dibuat serial pengenceran dengan tiap sumur pada *mikroplate* V berisi 50 µl. Kemudian tiap sumur ditambahkan sel darah merah mencit dengan volume 50 µl konsentrasi 0,5%. Setelah itu, dengan *rotator plate* suspensi di

goyang lalu dibiarkan dalam suhu ruangan selama 1 jam. Uji hemaglutinasi dikatakan positif apabila terjadi proses aglutinasi sel darah merah. Sedangkan untuk mengetahui besarnya titer dapat ditentukan dengan pengamatan adanya aglutinasi pada pengenceran terendah .

3.8.6 Isolasi Sel Enterosit Mencit

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit yang sehat dengan berat badan kurang lebih 25 gram. Sebelum dilakukan pembedahan, mencit dianastesi dengan menggunakan kloroform. Kemudian bagian usus halus mencit dipotong dan diambil. Usus ini dicuci dengan menggunakan PBS PH 7,4 yang berisi 1 mM *dithiothretiol* pada suhu 4°C dalam posisi usus terbuka sehingga kotoran dalam usus menghilang. Setelah bersih, usus mencit diletakkan pada cairan yang berisi 1,5 mM KCl; 9,6 mM NaCl; 8 mM KH₂SO₄; 27 mM Na *Citrate* dan 5,6 mM Na₂HPO₄ dengan PH 7,4. Kemudian pada suhu 37°C dengan menggunakan *shaking incubator*, usus beserta cairan ini diinkubasi. Setelah 15 menit, supernatan yang diperoleh dibuang dan jaringan dipindahkan ke dalam cairan yang berisi 1,5 mM EDTA dan 0,5 mM *dithiothretiol* (Nagayama dkk., 1995).

Campuran dari pelakuan di atas, dikocok kuat selama 15 menit pada suhu 37 °C dan supernatan yang dihasilkan dibuang kembali. Jaringan yang tersisa dicuci dengan menggunakan PBS dan disentrifus selama 5 menit. Proses ini diulang sampai 3 kali. Enterosit diisolasi dengan cara disuspensi menggunakan PBS steril. Kemudian, enterosit dapat dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 560 nm. Setelah konsentrasi mencapai 10⁶ sel/ ml, sel enterosit siap digunakan untuk uji adhesi (Nagayama dkk., 1995).

3.8.7 Uji Adhesi OMP

Sebelum melakukan uji adhesi, bakteri *K. pneumoniae* pada suhu 37°C dikultur terlebih dahulu pada *lactose broth*. Koloni bakteri yang terbentuk dipanen dan disentrifus pada suhu 4°C dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Endapan yang dihasilkan ditambahkan PBS. Dengan menggunakan

spektrofotometer panjang gelombang 600 nm, suspensi tersebut dibuat sehingga kandungan bakteri menjadi 10^8 sel/ml. Selanjutnya dibuat preparasi beberapa konsentrasi OMP 23 kDa dengan cara pengenceran yaitu 0 (sebagai kontrol), 1/10, 1/100, 1/1000, dan 1/10.000. Pada setiap pengenceran ditambahkan 300 μ l suspensi enterosit kemudian digoyang selama 30 menit pada suhu 37 °C dengan menggunakan *shaking waterbath* (Martino, dkk., 1995; Nagayama dkk., 1995).

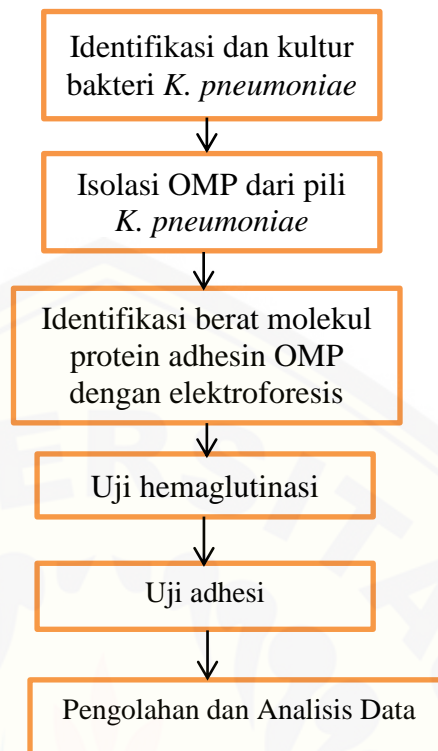
Setiap campuran pengenceran OMP dan suspensi eritrosit tersebut ditambahkan suspensi bakteri 300 μ l. Kemudian pada suhu 37 °C suspensi tersebut diinkubasi dengan *shaking incubator*. Setelah 30 menit, suspensi disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 3 menit pada suhu 4 °C. Endapan yang terbentuk dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali. Endapan diambil dan dibuat hapusan pada gelas objek dan dicat dengan perwarnaan Gram. Setelah itu, hapusan dapat diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x. Indeks adhesi adalah jumlah bakteri yang menempel pada enterosit dihitung untuk setiap pengamatan terhadap 100 epitel (Martino, dkk., 1995; Nagayama dkk., 1995).

3.9 Analisis Data

Analisis data yang digunakan yaitu analisis data deskriptif untuk menampilkan profil berat molekul OMP *K. pneumoniae* dan hasil uji hemaglutinasi. Data akan ditampilkan dalam bentuk Gambar dan Tabel (Arif, 2012). Sedangkan analisis data korelasi-regresi digunakan untuk uji adhesi dengan tujuan mengetahui hubungan antara indeks adhesi dan beberapa konsentrasi OMP 23 kDa. Analisis korelasi yang digunakan adalah korelasi pearson jika memiliki distribusi data normal dan dilanjutkan dengan analisis regresi linear jika korelasi bermakna dengan nilai $p < 0,05$ serta minimal memiliki kekuatan korelasi sedang dengan nilai $r > 0,4$ (Dahlan, 2014)

3.10 Alur Penelitian

Secara sistematis alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.2



Gambar 3.2 Skema Alur Penelitian

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Outer Membrane Protein 23 kDa bakteri *K. pneumoniae* berperan sebagai protein hemagglutinin dan adhesin.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, penulis dapat memberikasn saran sebagai berikut.

- a. Diharapkan peneliti lain melakukan penelitian dengan menggunakan isolat bakteri *K. pneumoniae* dari daerah lain sehingga dapat mengetahui OMP 23 kDa juga ditemukan pada *K. pneumoniae* isolat lain atau tidak sehingga akan menjadi referensi pembuatan vaksin.
- b. Perlu dilakukan uji *invivo* dengan menggunakan hewan coba untuk mengetahui respon imunogenik dari hewan coba.

DAFTAR PUSTAKA

- Abrar, M., I. W. T. Wibawan, B. P. Priosoeryanto, M. Soedarwanto, dan F. H. Pasaribu. 2013. Peran Hemagglutinin *Staphylococcus aureus* Dalam Proses Adhesi Pada Sel Epitel Ambing Sapi Perah. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 7(1): 43-46.
- Afifah, A., T. A. Purwongroho, I. D. S. A. P. Peramiarti. 2017. Resistensi *Klebsiella spp.* Terhadap Meropenem di RSUD Prof. Dr. Margono Soekarjo Purwokerto. *Scripta Biologica*. 4(2): 135-137.
- Anderson, B. N., A. M. Ding, A. M. Nilsson, K. Kusuma, V. Tchesnokova, V. Vogel, E.V. Sokurenko, dan W. E. Thomas. 2007. Weak Rolling Adhesion Enhances Bacterial Surface Colonization. *Journal of Bacteriology*. 189(5): 1794-1802.
- Arif, M. 2012. Profil SDS-PAGE Outer Membrane Protein *Porphyromonas gingivalis* (Penelitian Observasional Analitik *in Vitro*). *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Baratawidjaja, K. G. dan I. Rengganis. 2013. *Imunologi Dasar*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Brisse, S., C. Fevre, V. Passet, S. Issenhuth-Jeanjean, R. Tournebize, L. Diancourt, dan P. Grimont. 2009. Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. *Plos One*. 4(e4982): 1-13.
- Clegg, S., dan C. N. Murphy. 2016. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*. 4(1): 1-17.
- Dahlan, M. S. 2014. Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan. Edisi 6th. Jakarta: Salemba Medica
- Ehara, M., M. Ishibashi, Y. Ichinose, M. Iwanaga, S. Shimotori, dan T. Naito. 1987. Purification and Partial Characterization of Fimbriae of *Vibrio cholerae* O1. *Vaccine*. 5(4): 283-288.
- Evrard, B., D. Balestrino, A. Dosgilbert, J. L. J. Bouya-Gachancard, N. Charbonnel, C. Forestier, dan A. Tridon. 2010. Roles of Capsule and Lipopolysaccharide O Antigen in Interactions of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 78(1): 210-219.

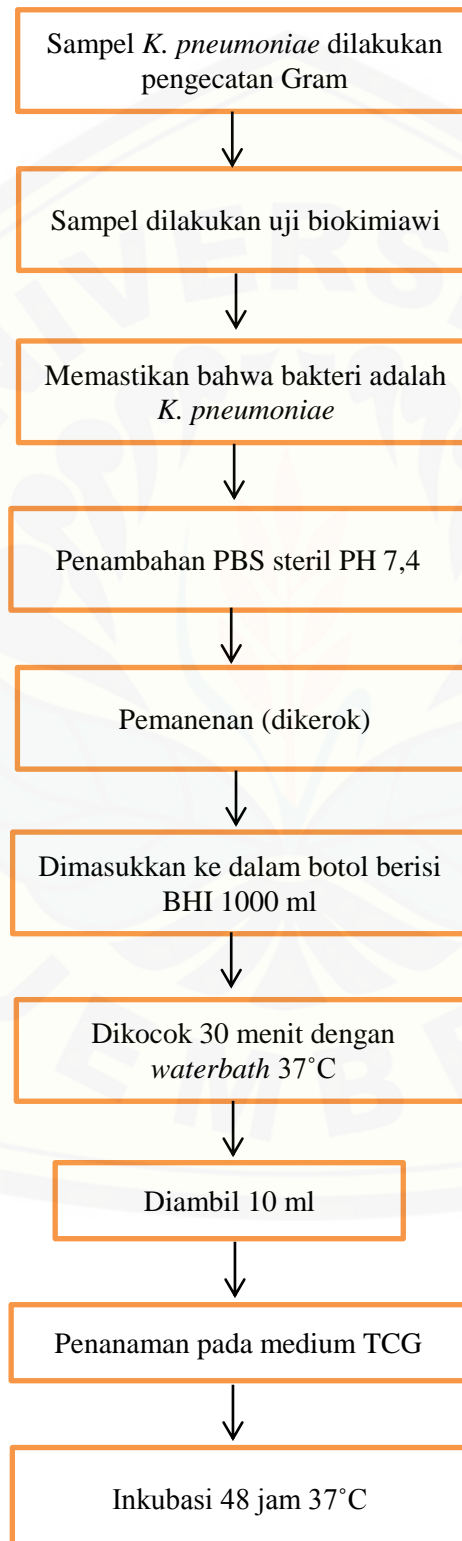
- Favre-Bonte, S., A. Darfeuille-Michaud, dan C. Forestier. 1995. Aggregative Adherence of *Klebsiella pneumoniae* to Human Intestine-407 Cells. *Infection and Immunity*. 63(4): 1318-1328.
- Fitrianingsih, A. A. 2016. Reaksi Antigen-Antibodi Antara Protein Sub Unit Pili 18 kDa *Shigella flexneri* Dengan Sub Unit *Outer Membrane Protein Shigella dysenteriae* (Strategi Memperoleh Vaksin Shigellosis Berbasis Protein Pili). Malang: Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim.
- Flores-Mireles, A. L., J. N. Walker, M. Caparon, dan S. J. Hultgren. 2015. Urinary Tract Infections: Epidemiology, Mechanism of Infection and Treatment Options. 13: 269-284.
- Ginting, S. T. M., T. Z. Helmi, Darmawi, Hennivanda, Erina, dan R. Daud. 2018. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Gram Negatif pada Ambing Kambing Peternakan Ettawa (PE). *JIMVET*. 2(3): 351-360.
- Global Burden Disease. 2013. Global, Regional, and National Age-Sex Specific All-Cause and Cause-Specific Mortality for 240 Causes of Death, 1990-2013: A Systematic Analysis for The Global Burden Disease Study 2013.
- Gonzales, R., C. Diaz, M. Marino, R. Cloralt, M. Pequenez, dan I Perez-Schael. 1997. Age-Specific Prevalence of *Escherichia coli* with Localized and Aggregative Adherence in Venezuelan Infants with Acute Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*. 35(5): 1103-1107.
- Guli. M. M. 2016. Patogenesis Penyakit Kolera Pada Manusia. *Jurnal Biocelebes*. 10(2): 18-24.
- Hidayati, D. Y. N. 2010. Identifikasi Molekul Adhesi Pili *Pseudomonas aeruginosa* pada *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) Culture. *Journal of Experimental Life Science*. 1(1): 1-14.
- Kumar, D., Shrutikirti, dan K. Kumari. 2013. Klebsilla in Drinking Water. *Intenational Journal of Pharmaceutical Science Invention*. 2(12): 2319-6718.
- Laemli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Protein During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.
- Lestari, F. E., H. Suyuti, dan S. R. Prawiro. 2017. Hemagglutinin Protein 35.7 kDa Acts as an Adhesion Molecul in The *Outer Membrane Protein* (OMP) of *Shigella dysenteriae*. *International Jorunal of Pharmaceutical Sciences dan Research*. 8(10): 4180-4185.

- Li, X., D. E. Johnson, dan H. L. T. Mobley. 1999. Requirement of MrpH for Mannose-Resistant *Proteus*-Like Fimbria-Mediated Hemagglutination by *Proteus mirabilis*. *Infection and Immunity*. 67(6): 2822-2833.
- Mackenzie, G. 2016. The Definition and Classification of Pneumonia. *Biomedical Central*. 8(14): 1-5.
- Magill, S. S., J. R. Erwards, W. Bamberg, Z. G. Beldays, G. Dumyati, M. A. Kainer, R. Lynfield, M. Maloney, L. McAllister-Hollod, J. Nadle, S. M. Rey, D. L. Thompson, L. E. Wilson, dan S. K. Fridkin. 2014. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care-Associated Infections. *The New England Journal of Medicine*. 370(13): 1198-1208.
- Martino, P. D., Y. Bertin, J. Girardeau, V. Livrelli, B. Joly, dan A. Darfeuille-Michaud. 1995. Molecular Characterization and Adhesive Properties of CF29K, an Adhesin of *Klebsiella pneumoniae* Strains Involved in Nosocomial Infections. *Infection and Immunity*. 63(11): 4336-4344.
- Meleleo, D., S. Micelli, M. G. Stoico, V. Picciarelli, dan E. Galluci. 2008. Can n-octyl- β -D-glucopyranoside At Femtomolar Concentration Induce Channel-Like Ionic Pathways in Planar Lipid Membranes?. *Bioelectrochemistry Research Developments*. 175-193.
- Mufida, D.C., C. Bumi, dan H. Fatmawati. 2009. Peran Protein Membran Luar 55 kDa *Salmonella typhi* Isolat Jember sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin. *Berk. Panel.Hayati*. 15. 11-16.
- Murwani, S. 2015. The Ability of Adhesin 61 kDa *Outer Membrane Protein* of *Clamidy pneumoniae* in Inducing Rupture of plaques Atherosclerotic through Degradation of Collagen Type-IV. *iMedPub Journals*. 6(2): 1-8.
- Nagayama, K., T. Oguchi, M. Arita, dan T. Honda. 1995. Purification and Characterization of a Cell-Associated Hemagglutinin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*. 63(5): 1987-1992.
- Naka, A., K. Yamamoto, M. J. Albert, dan T. Honda. 1995. *Vibrio cholerae* O139 Produces A Protease Which Is Indistinguishable from The Haemagglutinin/Protease of *Vibrio cholerae* O1 and Non-O1. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 11: 87-90.
- National Center for Biotechnology Information. Taxonomy browser. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undefined&id=573&lvl=3&lin=s&keep=1&srchmode=1&unlock&log_op=lineage_toggle. [Diakses pada 24 September 2018].

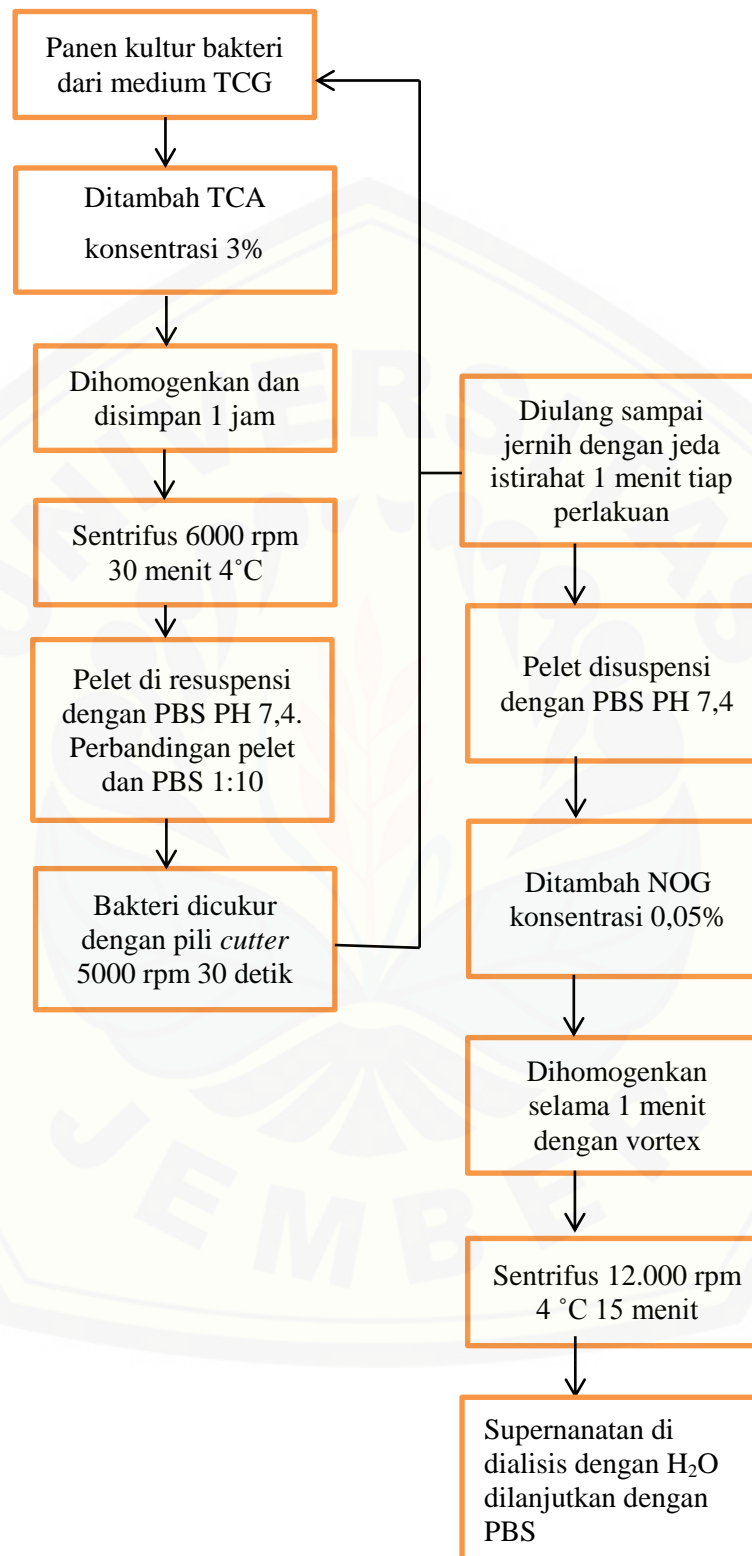
- National Center for Biotechnology Information. Taxonomy browser. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=573&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>. [Diakses pada 29 September 2018].
- Paczosa, M. K., dan J. Mecsas. 2016. *Klebsiella pneumoniae*: Going on The Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 80(3): 629-661.
- Payung, W. T, Fatimawali, dan N. S. Kojong. 2018. Identifikasi Secara Biomolekuler dan Uji Daya Reduksi Bakteri Resisten Merkuri yang Diisolasi dari Air di Wilayah Bekas Tambang Emas Rakyat Desa Tanoyan Utara. *Pharmakon Jurnal Ilmiah Farmasi*. 7(2): 28-40.
- Pedoman Dignosis & Penatalaksanaan di Indonesia. 2014. *Pneumonia Komunitas*. Jakarta: Badan Penerbit FKUI.
- Pertiwi, W., T. R. Sartono, Sumarno, dan S. Adi. 2009. Sensitivitas dan Spesifitas Metode *Dot Blot* Menggunakan Antigen *Outer Membrane Protein Klebsiella pneumoniae* yang Direspon Secretory-Immunoglobulin A Sputum Penderita Terinfeksi *Klebsiella pneumoniae*. *Jurnal Respirology Indonesia*. 29(3): 1-15.
- Radji, M. 2010. *Imunologi dan Virologi*. Jakarta: PT. ISFI Penerbitan.
- Rahayu, S. A dan M. H. Gumilar. 2017. Uji Cemarkan Air Minum Masyarakat Sekitar Margahayu Raya Bandung dengan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*. *IJPST*. 4(2): 50-56.
- Ray, S.K., R. Rajeshwari, Y. Sharma, dan R. V. Sonti. 2002. High-Molecular-Weight *Outer Membrane Protein* of *Xanthomonas oryzae* Exhibits Similarity to Non-fimbrial Adhesins of Animal Pathogenic Bacteria and Is Required for Optimum Virulence. *Molecular Microbiology*. 46(3): 637-647.
- Rollauer, S. E., M. A. Sooreshjani, N., Noinaj, dan S. L. Buchanan. 2015. Outer Membrane Protein Biogenesis in Gram-negative Bacteria. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*. 370(20150023): 1-10
- Santoso, S. 2002. Protein Adhesin *Salmonella Typhi* Sebagai Faktor Virulensi Berpotensi Imunogenik pada Produksi S-IgA Protektif. *Disertasi*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Shaaref, H. A., E. T. Abdulla, dan Z. N. Mostafa. 2010. Hemagglutination Properties of Some Intestinal Bacterial Pathogens Isolated from Clinical Sample. *Tikrit Journal of Pure Science*. 15(3): 5-10.

- Sikarwar, A.S., dan H. V. Batra. 2011. Identification of *Klebsiella pneumoniae* by Capsular Polysaccharide Polyclonal Antibodies. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 2(2): 130-134.
- Sumarno. 2000. Karakterisasi Molekul Protein Adesi *Vibrio Cholerae* O1 M094V dan Protein Reseptornya Pada Sel Epitel Usus Halus Tikus Putih (Wistar). *Disertasi*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Susilo, J., T. R. Sartono, dan Sumarno. 2004. Deteksi Bakteri *Klebsiella pneumoniae* Pada Sputum dengan Metode Imunositokimia Menggunakan Anti *Outer Membrane Protein* Berat Molekul 40 kDa *Klebsiella pneumoniae* Sebagai Antibodi. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 20(1): 12-18.
- Tarina, N. T. I., dan S. A. F. Kusuma. 2017. Deteksi Bakteri *Klebsiella pneumoniae*. *Farmaka*. 15(2): 119-126.
- Thampy, M. K. 2010. Study Of Association Between Perineal an Vagina Colonization and Urinary Tract Infection Due to Gram Negative Bacilli in Patients Admitted to Urology Department. *Disertasi*. Karnataka: ST. John's National Academy of Health Sciences.
- Thomas, D. H., A. Rob, dan D. W. Rich. 1989. A Novel Dialysis Procedure for The Crystallization of Proteins. *Protein Engineering*. 2(6): 489-491.
- Wibawan, I. W . T., C. Lammler, R. S. Seleim, dan F. H. Pasaribu. 1993. A Haemagglutinating Adhesin of Group B *Streptococci* Isolated from Cases of Bovine Mastitis Mediates Adherence to HeLa Cells. *Journal of General Microbiology*. 139: 2173-2178.
- Wu, M. dan X. Li. 2015. *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Dalam *Molecular Medical Microbiology*. Editor Y. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton dan J. Schwartzman. 2nd ed. New York: Elsevier.
- Zimbro, M. J., D. A. Power, S. M. Miller, G. E. Wilson, dan J. A. Johnson. 2009. Difco™ & BBL™ Manual: Manual of Microbial Culture Media. 2nd ed. USA: Becton, Dickinson and Company.

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Prosedur Identifikasi dan Kultur *K. pneumoniae*

Lampiran 3.2 Prosedur Isolasi OMP

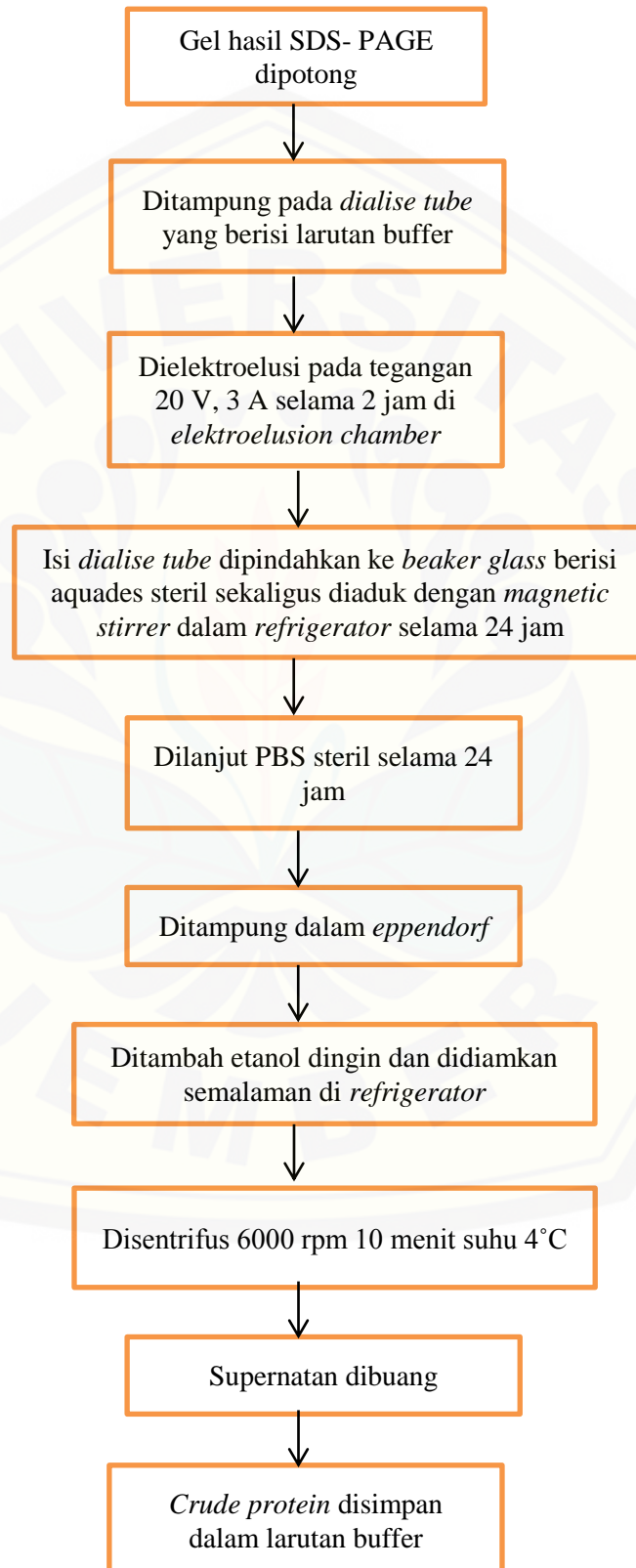


Lampiran 3.3 Prosedur Identifikasi berat molekul OMP dengan elektroforesis (SDS- PAGE)

Sampel protein dipanaskan 100°C 5 menit dalam 500 µl larutan penyangga

Elektroforesis dengan mini slab gel 12,5% dengan *tracking gel* 4% voltage 125 mV bahan perwarna *Commase Brilliant Blue*

Identifikasi berat molekul dengan metode *molekul standard sigma low range marker*

Lampiran 3.4 Prosedur Pemurnian OMP dengan Metode Elektroelusi dan Dialisis

Lampiran 3.5 Prosedur Uji Hemaglutinasi OMP

Sampel hasil elektroelusi dan dialisis
dibuat serial pengenceran

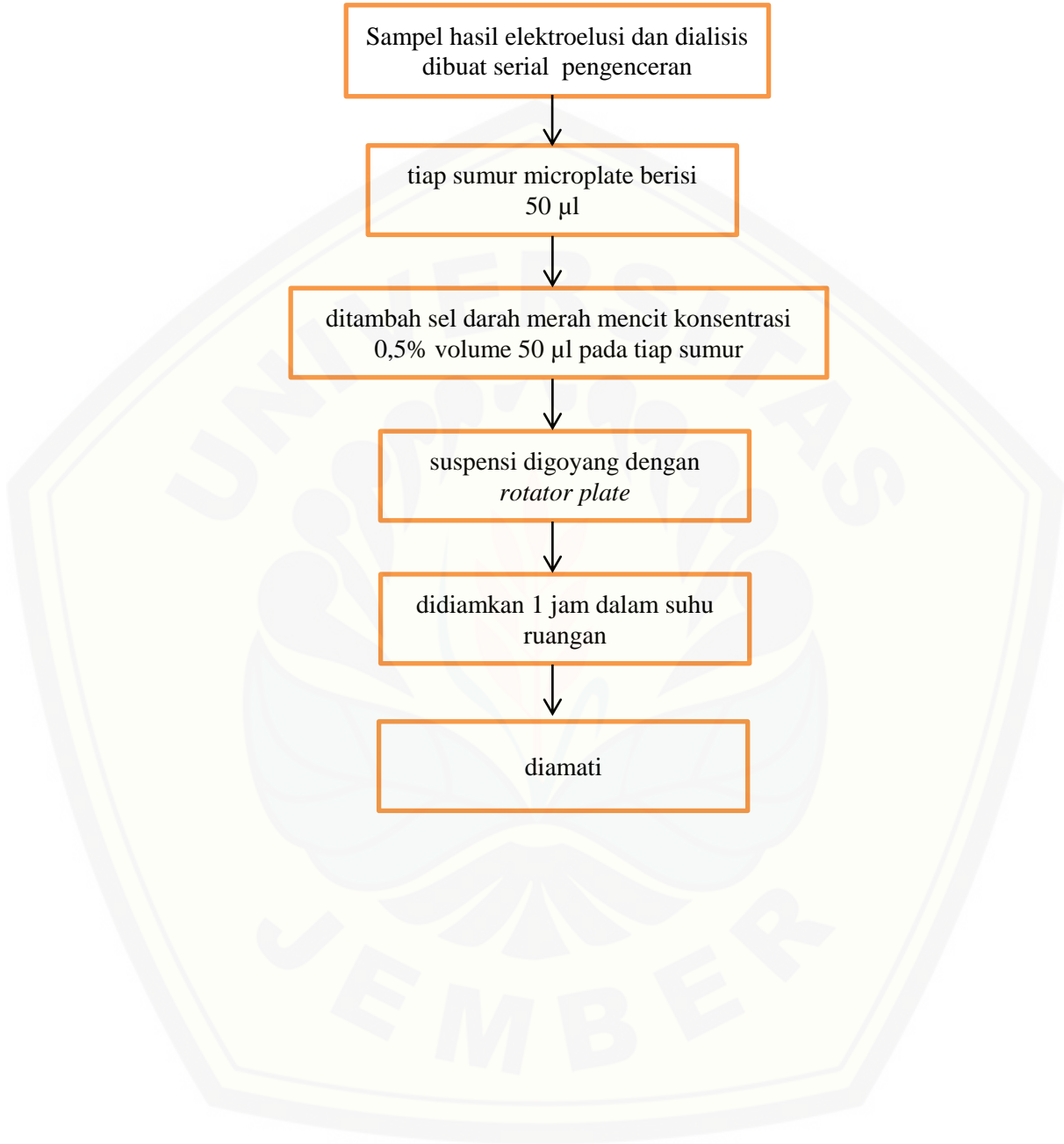
tiap sumur microplate berisi
50 μ l

ditambah sel darah merah mencit konsentrasi
0,5% volume 50 μ l pada tiap sumur

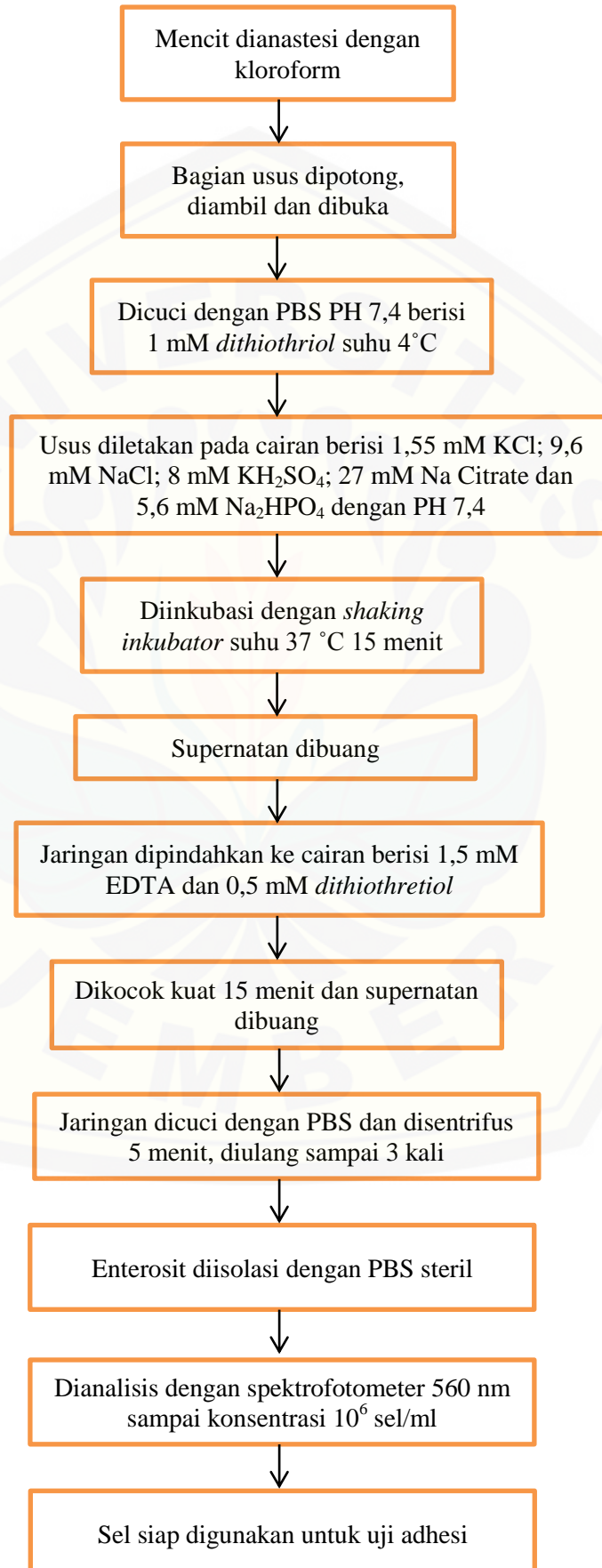
suspensi digoyang dengan
rotator plate

didiamkan 1 jam dalam suhu
ruangan

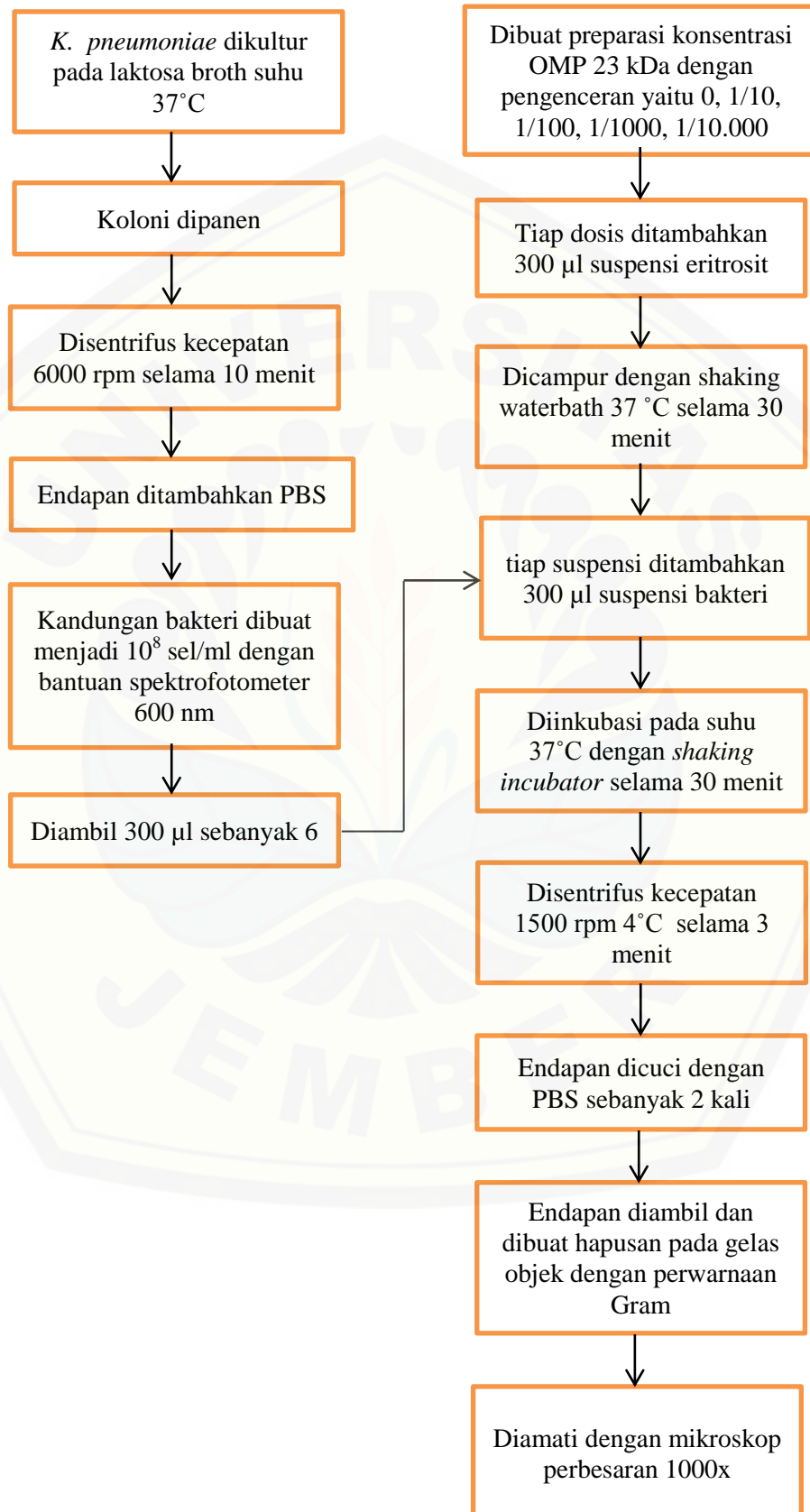
diamati



Lampiran 3.6 Prosedur Isolasi Sel Enterosit Mencit



Lampiran 3.7 Prosedur Uji Adhesi OMP



Lampiran 3.8. Penggunaan Alat Pelindung Diri (APD)

Penelitian ini menggunakan Alat pelindung diri (APD) berikut ini :

- a. *Disposable face mask*
- b. Masker N95 sekali pakai
- c. *Handscoon nitril cobalt blue*
- d. Jas laboratorium

Penelitian ini menggunakan alat-alat laboratorium yang mencegah penyebaran bakteri seperti:

- a. Laminar dengan sinar UV dihidupkan selama 30 menit sebelum pemakaian. Segala prosedur penelitian dilakukan didalam laminar sehingga mencegah penyebaran bakteri di ruang laboratorium.
- b. Bunsen, digunakan untuk memastikan terhindarnya penyebaran bakteri selama penelitian.

Lampiran 3.9 Tata Cara Pembuangan Limbah Mikrobiologi

Pembuangan limbah mikrobiologi baik media cair maupun agar yang telah terkontaminasi dan ditumbuhi bakteri akan dilakukan sebagai berikut:

- a. Media padat maupun cair yang telah ditanam bakteri dan tidak terpakai akan di *autoclave* selama 1 jam
- b. Media tersebut dimasukkan kaleng alumunium untuk mencegah perembesan
- c. Dilakukan penggalian tanah dan kaleng yang berisi media dimasukkan ke dalam tanah tersebut sampai dapat menutupi kaleng
- d. Kemudian bagian dalam kaleng dibakar sampai mengering dan ditutup
- e. Kaleng tersebut dikubur dengan tanah. Penguburan dilakukan di tanah kosong bagian belakang Laboratorium Mikrobiologi FK UNEJ untuk menghindari pemukiman masyarakat
- f. Sedangkan barang-barang laboratorium yang telah terpakai untuk media diguyur dengan klorin serta dicuci dengan sabun kemudian dilakukan sterilisasi kering pada suhu 170°C selama 1 jam.

Pembuangan limbah alat pelindung diri seperti *disposable face mask* , masker N95 sekali pakai, dan *handscoon nitril cobalt blue* mengikuti prosedur Laboratorium Mikrobiologi FK UNEJ, peneliti menampung pada tas kresek khusus kemudian setiap hari petugas bagian umum dan perlengkapan FK UNEJ akan mengambil sampah tersebut untuk selanjutnya di proses dengan menggunakan insinerator.

3. 10 Lampiran Hasil Statistik Uji Adhesi

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	pengenceran	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
indeks adhesi	,0000	,356	3	.	,817	3	,156
	,0001	,207	3	.	,992	3	,833
	,0010	,344	3	.	,840	3	,215
	,0100	,310	3	.	,900	3	,384
	,1000	,229	3	.	,981	3	,739

a. Lilliefors Significance Correction

		pengenceran	indeks adhesi
pengenceran	Pearson Correlation	1	-,677**
	Sig. (2-tailed)		,006
	N	15	15
indeks adhesi	Pearson Correlation	-,677**	1
	Sig. (2-tailed)	,006	
	N	15	15

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Model Summary				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,677 ^a	,459	,417	421,907

a. Predictors: (Constant), pengenceran

3. 11 Keterangan Bebas Plagiasi

 **KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGIDAN PENDIDIKAN TINGGI**
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jl. Kalimantan 1/37 Kampus Tegal Boto. Telp. (0331) 337877, Fax (0331) 324446
Jember 68121.

REKOMENDASI BEBAS PLAGIASI

Nomor : 55 /H25.1.11/KBSI/2019

Komisi bimbingan Skripsi dan Ilmiah, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya peningkatan kualitas dan originalitas karya tulis ilmiah mahasiswa berupa skripsi, telah melakukan pemeriksaan plagiasi atas skripsi yang berjudul :

PERAN OUTER MEMBRANE PROTEIN (OMP) AS KDA BAKTERI *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* DARI SPUTUM PASIEN PNEUMONIA SEBAGAI PROTEIN HEMAGLUTININ DAN ADHESIN

Nama Penulis : Astri Mutia Saraswati
NIM. : 152010101087
Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Telah menyetujui dan dinyatakan "BEBAS PLAGIASI"
Surat Rekomendasi ini dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 24 Januari 2019
Ketua,
Komisi Bimbingan Skripsi & Ilmiah

Astria Mutia Armyanti, M.Kes
NIM. 15740604 200112 2 002



3.12 Etik Keris Mikrobiologi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

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

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK

ETHICAL APPROVA

Nomor : J.191 /H25.1.11/KE/2018

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 :

IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN ADHESIN PILI *K. Pneumoniae* SEBAGAI PENYEBAB INFEKSI PNEUMONIA

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

NIP : 198308012008122003

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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

Jember,
Ketua Komisi Etik Penelitian



dr. Rini Riyanti, Sp.PK

3.13 Etik Penelitian

 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
KOMISI ETIK PENELITIAN
Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :
fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVA
Nomor : 1246 /H25.1.11/KE/2018

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 :

PERAN OUTER MEMBRANE PROTEIN (OMP) 45 kDa BAKTERI *Klebsiella pneumonia* DARI SPUTUM PASIEN PNEUMONIA SEBAGAI PROTEIN HEMAGLUTININ DAN ADHESIN

Nama Peneliti Utama : Astri Mutia Saraswati
Name of the principal investigator

NIM : 152010101087

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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

Jember, 26-12-2018
Ketua Komisi Etik Penelitian

Dr. Rini Riyanti, Sp.PK

