



**PERAN *OUTER MEMBRANE PROTEIN* (OMP) 32 kDa
Klebsiella pneumoniae SEBAGAI PROTEIN
HEMAGLUTININ DAN ADHESIN**

SKRIPSI

Oleh

**Bima Setia Sandya Nugraha
NIM 152010101121**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**PERAN *OUTER MEMBRANE PROTEIN* (OMP) 32 kDa
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

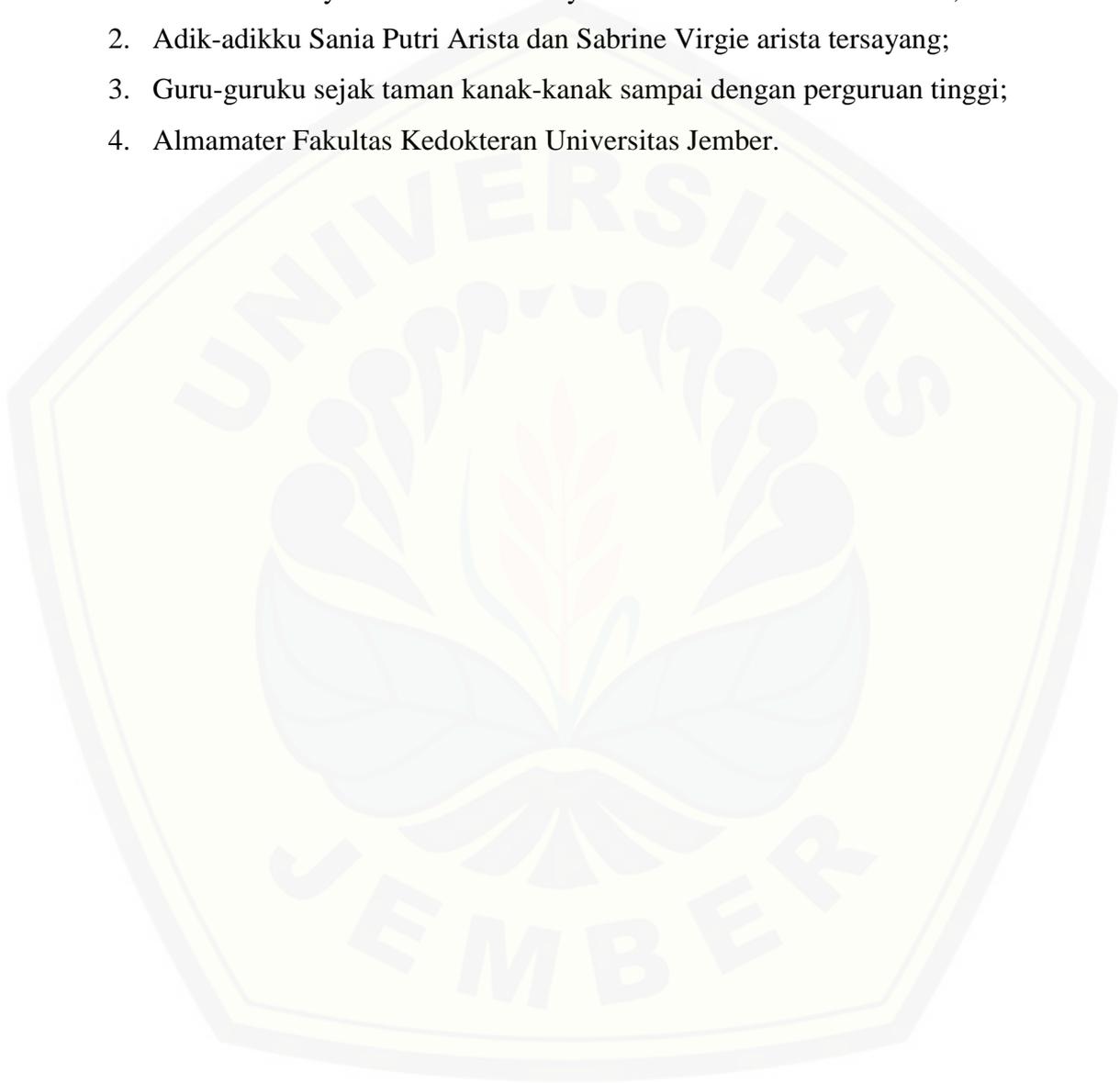
**Bima Setia Sandya Nugraha
NIM 152010101121**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Iva Yuyun Ratnowati dan ayahanda Aris Setia Yudi tercinta;
2. Adik-adikku Sania Putri Arista dan Sabrine Virgie arista tersayang;
3. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



MOTO

Wahai orang-orang yang beriman! Mohonlah pertolongan (kepada Allah) dengan sabar dan shalat. Sungguh, Allah beserta orang-orang yang sabar.

(terjemahan Surat *Al-Baqarah* ayat 153)*



*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2010. *Mushaf al-Azhar: Al-Qur'an dan Terjemah*. Bandung: Jabal.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Bima Setia Sandya Nugraha

NIM : 152010101121

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Peran *Outer Membrane Protein* (OMP) 32 kDa *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 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 mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 29 Januari 2019

Yang menyatakan,

Bima Setia Sandya Nugraha

NIM 152010101121

SKRIPSI

**PERAN *OUTER MEMBRANE PROTEIN* (OMP) 32 kDa
Klebsiella pneumoniae SEBAGAI PROTEIN
HEMAGLUTININ DAN ADHESIN**

Oleh

Bima Setia Sandya Nugraha
NIM 152010101121

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. M. Ali Shodikin, M.Kes, Sp.A
Dosen Pembimbing Anggota : dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Peran *Outer Membrane Protein (OMP)* 32 kDa *Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin” karya Bima Setia Sandya Nugraha telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : 29 Januari 2019

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I

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

dr. Rena Normasari, M.Biomed
NIP 198305122008122002

Anggota II

Anggota III

dr. M. Ali Shodikin, M.Kes, Sp.A
NIP 197706252005011002

dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed
NIP 198304052008121001

Mengesahkan

Dekan,

dr. Supangat, M.Kes, Ph.D, Sp.BA
NIP 197304241999031002

RINGKASAN

Peran *Outer Membrane Protein* (OMP) 32 kDa *Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin; Bima Setia Sandya Nugraha, 152010101121; 2018: 58 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri yang termasuk ke dalam famili Enterobacteriaceae yang sering menjadi penyebab terjadinya infeksi pada tubuh manusia. Saat ini *K. pneumoniae* memiliki kemampuan untuk resisten terhadap beberapa antibiotik yang diketahui memiliki keterkaitan dengan modifikasi dari salah satu faktor virulensi yang dimiliki oleh *K. pneumoniae*. Salah satu komponen dinding luar bakteri Gram-negatif yang diperkirakan terlibat pada berkembangnya imunitas adalah *Outer Membrane Protein* (OMP). Penelitian yang menjelaskan mengenai peran OMP 32 kDa sebagai protein hemagglutinin dan adhesin belum diteliti.

Jenis penelitian yang dilakukan ialah penelitian deskriptif analitik. Sampel yang digunakan berupa *Outer Membrane Protein* (OMP) yang didapatkan dari bakteri *K. pneumoniae*. Variabel bebas pada penelitian ini adalah berat molekul OMP 32 kDa *K. pneumoniae*, sedangkan variabel terikatnya ialah adanya aglutinasi darah mencit dan indeks adhesi. Untuk menemukan dan membuktikan adanya protein hemagglutinin pada OMP 32 kDa bakteri *K. pneumoniae* sebagai protein hemagglutinin dan adhesin, maka dilakukan analisis deskriptif dan uji korelasi-regresi.

Hasil uji hemagglutinasi menunjukkan bahwa semakin tinggi pengenceran maka semakin kecil titer hemagglutinasi. Berdasarkan hasil perhitungan indeks perlekatan bakteri *K. pneumoniae* pada sel enterosit mencit, menunjukkan bahwa semakin rendah konsentrasi OMP, maka semakin tinggi tingkat perlekatan *K. pneumoniae* yang menempel pada sel enterosit.

Kesimpulan penelitian ini adalah *Outer Membrane Protein* (OMP) 32 kDa *K. pneumoniae* dapat berperan sebagai protein hemagglutinin dan adhesin.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah Subhanahu wa Ta'ala, karena atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Peran *Outer Membrane Protein (OMP) 32 kDa Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin”. Skripsi ini disusun untuk 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. Baginda Nabi Besar Muhammad Shallallahu ‘alaihi wa ala alihi wa shahbihi wasallam, karena atas perjuangan dakwah beliau saya masih dapat merasakan nikmatnya iman dan islam hingga saat ini, sehingga semangat juang dakwah saya juga dapat terlaksana melalui penulisan skripsi ini;
2. Kedua orang tua saya Aris Setia Yudi dan Iva Yuyun Ratnowati yang sangat saya cintai beserta adik-adik saya Sania Putri Arista dan Sabrina Virgie Arista yang telah memberikan do’a dan dukungan terbaik sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik;
3. dr. Supangat, M.Kes, Ph.D, Sp.BA selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah memberikan doa’ dan dukungan dalam penulisan skripsi ini;
4. dr. Ancah Caesarina Novi M., Ph.D selaku dosen pembimbing akademik yang senantiasa memberikan motivasi dan bimbingan selama saya menjadi mahasiswa;
5. dr. M. Ali Shodikin, M.Kes, Sp.A selaku dosen pembimbing utama dan dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed selaku dosen pembimbing anggota yang telah memberikan bimbingan dan saran, serta telah meluangkan waktu untuk membimbing saya selama penulisan skripsi ini;
6. Dr. dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes selaku dosen penguji I dan dr. Rena Normasari, M.Biomed selaku dosen penguji II yang telah memberikan saran dan masukan sehingga naskah skripsi ini dapat terselesaikan;

7. dr. Dini Agustina, M.Biomed selaku koordinator Kelompok Riset yang telah membimbing dan mengajak saya untuk bergabung dalam pelaksanaan Keris ini, serta yang telah memberikan bimbingan dalam pengerjaan skripsi ini;
8. Analis Laboratorium Mikrobiologi Mbak Lilis Lestari, A.Md yang telah mendampingi saya dan teman-teman selama pengerjaan skripsi ini;
9. Guru-guru saya di jenjang SD, SMP, dan SMA, serta dosen-dosen saya di Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah memberikan pendidikan ilmu terbaiknya selama ini;
10. Kedua sahabat terbaikku Achmad Noval Rilo Pambudi dan Rangga Okta Sadewa yang senantiasa memberikan semangat dalam berbagai aspek kehidupan;
11. Sahabat-sahabat *jannahku* Achmad Dana Firmanjaya, Achmad Noval Rilo Pambudi, Ahmad Hasbi Al-Muzaky, Ahmad Syaikudin, Cahyo Bagaskoro, Eko Dakholal Firdaus, Firman Herdiana, Miftakhul Huda, Mizan Maulana, Muhamad Rizal Hadi Pratama, Muhammad Fikri Udin, Muhammad Rosyid Ridho, Mush'ab, Rangga Okta Sadewa, Saifan Rahmatullah, Tegar Syaiful Qodar, dan Yuda Nugraha atas segala do'a dan dukungannya;
12. Teman-teman main Azizah Mursyidati Nurulhayati, Adinningtyas Intansari, Astri Mutia Saraswati, Fatihah Mardiana Kartika, Ika Aulia Kurniasari, Indah Permata Sholicha, dan Laila Rizqi Kurniawati yang telah memberikan do'a dan dukungan terbaik;
13. Rekan-rekan sejawat Coccyx, mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember angkatan 2015;
14. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Januari 2019

Penulis

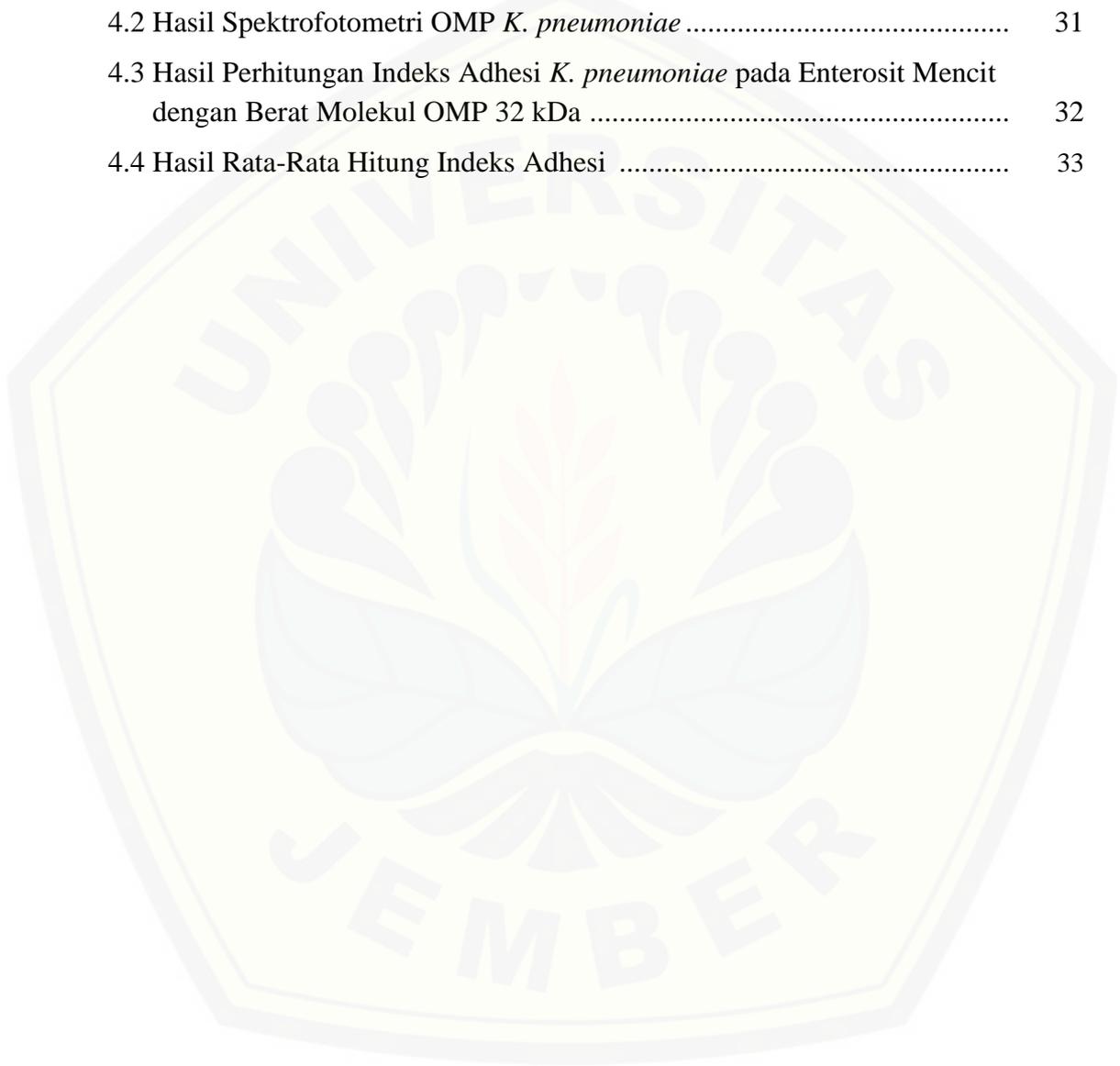
DAFTAR ISI

	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	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	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	5
2.1.3 Faktor Virulensi	6
2.2 Kerangka Konsep Penelitian	15
2.3 Hipotesis	16
BAB 3. METODE PENELITIAN	17
3.1 Jenis Penelitian	17
3.2 Rancangan Penelitian	17
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian	17
3.4 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.5 Variabel Penelitian	18
3.6 Definisi Operasional	18
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	18
3.7.1 Alat Penelitian	18
3.7.2 Bahan Penelitian	19
3.8 Prosedur Penelitian	19
3.8.1 Uji Kelayakan Etik	19
3.8.2 Identifikasi dan Kultur Bakteri <i>K. pneumoniae</i>	19
3.8.3 Isolasi OMP Bakteri <i>K. pneumoniae</i>	20
3.8.4 Identifikasi Berat Molekul OMP Bakteri dengan	

Elektroforesis (SDS-PAGE).....	21
3.8.5 Isolasi OMP Bakteri <i>K. pneumoniae</i>	21
3.8.6 Uji Hemaglutinin	22
3.8.7 Isolasi Sel Enterosit Mencit	23
3.8.8 Uji Adhesi	24
3.9 Analisis Data	26
3.10 Alur Penelitian	26
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 Hasil Penelitian	27
4.1.1 Hasil Uji Hemaglutinasi dan Spektrofotometri OMP <i>K. pneumoniae</i>	27
4.1.2 Hasil Isolasi OMP Bakteri <i>K. pneumoniae</i> dengan Elektroforesis (SDS-PAGE)	29
4.1.3 Identifikasi dan Kultur Bakteri <i>K. pneumoniae</i>	30
4.1.4 Hasil Uji Adhesi OMP 32 kDa dengan Pengenceran Bertingkat	31
4.2. Analisis Data	32
4.3 Pembahasan	34
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	46

DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Definisi operasional	18
4.1 Interpretasi Hasil Uji Biokimia pada <i>K. pneumoniae</i>	29
4.2 Hasil Spektrofotometri OMP <i>K. pneumoniae</i>	31
4.3 Hasil Perhitungan Indeks Adhesi <i>K. pneumoniae</i> pada Enterosit Mencit dengan Berat Molekul OMP 32 kDa	32
4.4 Hasil Rata-Rata Hitung Indeks Adhesi	33



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Koloni bakteri <i>K. pneumoniae</i> dalam agar darah	4
2.2 Morfologi bakteri <i>K. pneumoniae</i>	5
2.3 Faktor virulensi bakteri <i>K. pneumoniae</i>	7
2.4 Peran kapsul polisakarida <i>K. pneumoniae</i>	8
2.5 Kerangka konsep penelitian	15
3.1 Skema Prosedur Uji Hemaglutinasi	23
3.2 Skema Prosedur Uji Adhesi	25
3.3 Alur Penelitian	26
4.1 Hasil pewarnaan Gram bakteri <i>K. pneumoniae</i>	28
4.2 Koloni bakteri <i>K. pneumoniae</i> pada media <i>MacConkey</i>	28
4.3 Hasil uji biokimia pada <i>K. pneumoniae</i>	29
4.4 Hasil isolasi OMP <i>K. pneumoniae</i> dengan elektroforesis (SDS-PAGE).	30
4.5 Hasil Uji Hemaglutinasi OMP <i>K. pneumoniae</i>	31
4.6 Hasil Uji Adhesi OMP 32 kDa <i>K. pneumoniae</i> dengan Pengenceran Bertingkat	32
4.7 Grafik korelasi antara titer pengenceran dengan indeks adhesi	34

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Lembar Persetujuan Etik	46
3.2 Surat Rekomendasi Bebas Plagiasi	47
3.3 Prosedur Identifikasi dan Kultur Bakteri <i>K. pneumoniae</i>	48
3.4 Prosedur Isolasi OMP Bakteri <i>K. pneumoniae</i>	49
3.5 Prosedur Identifikasi Berat Molekul OMP Bakteri dengan Elektroforesis (SDS-PAGE)	50
3.6 Prosedur Pemurnian OMP Bakteri <i>K. pneumoniae</i>	51
3.7 Prosedur Uji Hemaglutinasi	52
3.8 Prosedur Isolasi Sel Enterosit Mencit	53
3.9 Prosedur Uji Adhesi	54
3.10 Penggunaan Alat Pelindung Diri (APD), Penggunaan <i>Biosafety Cabinet</i> , dan Tata Cara Pembuangan Limbah Mikrobiologi	55
4.1 Tabel Hasil Uji Normalitas	57
4.2 Tabel Hasil Uji Korelasi	58
4.3 Tabel Hasil Uji Regresi	59

DAFTAR SINGKATAN

BHI	= <i>Brain Heart Infusion</i>
EDTA	= <i>Ethylene Diamine Tetraacetic</i>
ESBLs	= <i>Extended Spectrum β-Lactamases</i>
ISPA	= <i>Infeksi Saluran Pernapasan Akut</i>
ITIS	= <i>Integrated Taxonomy Information System</i>
LPS	= <i>Lipopolisakarida</i>
MDR	= <i>Multi Drug Resistance</i>
MRSA	= <i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>
MR-VP	= <i>Methyl Red Voges Proskauer</i>
MSSA	= <i>Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus</i>
NOG	= <i>n-octyl-β-Glucopyranodase</i>
OMP	= <i>Outer Membrane Protein</i>
PBS	= <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDPI	= <i>Perhimpunan Dokter Paru Indonesia</i>
SDS-PAGE	= <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis</i>
TCA	= <i>Trichloroacetic Acid</i>
TCG	= <i>Tryptone Casitone Glucose</i>
TSIA	= <i>Triple Sugar Iron</i>
WHO	= <i>World Health Organization</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri Gram-negatif yang termasuk ke dalam famili Enterobacteriaceae yang berbentuk basil pendek, tidak menghasilkan spora, memiliki kapsul, dan nonmotil karena tidak memiliki flagel. Berdasarkan kebutuhannya terhadap oksigen, *K. pneumoniae* merupakan bakteri fakultatif anaerob. Dalam media agar, pertumbuhan *K. pneumoniae* menunjukkan sifat mukoid. Bakteri ini memiliki kemampuan memfermentasikan karbohidrat untuk membentuk asam dan gas. Selain itu, *K. pneumoniae* juga memiliki kemampuan untuk memfermentasikan laktosa (Brooks dkk., 2014; Tarina dan Kusuma, 2017).

K. pneumoniae sering menjadi penyebab terjadinya infeksi pada tubuh manusia seperti abses hati piogenik, bakteremia, infeksi intra-abdominal, infeksi saluran kemih, meningitis, dan pneumonia. Bakteremia yang disebabkan oleh *K. pneumoniae* telah teridentifikasi pada insidensi tahunan yang mencapai 7,1 per 100.000 kasus. Pada pria lanjut usia memiliki risiko tertinggi untuk terkena bakteremia yang disebabkan oleh *K. pneumoniae*. Proses dialisis, transplantasi organ padat, penyakit hati kronis, dan kanker merupakan faktor risiko terjadinya bakteremia oleh *K. pneumoniae*. Persentase kematian akibat insiden infeksi *K. pneumoniae* mencapai 20% dengan angka kematian tahunan mencapai 1,3 per 100.000. *K. pneumoniae* juga dapat menyebabkan nekrotikans hemoragik pada paru dan sebagian kecil dapat menyebabkan pneumonia bakterialis. Berdasarkan data yang didapatkan dari empat rumah sakit yang terletak di Indonesia, yaitu RS Adam Malik, RS Dr. M. Jamil, RSUD Dr. Muwardi, dan RSUP Persahabatan menunjukkan bahwa *K. pneumoniae* menjadi penyebab nomor satu dari kejadian pneumonia (Meatherall dkk., 2009; Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2014; Vading dkk., 2018).

Saat ini *K. pneumoniae* memiliki kemampuan untuk resisten terhadap beberapa antibiotik, sehingga *K. pneumoniae* termasuk dalam patogen *Multi Drug Resistance* (MDR) yang dapat mengakibatkan pengobatan untuk infeksi ini sangat terbatas. Mekanisme resistensi ini melibatkan ekspresi dari *Extended Spectrum β -*

Lactamases (ESBLs) oleh *K. pneumoniae*, yang membuat bakteri ini resisten terhadap sefalosporin dan monobaktam. Mekanisme resistensi lainnya adalah adanya ekspresi *carbapenemase* oleh *K. pneumoniae*, yang membuat bakteri ini resisten terhadap hampir semua laktam yang ada, termasuk *carbapenem*. Tingkat resistensi terhadap trimethoprim/sulfamethoxazole meningkat secara signifikan selama tahun 2000 hingga 2007. Selain dari beberapa mekanisme resistensi yang disebutkan diatas, penelitian lain menyebutkan mekanisme resistensi ini juga diketahui memiliki keterkaitan dengan modifikasi dari lipopolisakarida (LPS), yang merupakan salah satu faktor virulensi yang dimiliki oleh *K. pneumoniae* (Meatherall dkk., 2009; Wright dkk., 2014; Navon-Venezia dkk., 2016).

K. pneumoniae memiliki beberapa faktor virulensi yang diketahui terlibat dalam mekanisme patogenik dalam menginfeksi sel inang, diantaranya adalah kapsul, lipopolisakarida, resistensi serum, pili, dan siderofor. Tiga komponen dinding luar bakteri Gram-negatif yang diperkirakan terlibat pada berkembangnya imunitas adalah LPS, membran proteoglikan, dan *Outer Membrane Protein* (OMP). *Outer Membrane Protein* (OMP) merupakan afimbrial adhesin yang dapat melekat pada hospes lebih kuat dibandingkan pili (Santoso, 2002; Pertiwi dkk., 2009). Penelitian mengenai faktor adhesin pada bakteri *K. pneumoniae* yang berperan sebagai protein hemaglutinin dan adhesin yang pernah ditemukan adalah protein adhesin OMP 20 kDa dan OMP 40 kDa (Susilo dkk., 2004; Pertiwi dkk., 2009). Selain pada bakteri *K. pneumoniae*, penelitian lain mengenai faktor adhesin yang dapat berperan sebagai protein hemaglutinin dan protein adhesin yang pernah ditemukan adalah pada pili 16 kDa pada bakteri *A. baumannii* (Noorhamdani, 2005), OMP 49,4 kDa bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Mubarokah dkk., 2009), OMP 55 kDa bakteri *Salmonella typhi*, OMP 35 kDa bakteri *Proteus mirabilis* (Suswati dan Mufida, 2010), pili 45 kDa bakteri *P. mirabilis* (Mufida dkk., 2010), pili 38,19 kDa pada bakteri *P. aeruginosa* (Hidayati, 2010).

Berdasarkan dari latar belakang diatas, belum ada penelitian yang menjelaskan mengenai peran OMP 32 kDa sebagai protein hemaglutinin dan adhesin. Oleh karena itu peneliti tertarik untuk melakukan suatu penelitian dengan

judul “Peran *Outer Membrane Protein* (OMP) 32 kDa *Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin”.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, rumusan masalah dari penelitian ini yaitu apakah OMP 32 kDa bakteri *K. pneumoniae* memiliki peran sebagai protein hemagglutinin dan adhesin?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui peran OMP 32 kDa bakteri *K. pneumoniae* sebagai protein hemagglutinin dan adhesin.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang didapatkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

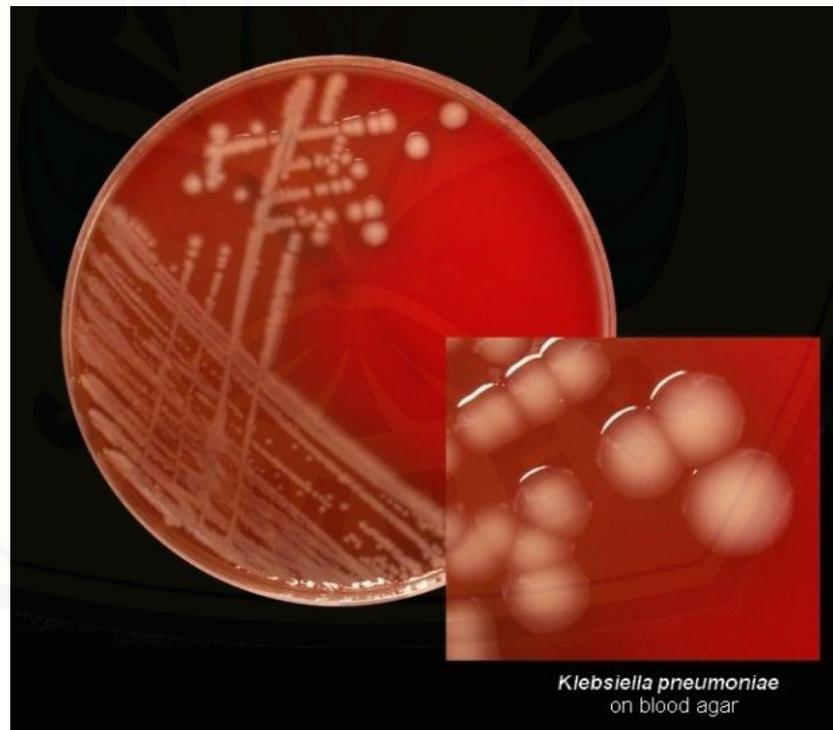
- a. Dapat memberikan pemahaman mengenai infeksi pneumonia yang disebabkan oleh bakteri *K. pneumoniae*, khususnya dengan mengetahui peran faktor virulensi OMP dengan berat molekul 32 kDa bakteri *K. pneumoniae* sebagai protein hemagglutinin dan adhesin.
- b. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar untuk penelitian lebih lanjut untuk dikembangkan menjadi vaksin sebagai pencegahan terhadap infeksi yang disebabkan oleh bakteri *K. pneumoniae*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

2.1.1 Morfologi dan Taksonomi

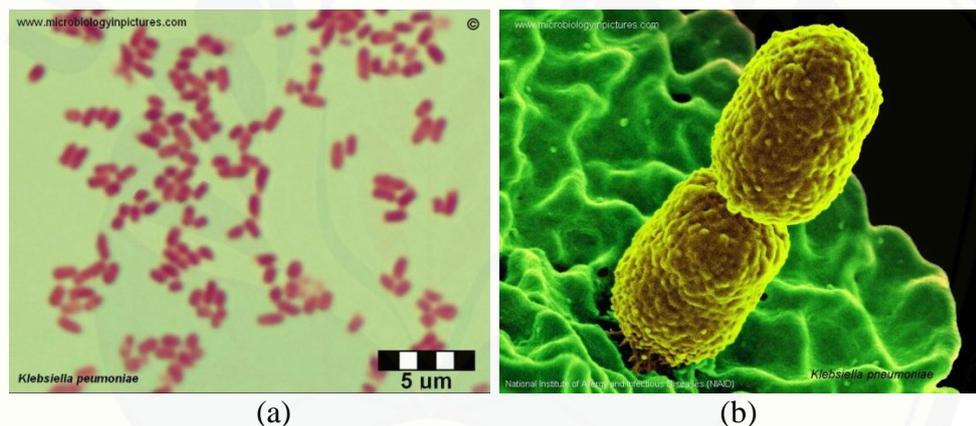
Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri yang berasal dari famili Enterobacteriaceae dengan bentuk batang pendek Gram-negatif dengan ukuran 0,5-0,5 x 1,2 μ (Gambar 2.2) dan bersifat fakultatif anaerob. Koloni bakteri *K. pneumoniae* pada kultur memperlihatkan pertumbuhan yang bersifat mukoid (lihat Gambar 2.1) dan nonmotil karena bakteri ini tidak memiliki flagel. Bakteri ini memiliki kapsul polisakarida yang besar, tetapi tidak membentuk spora. *K. pneumoniae* mampu memfermentasikan karbohidrat menjadi asam dan gas, serta dapat juga memfermentasikan laktosa (Brooks dkk., 2014; Tarina dan Kusuma, 2017).



Gambar 2.1 Koloni bakteri *K. pneumoniae* pada media agar darah (Sumber: Microbiology In Pictures, 2013)

Taksonomi bakteri *K. pneumoniae* berdasarkan *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS) adalah sebagai berikut.

Kingdom : Bacteria
Subkingdom : Negibacteria
Phylum : Proteobacteria
Class : Gammaproteobacteria
Order : Enterobacteriales
Family : Enterobacteriaceae
Genus : *Klebsiella*
Species : *Klebsiella pneumoniae*



(a) Morfologi *K. pneumoniae* dalam Pewarnaan Gram; (b) Morfologi *K. pneumoniae* dengan *Digitally-Colored Scanning Electron Micrograph* (SEM)

Gambar 2.2 Morfologi bakteri *K. pneumoniae* (Sumber: Microbiology In Picture, 2013)

2.1.2 Epidemiologi dan Transmisi

Bakteri *K. pneumoniae* pada awalnya dikenal sebagai bakteri Friedlander, yang pertama kali diisolasi pada akhir abad ke-19 yang menyebutkan bahwa bakteri ini merupakan bakteri Gram-negatif, *encapsulated*, nonmotil yang hidup di tanah dan permukaan air. Di dalam tubuh manusia, bakteri ini menyebabkan berbagai macam infeksi, termasuk pneumonia, infeksi saluran kemih, bakteriemia, dan abses hati. *K. pneumoniae* mudah berkolonisasi di permukaan mukosa pada tubuh manusia, termasuk saluran gastrointestinal dan orofaring. Selain itu, bakteri

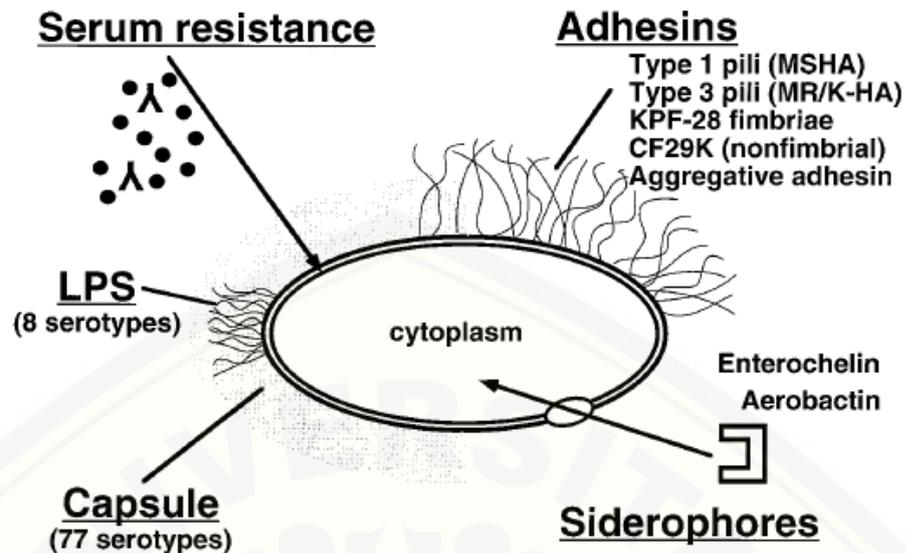
K. pneumoniae terdapat dalam saluran pernapasan dan feses sekitar 5% pada individu normal, dan bakteri tersebut menyebabkan sebagian kecil yaitu sekitar 1% pneumonia bakterialis dan spesies *Klebsiella* ini termasuk dalam sepuluh besar patogen bakterialis yang menyebabkan infeksi nosokomial (Brooks, dkk., 2014; Paczosa dan Mescas, 2016).

Spesies bakteri *K. pneumoniae* merupakan salah satu jenis bakteri Gram-negatif yang dapat bertahan hidup di permukaan mati selama 2 jam bahkan hingga 30 bulan lebih. Spesies ini ditemukan diantara isolat yang paling sering dari pasien dengan infeksi nosokomial (Kramer, dkk., 2006).

2.1.3 Faktor Virulensi

K. pneumoniae menggunakan banyak cara agar dapat tumbuh dan melindungi dirinya dari aktivitas respon imun yang terdapat pada tubuh inang. Paczosa dan Mescas (2016) menyatakan bahwa sampai saat ini terdapat empat kelas utama faktor virulensi yang telah teridentifikasi pada *K. pneumoniae*. Faktor virulensi ini terdiri dari kapsul polisakarida; lipopolisakarida (LPS); siderofor; dan fimbria, yang juga dikenal sebagai pili. Beberapa faktor virulensi lain telah teridentifikasi seperti OMP, porin, pompa eflux, sistem transportasi besi, dan gen yang terlibat dalam metabolisme allantoin. Faktor-faktor virulensi ini memainkan berbagai peran yang penting dalam terjadinya berbagai jenis infeksi yang disebabkan oleh *K. pneumoniae*. Berdasarkan pada faktor-faktor virulensi yang telah diketahui, mekanisme infeksi yang dilakukan oleh *K. pneumoniae* bersifat defensif dalam melindungi dirinya terhadap respons imun yang terdapat pada tubuh inang. Ketika *K. pneumoniae* mulai menginfeksi tubuh inang, bakteri ini memiliki kemampuan untuk menghindari fagositosis dengan menggunakan kapsul, sehingga *K. pneumoniae* lebih sulit untuk diikat dan diambil oleh fagosit.

Menurut Podschun dan Ullmann (1998) dalam Pertiwi dkk (2009), terdapat lima faktor virulensi utama yang dimiliki oleh bakteri *K. pneumoniae* yang memiliki peran penting terhadap terjadinya suatu infeksi, diantaranya adalah kapsul polisakarida, lipopolisakarida (LPS), protein adhesin, resistensi serum, siderofor (Gambar 2.3).



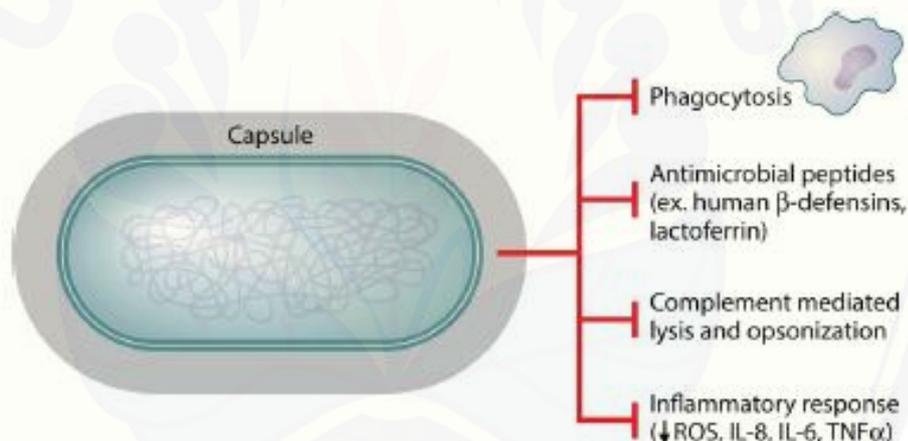
Gambar 2.3 Faktor virulensi bakteri *K. pneumoniae* (Sumber: Podschun dan Ullmann 1998)

Beberapa penelitian lain menyebutkan terdapat beberapa faktor virulensi yang dimiliki oleh bakteri *K. pneumoniae* selain lima faktor virulensi utama yang disebutkan oleh Podschun dan Ullmann (1998), diantaranya adalah formasi biofilm, mekanisme urease, metabolisme allantoin, dan resistensi antibiotik (Lidkk., 2014; Clegg dan Murphy, 2016; dan Paczosa dan Mescas, 2016).

a. Kapsul Polisakarida

Kapsul dianggap sebagai penentu virulensi paling penting dari *K. pneumoniae*. Kapsul polisakarida ini memiliki beberapa peran diantaranya dapat mencegah atau menghindari proses fagositosis dan opsonofagositosis bakteri oleh sel-sel granulosit PMN (Gambar 2.4). Secara keseluruhan, strain *K. pneumoniae* yang paling virulen dapat menghasilkan kapsul yang terdiri dari sakarida yang dapat menghindari pengikatan oleh sel fagositik, sehingga strain *Klebsiella* ini lebih tahan terhadap proses fagositosis. Selain peran kapsul dalam mencegah atau menghindari fagositosis oleh makrofag dan PMN, kapsul polisakarida dapat menghambat aksi bakterisida dari peptida antimikroba seperti *human beta defensin 1* hingga 3 dan laktoferin dengan mengikat molekul-molekul ini dari membran luar (Gambar 2.4). Kapsul polisakarida juga dapat menghambat

komplemen C3, dari berinteraksi dengan membran sel bakteri, sehingga dapat mencegah lisis dan opsonisasi yang dimediasi oleh komplemen sehingga dapat mencegah aktivasi respons imun yang fulminan, yang diukur dengan penurunan *reactive oxygen species* (ROS), produksi IL-8, IL-6, dan TNF α (Gambar 2.4). Selain ketiga peran kapsul diatas, terdapat penelitian yang menunjukkan bahwa kapsul polisakarida ini dapat mempengaruhi interaksi dengan sel dendritik. Kapsul dapat menginduksi pematangan sel dendritik dengan meningkatkan ekspresi penanda CD83, CD86, TLR4 dan menurunkan produksi penanda CD14. Bahan kapsul *K. pneumoniae* dapat menginduksi respon imunologis yang rusak, yang ditandai dengan pematangan sel dendritik dengan peningkatan produksi sitokin pro-Th1 (Paczosa dan Mescas, 2016).



Gambar 2.4 Peran kapsul polisakarida *K. pneumoniae* (Sumber: Paczosa dan Mescas, 2016)

Saat ini terdapat lebih dari 77 jenis kapsul antigenik yang diproduksi oleh bakteri *Klebsiella*. Di antara 77 jenis kapsul yang ini, kapsul tipe K1, K2, K4 dan K5 sangat virulen pada uji eksperimental terhadap tikus. Isolat kapsul tipe K1 sering ditemukan pada kasus pneumonia dan *Pyogenic Liver Abscess* (PLA) terutama bagi penderita yang mengalami komplikasi, isolat tipe K2 sering terkait penyakit infeksi saluran kemih, kapsul tipe K3 sering ditemukan sebagai penyebab dari rhinoscleroma, isolat tipe K4 dan K5 sering menjadi penyebab

pneumonia komunitas pada masyarakat. (Brisse dkk., 2009; Clegg dan Murphy, 2016).

b. Lipopolisakarida (LPS)

LPS yang juga dikenal sebagai endotoksin merupakan komponen utama dari suatu membran luar sel pada semua bakteri Gram-negatif. LPS merupakan faktor virulensi penting yang dapat melindungi *K. pneumoniae* terhadap sistem pertahanan humoral pada tubuh manusia. LPS terdiri dari tiga bagian, yaitu lipid A yang bersifat hidrofobik dan terdapat pada membran luar, antigen-O yang sangat bervariasi sebagai komponen terluar dari LPS, dan polisakarida inti yang menghubungkan antara lipid A dan O-antigen (Li dkk., 2014; Paczosa dkk., 2016).

1. Lipid A

Lipid A disintesis dalam sitoplasma oleh suatu enzim yang diangkut oleh transporter ABC MsbA dan terdapat di membran luar. Selama pengangkutan lipid A, terjadi proses modifikasi kovalen dari lipid A yang dikatalisis oleh berbagai enzim modifikasi terhadap rangsangan lingkungan, yang terlibat dalam modulasi virulensi dari sejumlah Enterobacteriaceae yang bersifat patogen. Modifikasi lipid *K. pneumoniae* berkontribusi terhadap resistensi pada sistem pertahanan bawaan dari inang, terutama resistensi terhadap peptida antibakteri. Lipid A dan polisakarida inti diperlukan untuk pertahanan terhadap fagositosis oleh makrofag alveolar pada hewan coba tikus, yang memainkan peran penting dalam pertahanan inang terhadap *K. pneumoniae* (Paczosa dkk., 2016).

2. Antigen-O

Terdapat sembilan kelompok antigen-O (O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8, dan O12) yang telah dikenali pada *K. pneumoniae*. Antigen O1 merupakan serotipe yang paling umum di antara isolat klinis *K. pneumoniae* dan juga lebih banyak ditemukan pada strain invasif daripada pada strain *nontissue-invasive*. Antigen-O *K. pneumoniae* mencegah akses komponen komplemen ke aktivator dan dengan demikian berkontribusi

terhadap resistensi bakteri terhadap pembunuhan yang dimediasi komplemen (Paczosa dan Mescas, 2016).

c. Resistensi Serum

Pertahanan pertama oleh inang terhadap mikroorganisme yang menyerang meliputi efek bakterisida suatu serum dan proses fagositosis oleh sel polimorfonuklear. Aktivitas serum bakterisida diperantarai oleh suatu protein komplemen. Setelah terjadi proses *cascade-like activation*, protein komplemen terakumulasi dalam bentuk *membrane attack complex* pada permukaan bakteri. Kompleks ini terdiri dari protein komplemen terminal C5b-C9 yang dapat menghasilkan pori transmembran pada *outer membrane* bakteri Gram-negatif, yang menyebabkan masuknya Na^+ dan lisis pada bakteri. Kaskade komplemen dapat diaktifkan melalui dua mekanisme yang berbeda, yaitu jalur komplemen alternatif, yang dapat diaktifkan tanpa membutuhkan antibodi dan jalur komplemen klasik, yang dapat diaktifkan dengan adanya antibodi spesifik. Jalur alternatif dianggap sebagai sistem pertahanan awal imunitas bawaan, yang dapat memungkinkan inang untuk bereaksi terhadap mikroorganisme patogen bahkan sebelum antibodi spesifik terbentuk. Kedua jalur kaskade komplemen tersebut, melalui aktivasi dari komplemen C3 menjadi pembentukan opsonin C3b, dapat menghasilkan pembentukan terminal C5b-C9 kompleks, sehingga dengan demikian kedua jalur kaskade ini dapat memainkan peran dalam sistem pertahanan pada tubuh (Podschun dan Ullmann, 1998).

Kebanyakan bakteri Gram-negatif komensal sensitif terhadap efek bakterisida dari serum yang terdapat pada tubuh manusia, namun bakteri Gram-negatif yang bersifat patogen memiliki kemampuan resistensi terhadap serum tersebut. Dengan demikian, isolat klinis Enterobacteriaceae sering menunjukkan resistensi terhadap serum, dan sifat resistensi serum ini memiliki hubungan dengan timbulnya infeksi dan beratnya manifestasi klinis yang ditimbulkan. Peran utama dari sistem serum bakterisida dapat mencegah infeksi dari mikroorganisme dan dapat mencegah bakteri untuk bertahan dalam darah (Podschun dan Ullmann, 1998).

d. Protein Adhesin

Kemampuan untuk melekat pada permukaan komponen biotik dan abiotik merupakan mekanisme awal yang dapat meningkatkan kelangsungan hidup suatu bakteri dan merupakan salah satu fungsi virulensi utama yang dimiliki oleh berbagai macam bakteri patogen (Gerlach dan Hensel, 2007). Kemampuan adhesi suatu bakteri diperantarai oleh struktur yang berbeda yang dapat dibagi lagi menjadi dua kelas utama, yaitu *fimbrial adhesin* dan *non-fimbrial adhesin* (Soto dan Hultgren, 1999).

1. Adhesin fimbrial

Menurut Lindahl dkk (1981) dalam Gerlach dan Hensel (2007), fimbria atau pili merupakan sejumlah filamen lurus dan kaku yang terdapat pada permukaan bakteri. Struktur ini paling banyak ditemukan pada bakteri Gram-negatif yang terdapat pada membran luar. Fimbria terdiri dari ratusan hingga ribuan subunit yang memiliki fungsi untuk memperantarai adhesi melalui interaksi spesifik dengan reseptor yang ada pada sel inang. Selain itu, fimbria juga memiliki kemampuan untuk memperantarai adhesi yang tidak spesifik dengan meningkatkan hidrofobisitas permukaan bakteri. Saat ini terdapat empat jenis fimbria, yaitu fimbria tipe 1, fimbria tipe 3, fimbria Kpc, dan adhesin KPF-28, telah teridentifikasi secara eksperimental untuk *K. pneumonia* (Li dkk., 2014).

a. Fimbria tipe 1

Fimbria tipe 1 memiliki bentuk berupa tonjolan tipis seperti benang pada permukaan sel bakteri dan diekspresikan pada 90% isolat *K. pneumoniae* dan hampir semua anggota Enterobacteriaceae. Fimbria tipe 1 memiliki beberapa macam gen. Gen *fimA* mengkodekan subunit FimA untuk membentuk struktur dominan fimbria tipe 1, gen *fimH* yang mengkodekan subunit FimH yang memiliki sifat perekat. Fimbria tipe 1 pada *K. pneumonia* mengikat glikoprotein D-mannosilasi, sehingga pengikatan oleh fimbria tipe 1 sering disebut "*mannose-sensitive*" binding (Firon dkk., 1984; Gerlach dkk., 1989; Jones dkk.,

1995; Klemm dan Schembri, 2000; Struve dkk., 2008; Kline dkk., 2009; Stahlhut dkk., 2009; Paczosa dkk., 2016).

b. Fimbria tipe 3

Fimbria tipe 3 dihasilkan oleh beberapa bakteri Enterobacteriaceae. Fimbriae tipe 3 terbukti memiliki peran utama dalam pembentukan biofilm dari *K. pneumoniae* secara in vitro pada permukaan abiotik dan biotik. Fimbria tipe 3 berbentuk filamen mirip helix. Pada *K. pneumoniae*, fimbria tipe 3 dikodekan oleh kluster gen *mrkABCD*. Sebagian besar struktur terdiri dari subunit MrkA yang berperan untuk pembentukan biofilm pada permukaan abiotik dan juga terdapat subunit MrkD. Selain itu, juga terdapat subunit MrkF yang berfungsi untuk menjaga stabilitas pada permukaan fimbria. Sama seperti fimbria tipe 1, operon penyandi fimbria tipe 3 telah teridentifikasi dan diekspresikan oleh hampir semua isolat *K. pneumoniae*. Berbeda dengan fimbria tipe 1, fimbria tipe 3 disebut sebagai “*mannose insensitive*” karena tidak mengikat mannose (Allen dkk., 1991; Tarkkanen dkk., 1998; Langstraat dkk., 2001; Jagnow dan Clegg, 2003; Ong dkk., 2008; Schroll dkk., 2010; Paczosa dkk., 2016).

c. Fimbria Kpc

Fimbria Kpc disintesis dan dirakit oleh produk-produk operon *kpcABCD*, yang memiliki keterkaitan dengan *hypermucoviscous K. pneumoniae*. Fimbria Kpc memiliki komponen subunit utama yang disebut *kpcA* (Wu dkk., 2010; Li dkk., 2014).

d. Adhesin KPF-28

Sebagai polimer dari subunit fimbrin utama 28 kDa, KPF-28 merupakan fimbria yang panjang, tipis, fleksibel, dan berdiameter 4-5 nm dengan panjang 0,5–2 mm, serta memiliki gen struktural yang terletak pada *R-plasmid* yang dapat ditransfer yang mengkode enzim CAZ-5/SHV-4 β -laktamase. Fimbria KPF-28 berkontribusi pada proses adhesi *K. pneumoniae* pada garis sel *human Caco-2*, yang

menunjukkan kemungkinan bahwa fimbria ini merupakan faktor kolonisasi dalam usus mamalia (Martino dkk., 1996; Li dkk., 2014).

2. Adhesin nonfimbrial

Adhesin nonfimbrial disebut juga sebagai *Outer Membrane Protein* (OMP). *Outer Membrane Protein* (OMP) memiliki peran yang penting untuk integritas membran, transportasi molekul, dan proses patogenesis pada tubuh inang. (Llobet dkk., 2009).

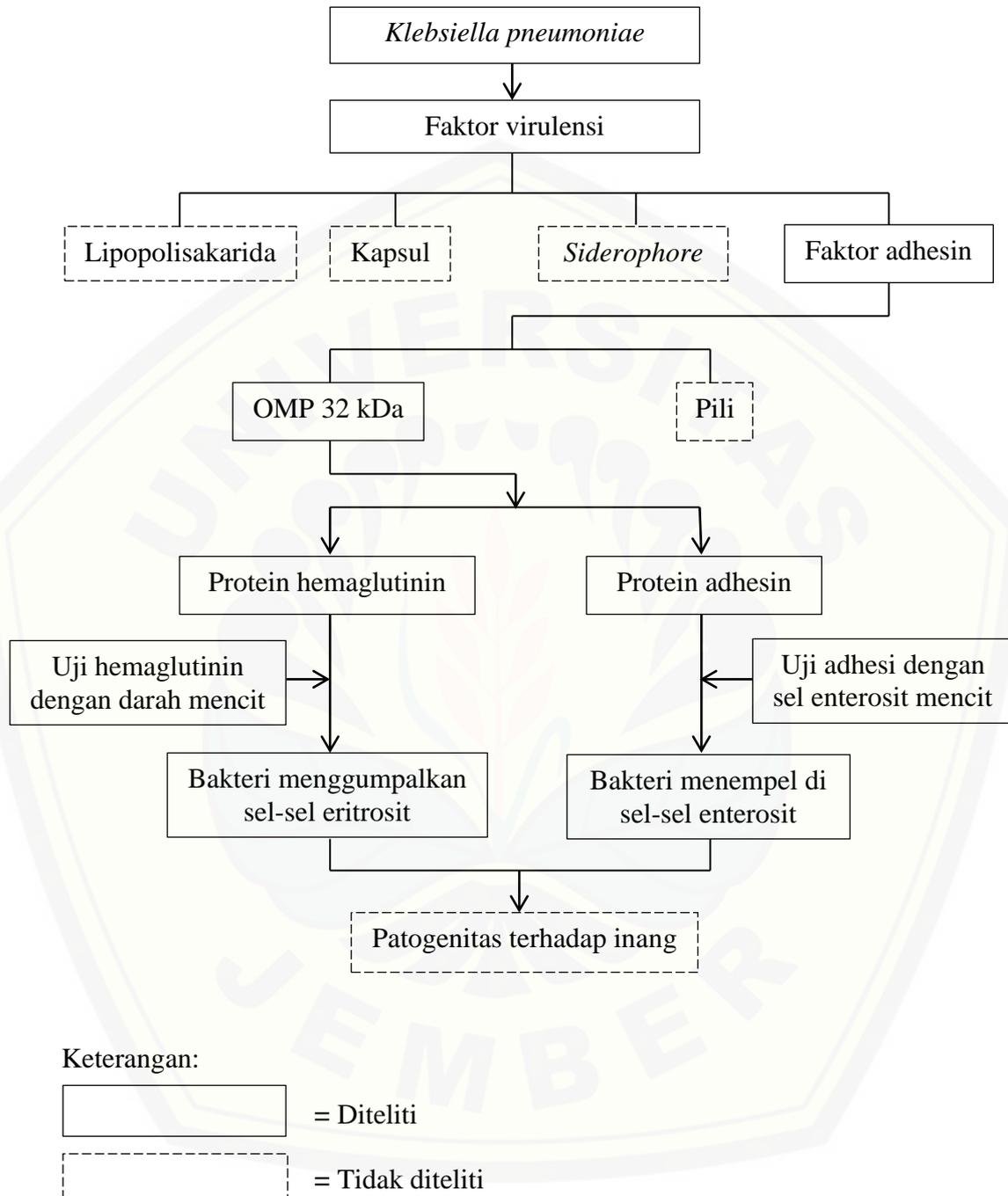
Beberapa jenis OMP telah tercatat memiliki fungsi penting sebagai salah satu faktor virulensi yang dimiliki oleh *K. pneumoniae*, diantaranya adalah *outer membrane protein A* (OmpA), lipoprotein (Pal) terkait peptidoglikan, dan murein lipoprotein (LppA). OmpA adalah OMP yang telah teridentifikasi dengan baik dan telah terbukti dapat memediasi fungsi adhesi pada dan/atau invasi sel eukariotik dan resistensi serum (Llobet dkk., 2009). OmpA sebagai salah satu faktor virulensi *K. pneumoniae* memiliki mekanisme perlindungan terhadap respon imun bawaan. Namun, penelitian menggunakan OmpA yang dimurnikan menghasilkan gambaran yang tampak bertentangan. Di satu sisi, penggunaan OmpA murni memberikan gambaran bahwa OmpA dapat berikatan dengan sel epitel bronkial, serta sel DC dan makrofag, yang mengakibatkan terjadinya peningkatan produksi sitokin. Pengikatan OmpA ke DC dan makrofag terjadi melalui reseptor LOX-1, yang kemudian menyebabkan terjadinya pensinyalan TLR2. Namun di sisi lain, OmpA sendiri dapat menghambat produksi sitokin dan dapat meningkatkan resistensi bakteri terhadap peptida antimikroba seperti α -defensin. Perbedaan dalam hasil penelitian ini menyoroti bahwa pentingnya mempelajari faktor virulensi dalam konteks bakteri dan menunjukkan bahwa hasil dapat bervariasi antar strain karena adanya antigen yang berbeda tiap bakteri dan faktor virulensi yang memodulasi peradangan, seperti LPS dan kapsul. Kontribusi OMPs terkait peptidoglikan lipoprotein (Pal) dan murein lipoprotein (LppA) yang terkait dengan virulensi *K. pneumoniae* tidak diidentifikasi secara luas. Eksperimen in vitro dengan strain-strain *K.pneumoniae* ini menunjukkan

bahwa mekanisme di balik peningkatan kekebalan bakteri yang ditimbulkan oleh protein-protein ini dapat mencakup perlindungan terhadap fagositosis neutrofil dan pembunuhan oleh neutrofil dan komponen serum. Protein-protein ini juga diduga memiliki peran terhadap integritas dan impermeabilitas selektif dari membran sel melalui LPS dan kapsul yang dapat memperkuat resistensi *K. pneumoniae* terhadap antibiotik tertentu (Paczosa dkk., 2016).

e. Siderofor

Pertumbuhan *K. pneumoniae* secara in vivo membutuhkan pemanfaatan zat besi untuk proses metabolisme esensial. Karena zat besi juga diperlukan oleh sel inang, bakteri harus bersaing dengan inang untuk mendapatkan zat besi yang tersedia agar bakteri dapat bertahan hidup. Senyawa pengikat besi pada inang, seperti transferrin dan laktoferin, merupakan senyawa pengikat kuat unsur besi dan *K. pneumoniae* telah berevolusi untuk menghasilkan sistem pengikatan besi tersendiri untuk mendapatkan zat besi yang diperlukan untuk kelangsungan hidupnya. Pentingnya ketersediaan besi dan patogenesis *K. pneumoniae* menunjukkan bahwa kelebihan zat besi pada tubuh inang dapat meningkatkan patogenisitas bakteri (Clegg dan Murphy, 2016).

2.2 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2.5 Kerangka konsep penelitian

Bakteri *K. pneumoniae* memiliki berbagai macam faktor virulensi, diantaranya lipopolisakarida, kapsul polisakarida, siderofor, dan faktor adhesin yang terdiri dari pili dan OMP. Dari semua faktor virulensi tersebut, yang akan diteliti oleh peneliti adalah OMP bakteri *K. pneumoniae* dengan berat molekul 32 kDa untuk mengetahui perannya sebagai protein hemagglutinin dan protein adhesin. Untuk mengetahui perannya sebagai protein hemagglutinin dilakukan uji hemagglutinin dengan menggunakan darah mencit, dan untuk mengetahui perannya sebagai protein adhesin dilakukan uji adhesi dengan menggunakan sel enterosit mencit.

Perlekatan bakteri *K. pneumoniae* pada sel inang dapat menyebabkan terjadinya proses patogenesis pada tubuh penderita sehingga dapat menimbulkan berbagai macam manifestasi klinis pada tubuh *hospes*.

2.3 Hipotesis

OMP 32 kDa bakteri *K. pneumoniae* dapat berperan sebagai protein hemagglutinin dan adhesin.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilaksanakan adalah penelitian deskriptif analitik, dengan tujuan untuk membuktikan bahwa OMP 32 kDa *K. pneumoniae* dapat berperan sebagai protein hemaglutinin dan adhesin.

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yaitu;

- a. Tahap identifikasi dan kultur bakteri *K. pneumoniae*

Tahap ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan memperbanyak koloni dari bakteri *K. pneumoniae*.

- b. Tahap isolasi OMP bakteri *K. pneumoniae* dan identifikasi protein hemaglutinin OMP bakteri *K. pneumoniae*

Tahap ini bertujuan untuk mendapatkan berat molekul OMP bakteri *K. pneumoniae* dan untuk mendapatkan protein hemaglutinin dari berat molekul OMP yang didapat, yang akan dilanjutkan untuk uji adhesi.

- c. Tahap uji adhesi

Tahap ini bertujuan untuk membuktikan bahwa berat molekul OMP bakteri *K. pneumoniae* yang didapat merupakan protein adhesin. Analisis dalam tahap ini adalah indeks adhesi dibandingkan dengan konsentrasi protein hemaglutinin OMP bakteri *K. pneumoniae* yang didapatkan.

3.3 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah *Outer Membrane Protein* (OMP) yang didapatkan dari isolat bakteri *K. pneumoniae* yang didapatkan dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Waktu yang dibutuhkan dalam pelaksanaan penelitian ini yaitu sekitar tiga bulan.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah berat molekul OMP 32 kDa *K. pneumoniae* titer pengenceran. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aglutinasi darah mencit dan indeks adhesi.

3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel berikut;

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Jenis Data
Outer Membrane Protein	Protein membran yang terletak diluar dinding sel bakteri <i>K. pneumoniae</i>	Penggaris	Membandingkan dengan protein <i>marker</i>	Kuantitatif	Rasio
Titer hemaglutinin	Adanya aglutinasi eritrosit pada pengenceran terendah	-	Membandingkan aglutinasi pada tiap pengenceran	Kuantitatif	Rasio
Indeks adhesi	Jumlah rata-rata bakteri yang menempel di tiap 100 sel enterosit mencit	-	Menghitung jumlah bakteri yang menempel pada sel enterosit mencit dengan perbesaran mikroskop 1000x	Kuantitatif	Rasio

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu laminer, vortex, rotator, *centrifuge*, *pilli cutter*, inkubator, sterilisator, elektroforesis SDS-PAGE, tabung Erlenmeyer, *object glass*, *cover glass*, *beaker glass*, *refrigerator*, mikroskop, *auto clave*, *magnetic stirrer*, shaker, tabung *falcon*, *plate*, *dialysis tube*, timbangan

analitik, gunting, gelas ukur, pipet tetes, mikropipet, tabung eppendorf, spuit 3 cc, spuit 5 cc, spuit 10 cc, botol Schott, dan tabung reaksi.

3.7.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat bakteri *K. pneumoniae*, darah mencit, 2-metacarpo etanol 5%, pewarnaan Gram, gliserol 10%, media *MacConkey*, media *Brain Heart Infusion (BHI) Broth*, media *Tryptone Casitone Glucose (TCG)*, media *lactose broth*, media *nutrient broth*, media *nutrient slant*, *Tri Chloroacetic Acid (TCA)*, media *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)*, *bromophenol blue*, *Commassie Brilliant Blue R-250*, EDTA, membran nitroselulosa, *dithiothriol*, *Methyl Red Voges Proskauer (MR-VP)*, etanol absolut dingin, media *Simmons citrat*, *Phosphate Buffered Saline (PBS)*, *Sodium Dodecyl Sulfate 2,5%*, *n-octyl- β -glucopyranoside (NOG)*, aquades, Tris HCl 5 mM pH 6,8, reagen Kovac, dan gentamicin.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Penelitian ini melibatkan manusia sebagai objek penelitian, sehingga membutuhkan perizinan etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.8.2 Identifikasi dan Kultur Bakteri *K. pneumoniae*

Isolat bakteri *K. pneumoniae* yang didapatkan dari media *MacConkey* diperiksa secara fisik dan dilakukan pemeriksaan pewarnaan Gram di bawah mikroskopis dengan perbesaran 1000x. Kemudian inkubasi di dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37 °C dalam suasana aerob. Pemeriksaan spesifik untuk bakteri *K. pneumoniae* dilakukan dengan beberapa uji biokimia, antara lain uji TSIA, uji motilitas, dan uji *Indole*, *Methyl Red*, *Voges-Proskauer*, *Citrate (IMViC)*. Uji TSIA akan bernilai positif pada bakteri *K. pneumoniae*, *E. coli*, dan *Serratia* bila hasil tes menunjukkan adanya perubahan warna kuning pada dasar dan lereng agar disertai dengan terbentuknya gas. Uji *indole* akan bernilai negatif

(tidak terbentuk cincin merah pada larutan setelah ditetesi reagen Kovac) pada bakteri *K. pneumoniae*. Pada uji *Methyl Red* akan bernilai negatif (larutan berubah warna menjadi oranye atau kuning setelah ditetesi MR) untuk bakteri *K. pneumoniae*. Uji Voges-Proskauer akan bernilai positif untuk bakteri *K. pneumoniae* jika larutan berwarna merah setelah ditetesi reagen VP. Uji sitrat berfungsi untuk mengetahui kemampuan suatu mikroorganisme untuk menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon untuk metabolisme dengan menghasilkan suasana basa. Uji sitrat akan bernilai positif untuk spesies *K. pneumoniae*.

Bakteri *K. pneumoniae* yang sudah didapatkan ditanam pada media Nutrient Slant dan diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37 °C. Ketika koloni sudah tumbuh, beri larutan PBS steril sebanyak 10 mL dengan pH 7,4 lalu dipanen dengan cara dikerok. Suspensi hasil kerokan tersebut dimasukkan ke dalam botol Schott berisi 1000 mL larutan BHI Broth, lalu kocok selama 30 menit dengan *waterbath* pada suhu 37 °C. Ambil suspensi bakteri sebanyak 10 ml lalu masukkan ke dalam botol berisi media agar TCG dan inkubasi dengan suhu 37 °C selama 24-48 jam (Ehara dkk., 1987; Sikarwar dan Batra, 2011; Tarina dan Kusuma, 2017).

3.8.3 Isolasi OMP Bakteri *K. pneumoniae*

Bakteri *K. pneumoniae* dipanen dari botol biakan lalu masukkan ke botol lain dan tambahkan TCA sebanyak 3% dari total volume bakteri yang dipanen. Aduk campuran bakteri dengan TCA tiap 15 menit selama 60 menit, selanjutnya campuran yang telah dihomogenasikan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 menit dalam suhu 4 °C. Pelet hasil dari sentrifugasi diambil lalu diresuspensi dengan PBS pH 7,4 dengan perbandingan antara pelet dan PBS 1:10. Selanjutnya disentrifus lagi dengan kecepatan 6000 rpm pada suhu 4 °C selama 30 menit hingga jernih. Setelah itu pelet diambil dan ditambah dengan cairan PBS pH 7,4, kemudian pili bakteri dicukur dengan *pili cutter* dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4 °C selama 30 detik. Prosedur ini diulang kurang lebih sebanyak 5 kali atau hingga supernatan jernih dengan waktu istirahat 1 menit pada tiap

perlakuan. Bahan yang digunakan untuk isolasi OMP adalah pelet yang didapatkan dari pemotongan pili yang terakhir. Pelet diambil lalu ditambahkan dengan 2 ml PBS pH 7,4, kemudian ditambahkan 2 ml NOG dengan konsentrasi 0,05%. Campuran di homogenasikan dengan menggunakan vortex selama 1 menit, lalu suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C. Supernatan hasil sentrifugasi diambil lalu didialisis menggunakan membran nitroselulosa selama 24 jam pertama dengan menggunakan aquades sebanyak 2 L, kemudian pada 24 jam selanjutnya didialisis dengan cairan PBS pH 7,4 dengan volume 2 L (Ehara dkk., 1987; Sumarno, 2000).

3.8.4 Identifikasi Berat Molekul OMP Bakteri dengan Elektroforesis (SDS-PAGE)

Hasil isolasi OMP bakteri *K. pneumoniae* yang sudah didapatkan, diidentifikasi menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis* (SDS-PAGE). Sampel protein yang sudah didapat kemudian dipanaskan selama 5 menit dengan suhu 100°C dalam larutan penyangga yang mengandung 2-mercapto etanol 5%, *sodium dodecyl sulfate* 2,5% w/v, Tris HCl 5mM pH 6,8, dan gliserol 10% v/v dengan warna pelacak *bromophenol blue*. Konsentrasi *stacking gel* adalah 4% dan konsentrasi *separating gel* adalah *mini slab gel* 12,5%. Kemudian proses running dilakukan dalam waktu 90 menit, dengan voltase 120mV dan tegangan sebesar 400mA. Bahan pewarna yang digunakan adalah *Commassie Brilliant Blue R-250* dan untuk protein marker menggunakan *pre stained broad range* (Laemmli, 1970).

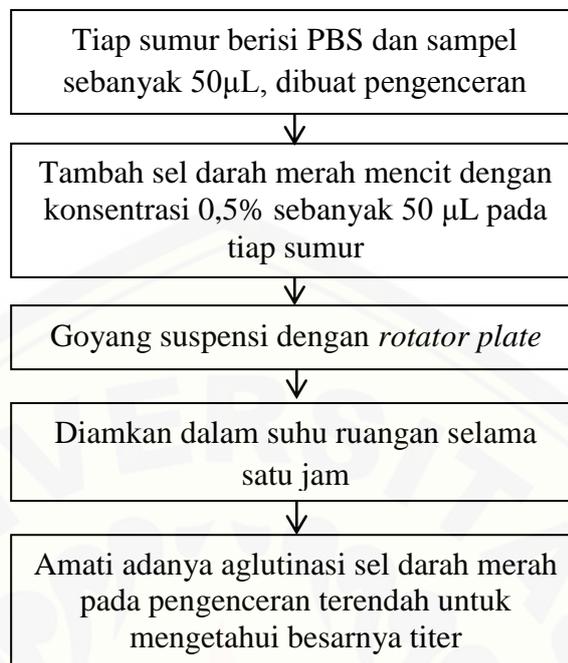
3.8.5 Pemurnian OMP Bakteri *K. pneumoniae*

Setelah dielektroforesis, gel akan menunjukkan *band-band* protein yang kemudian berat molekulnya akan dihitung. Gel pada tiap *band* protein dipotong secara melintang dan ditempatkan ke dalam *dialise tube* yang telah diisi larutan penyangga. Gel yang telah didapat kemudian dielektroelusi dalam *electroelusion chamber* yang mengandung larutan buffer selama 2 jam dengan arus sebesar 0,3 A dan tegangan sebesar 20 V. Setelah dielektroelusi, *dialise tube* dipindahkan ke

dalam *beaker glass* untuk dilakukan proses pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Pada proses pengadukan 24 jam pertama *beaker glass* diisi aquades steril, lalu 24 jam selanjutnya diisi dengan PBS steril. Protein yang diperoleh dari hasil pengadukan dimasukkan ke dalam *micro tube* lalu tambahkan etanol absolut dingin dan letakkan dalam *refrigerator* selama semalam. Setelah didinginkan dalam *refrigerator*, endapkan protein yang diperoleh menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 6000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit. Di dalam *refrigerator*, supernatan yang berisi etanol dibuang dengan cara tapping. *Crude* protein yang diperoleh kemudian disimpan dalam keadaan beku dalam larutan buffer Tris HCl 0,5 M pH 6,8 (Thomas dkk., 1989).

3.8.6 Uji Hemaglutinasi

Pengenceran sampel dilakukan dengan membuat pengenceran OMP 32 kDa bertingkat pada *microplate V*, dengan volume tiap sumur sebanyak 50µl. Kemudian ditambahkan darah mencit dengan konsentrasi 0,5% pada tiap sumur, lalu dihomogenasikan dengan *rotator plate* selama satu menit. Setelah itu letakkan pada suhu kamar selama satu jam. Untuk mengetahui besarnya titer dapat diketahui dengan mengamati adanya aglutinasi eritrosit pada konsentrasi pengenceran terendah (Li dkk., 1999).



Gambar 3.1 Skema prosedur uji hemaglutinasi

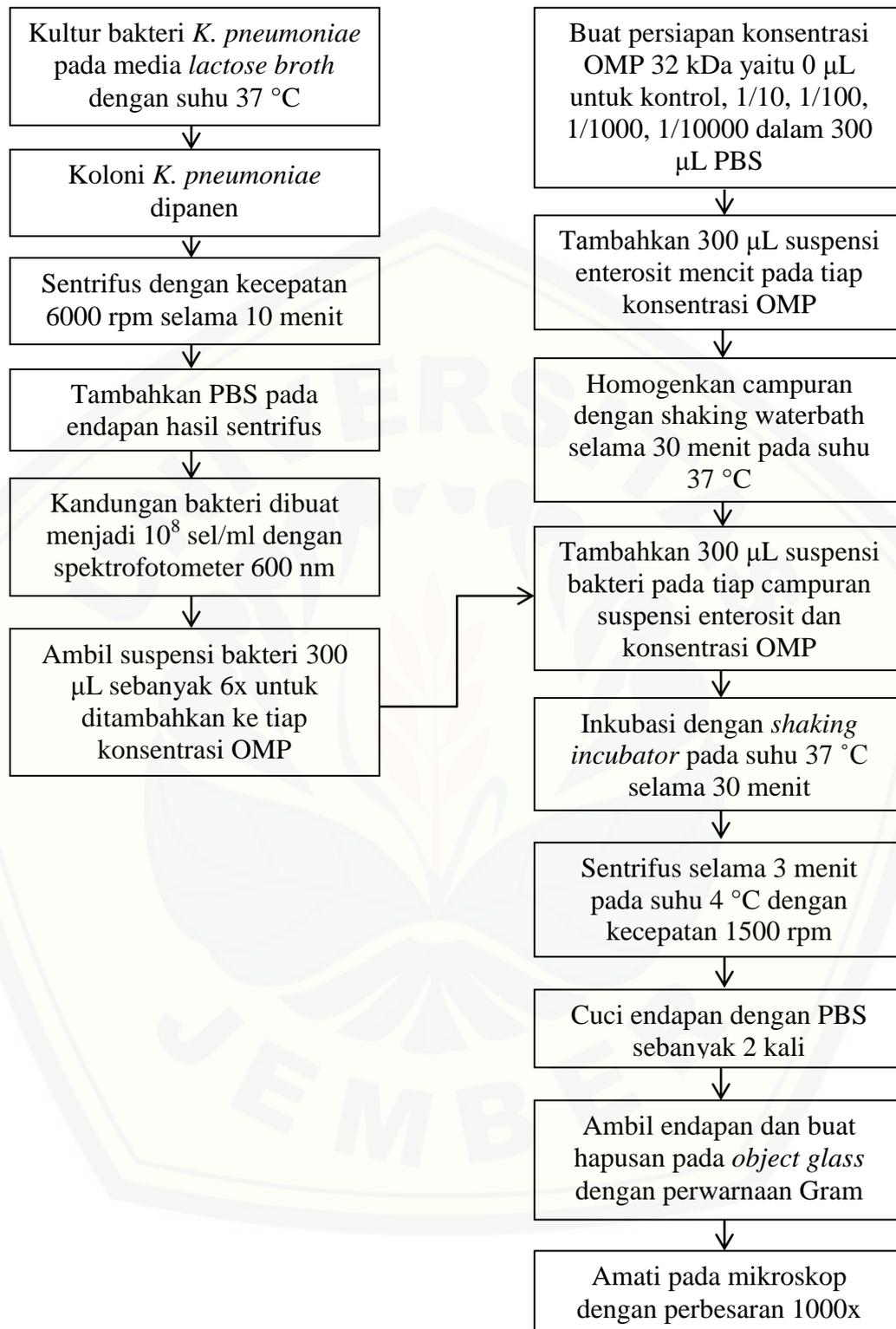
3.8.7 Isolasi Sel Enterosit Mencit

Metode isolasi sel enterosit mencit dilakukan berdasarkan metode Weisser. Mencit yang digunakan adalah mencit yang sehat dengan berat badan kurang lebih 25 gram. Mencit dianestesi menggunakan kloroform, kemudian bagian usus halusnya dipotong dan dibuka. Kemudian usus halus mencit dicuci dengan menggunakan larutan yang terdiri dari campuran PBS pH 7,4 dan 1 mM *dithiothreitol* pada suhu 4 °C hingga bersih. Kemudian enterosit dimasukkan ke dalam larutan yang terdiri dari campuran 1,5 mM KCl, 8 mM KH₂SO₄, 9,6 mM NaCl, 27 mM Na sitrat, dan 5,6 mM Na₂HPO₄ dengan pH 7,4. Jaringan diinkubasi dengan *shaking incubator* selama 15 menit pada suhu 37 °C. Supernatan dibuang lalu pindahkan enterosit ke dalam larutan yang mengandung 0,5 mM *dithiothreitol* dan 1,5 mM EDTA. Enterosit yang sudah dicampur dengan larutan kemudian dikocok pada suhu 37 °C selama 15 menit, kemudian supernatan dibuang. Enterosit dicuci menggunakan PBS dan sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 1000 rpm, dan proses sentrifus ini diulangi sebanyak tiga kali. Sel

enterosit diisolasi dengan cara melakukan suspensi menggunakan PBS steril dan dilanjutkan dengan analisis menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 560 nm hingga konsentrasi mencapai 10^6 /ml (Nagayama dkk., 1995).

3.8.8 Uji Adhesi

Pada uji adhesi ini, bakteri *K. pneumoniae* dikultur dalam media *lactose broth* dengan suhu 37 °C. Bakteri yang tumbuh dipanen menggunakan sentrifus dengan kecepatan 6000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit. Endapan yang terbentuk disuspensi dengan PBS dan jumlah bakteri dibuat menjadi 10^8 /ml menggunakan spektrofotometer 600 nm. Kemudian dibuat beberapa preparasi dengan konsentrasi pengenceran OMP masing-masing sebanyak 0 µL untuk kontrol, 1/10, 1/100, 1/1000, dan 1/10000 dalam 300 µL PBS. Kemudian ditambahkan suspensi enterosit sebanyak 300 µL pada setiap dosis, lalu campuran tersebut digoyang secara perlahan pada *shaking waterbath* pada suhu 37 °C selama 30 menit. Setelah itu tambahkan suspensi bakteri *K. pneumoniae* sebanyak 300 µL ke masing-masing campuran antara pengenceran OMP dan suspensi enterosit, lalu inkubasi dengan *shaking incubator* pada suhu 37 °C selama 30 menit. Setelah itu suspensi di sentrifugasi 1500 rpm pada suhu 4 °C selama 30 menit. Endapan dicuci yang terbentuk dengan PBS sebanyak dua kali. Selanjutnya endapan tersebut diambil dan dibuat hapusan pada object glass dan dilakukan pewarnaan Gram. Hapusan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x dan bakteri yang menempel pada sel epitel dihitung jumlahnya. Indeks adhesi merupakan jumlah rata-rata bakteri yang menempel pada enterosit, dan dihitung pada setiap pengamatan terhadap 100 epitel (Nagayama dkk., 1995).

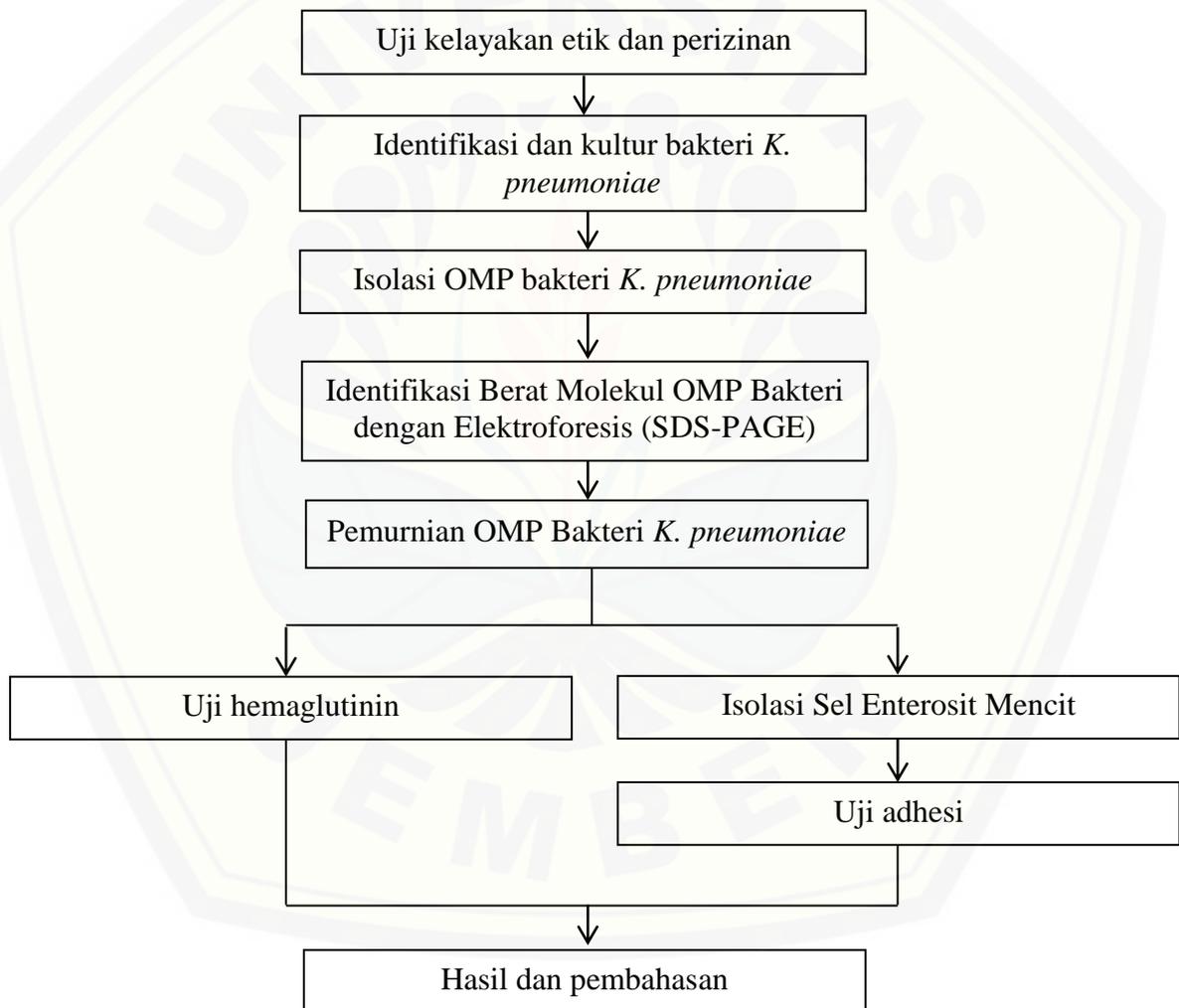


Gambar 3.2 Skema prosedur uji adhesi

3.9 Analisis Data

Untuk menemukan dan membuktikan adanya protein hemagglutinin pada OMP 32 kDa bakteri *K. pneumoniae* sebagai protein hemagglutinin dan adhesin, maka dilakukan analisis deskriptif dan uji korelasi-regresi untuk mengetahui hubungan antara indeks adhesi dengan konsentrasi OMP 32 kDa, dengan batas signifikansi 0,05 ($p < 0,05$).

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Alur Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Outer Membrane Protein (OMP) 32 kDa *K. pneumoniae* dapat berperan sebagai protein hemagglutinin dengan konsentrasi tertinggi.

5.2 Saran

- 5.2.1 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai peran OMP dengan berbagai macam berat molekul.
- 5.2.2 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap protein pili *K. pneumoniae* untuk mengetahui peran pili dari berbagai macam berat molekul sebagai protein hemagglutinin dan adhesin.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, D., S. Retoprawiro, dan A. S. Noorhamdani. 2015. Inhibition of bacterial adhesion on mice enterocyte by the hemagglutinin pili protein 12, 8 kDa *Klebsiella pneumoniae* antibody. *Journal of Tropical Life Science*. 4(1): 19-25.
- Allen, B. L., G. F. Gerlach, dan S. Clegg. 1991. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of bacteriology*. 173(2): 916-920.
- Anderson, K. F., D. R. Lonsway, J. K. Rasheed, J. Biddle, B. Jensen, L. K. McDougal, R. B. Carey, A. Thompson, S. Stocker, B. Limbago, dan J. B. Patel. 2007. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology*. 45(8): 2723-2725.
- 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(3): 1-13.
- Brooks, G. F. dan K. C. Carroll. 2014. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 25. Jakarta: EGC.
- Clegg, S., dan C. N. Murphy. 2016. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*. 4(1): 1-17.
- Ehara, M., M. Ishibasi, Y. Ichinose, M. Iwanaga, S. Shimotori, dan T. Naito. 1987. Purification and partial characterization of fimbriae of *Vibrio cholerae* O1. *Vaccine*. 5: 283-288.
- Firon, N., I. Ofek, dan N. Sharon. 1984. Carbohydrate-binding sites of the mannose-specific fimbrial lectins of enterobacteria. *Infection and Immunity*. 43(3): 1088-1090.
- Fitrianingsih, A. A. 2017. Haemagglutination of *Shigella flexneri* subunit pili protein 18 kda as a molecule adhesion in mice enterocytes. *Journal of Islamic Pharmacy*. 2(1): 22-29.
- Gerlach, G., S. Clegg, dan B. L. Allen. 1989. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*. 171(3): 1262-1270.

- Gerlach, R. G., dan M. Hensel. 2007. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 297: 401-415.
- Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek dan Prosedur dasar Laboratorium*. Jakarta: Gramedia.
- Hemraj, V., S. Diksha, dan G. Avneet. 2013. A review on commonly used biochemical test for bacteria. *Innovare J Life Sci*. 1(1): 1-7.
- Hidayati, D. Y. N. 2010. Identifikasi molekul adhesi pili *Pseudomonas aeruginosa* pada *human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) culture*. *J.Exp. Life Sci*. 1(1): 7-14.
- Jagnow, J., dan S. Clegg. 2003. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix-and collagen-coated surfaces. *Microbiology*. 149(9): 2397-2405.
- Jones, C. H., J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, A. V. Nicholes, S. N. Abraham, dan S. J. Hultgren. 1995. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92(6): 2081-2085.
- Kabha, K., L. Nissimov, A. Athamna, Y. Keisari, H. Parolis, L. A. S. Parolis, R. M. Grue, J. Schlepper-Schafer, A. R. B. Ezekowitz, D. E. Ohman, dan I. Ofek. 1995. Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 63(3): 847-852.
- Klemm, P., dan M. A. Schembri. 2000. Fimbrial surface display systems in bacteria: from vaccines to random libraries. *Microbiology*. 146(12): 3025-3032.
- Kline, K. A., S. Fälker, S. Dahlberg, S. Normark, dan B. Henriques-Normark. 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell host & microbe*. 5(6): 580-592.
- Kramer, A., I. Schwebke, dan G. Kampf. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? a systematic review. *BMC Infectious Diseases*. 6(130): 1-8.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

- Langstraat, J., M. Bohse, dan S. Clegg. 2001. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. *Infection and immunity*. 69(9): 5805-5812.
- Lehman, D. 2005. Triple sugar iron agar protocols. *American Society for Microbiology*. 1-7.
- Li, B., Y. Zhao., C. Liu., Z. Chen., dan D. Zhou. 2014. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.* 9(9): 1071-1081.
- 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.
- Lindahl, M., A. Faris, T. Wadström, dan S. Hjerten. 1981. A new test based on 'salting out' to measure relative hydrophobicity of bacterial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 677(3-4): 471-476.
- Llobet, E., C. March, P. Giménez, dan J. A. Bengoechea. 2009. *Klebsiella pneumoniae* OmpA confers resistance to antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 53(1): 298-302.
- Martin, R. M., dan M. A. Bachman. 2018. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 8(4): 1-15.
- Martino, P. D., V. Livrelli, D. Sirot, B. Joly, dan A. Darfeuille-Michaud. 1996. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infection and immunity*. 64(6): 2266-2273.
- Meatherall, B. L., D. Gregson, T. Ross, J. D. D. Pitout, dan K. B. Laupland. 2009. Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *The American Journal of Medicine*. 122(9): 866-873.
- Microbiology In Pictures. 2013. *Klebsiella pneumoniae* Bacteria. <https://www.microbiologyinpictures.com/klebsiella%20pneumoniae.html>. [Diakses pada Oktober 2018].
- Mubarokah, S. N., Sumarno, dan I. K. G. Muliarta. 2009. *Outer membrane protein* 49,4 kDa dari *Porphyromonas gingivalis* merupakan protein hemagglutinin dan adhesin terhadap netrofil. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 25(2): 49-59.

- Mufida, D. C., E. Suswati, S. S. Wahyudi, dan A. Kurniawan. 2010. 45 kDa fimbria protein of *Proteus mirabilis* as hemagglutinin and adhesion protein. *Folia Medica Indonesiana*. 46(2): 88-94.
- 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.
- Nakazawa, T., M. Ishibashi, H. Konishi, T. Takemoto, M. Shigeeda, dan T. Kochiyam. 1989. Hemagglutinin activity of *Campylobacter pylori*. *Infection and Immunity*. 57: 989-991.
- Navon-Venezia, S., K. Kondratyeva, dan A. Carattoli. 2017. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 41(3): 252-275.
- Noorhamdani. 2005. Protein fimbria 16 kDa bakteri *Acinetobacter baumannii* dari urin penderita infeksi saluran kemih berperan sebagai protein hemagglutinin dan adhesin. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 21(2): 44-53.
- Ong, C. Y., S. A. Beatson, M. Totsika, C. Forestier, A. G. McEwan, dan M. A. Schembri. 2010. Molecular analysis of type 3 fimbrial genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Citrobacter* species. *BMC Microbiology*. 10(183): 1-12.
- Paczosa, M. K. dan J. Meccas. 2016. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 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. *Pharmacon*. 7(2): 28-40.
- Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. 2014.
- Pertiwi, W., T. R. Sartono, Sumarno, dan S. Adi. 2009. Sensitivitas dan spesifisitas metode dot blot menggunakan antigen outer membrane protein *Klebsiella pneumoniae* yang direspon secretory-immunoglobulin A sputum penderita terinfeksi *Klebsiella pneumoniae*. *Jurnal Respirologi Indonesia*. 29(3): 1-15.
- Podschun, R. dan U. Ullmann. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(4): 589-603.

- Prabowo, A.S. 2011. Partial Characterization of Adhesions Pili on *Shigella dysenteriae*. Tesis. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Santoso, S. 2002. Adhesion test of hemagglutinin-O36 protein of *Salmonella typhi* Malang isolate at BALB/C mice enterocyte. *Maj. Kedok. Unibraw*. 18(2): 51-59.
- Schroll, C., K. B. Barken, K. A. Krogfelt, dan C. Struve. 2010. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiology*. 10(179): 1-10.
- 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.
- Soto, G. E., dan S. J. Hultgren. 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *Journal of Bacteriology*. 181(4): 1059-1071.
- Stahlhut, S. G., V. Tchesnokova, C. Struve, S. J. Weissman, S. Chattopadhyay, O. Yakovenko, P. Aprikian, E. V. Sokurenko, dan K. A. Krogfelt. 2009. Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 191(21): 6592-6601.
- Struve, C., M. Bojer, dan K. A. Krogfelt. 2008. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infection and Immunity*. 76(9): 4055-4065.
- 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.
- Suswati, E., dan D. C. Mufida. 2010. Protein haemagglutinin outer membran protein (OMP) 35 kDa sebagai protein adhesin *Proteus mirabilis* pada vesika urinaria kelinci. *Jurnal Natur Indonesia*. 12(2): 136-142.
- Tarina, N. T. I., dan S. A. F. Kusuma. 2017. Deteksi bakteri *Klebsiella pneumoniae*. *Farmaka*. 15(2): 119-126.

- Tarkkanen, A. M., B. Westerlund-Wikström, L. Erkkilä, dan T. K. Korhonen. 1998. Immunohistological localization of the MrkD adhesin in the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity*. 66(5): 2356-2361.
- Thomas, D. H., A. Rob, dan D. W. Rice. 1989. Protocol: a novel dialysis procedure for the crystallization of proteins. *Protein Engineering*. 2(6): 489-491.
- Todar, K. 2011. *Shigella* and *Shigellosis*. <http://www.textbookofbacteriology.net/Shigella.html>
- Vading, M., P. Naucler, M. Kalin, dan C. G. Giske. 2018. Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality. *Plos One*. 13(4): 1-13.
- Wilson, B. A., A. A. Salyers, D. D. Whitt, dan M. E. Winkler. 2011. *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*. Edisi 3. American Society for Microbiology (ASM).
- Winarsih S., Sumarno, dan Roekistiningsih. 1997. Kajian Fungsi dan Sifat Immunogenitas Protein Hemagglutinin 32 kDa dan 20 kDa pada *Helicobacter pylori*. *Majalah Kedokteran Universitas Brawijaya*. 13(2): 135-141.
- Wright, M. S., Y. Suzuki, M. B. Jones, S. H. Marshall, S. D. Rudin, D. van Duin, K. Kaye, M. R. Jacobs, R. A. Bonomo, M. D. Adams. 2014. Running title: global transcription profile of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*
- Wu, C. C., Y. J. Huang, C. P. Fung, dan H. L. Peng. 2010. Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* Kpc fimbriae by the site-specific recombinase KpcI. *Microbiology*. 156(7): 1983-1992.

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Lembar Persetujuan Etik

 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


Lampiran 3.2 Surat Rekomendasi Bebas Plagiasi

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN 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 : 64 /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) 32 kDa *Klebsiella pneumoniae* SEBAGAI PROTEIN HEMAGLUTININ DAN ADHESIN

Nama Penulis : Bima Setia Sandya Nugraha
NIM. : 152010101121
Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

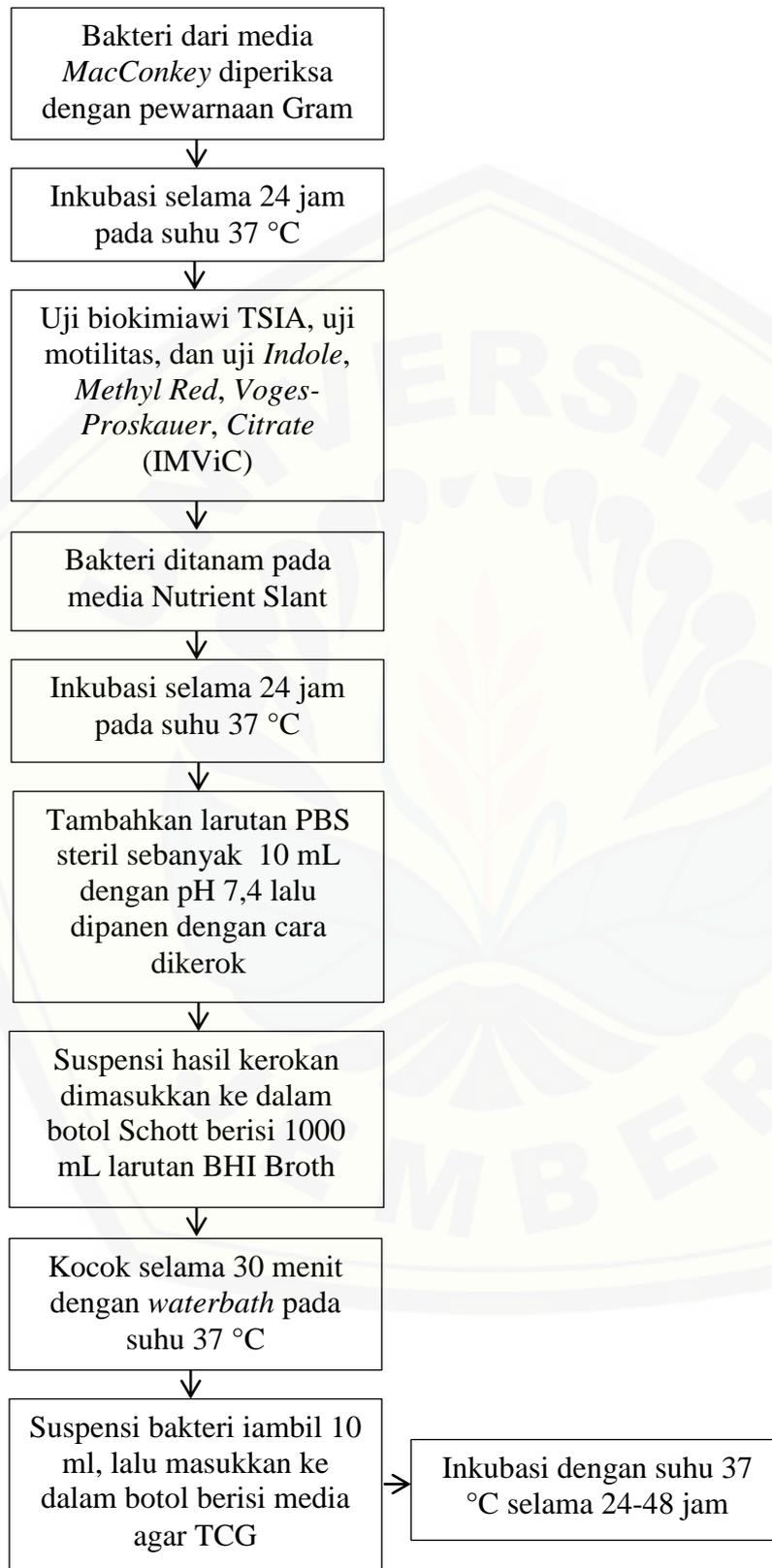
Telah menyetujui dan dinyatakan "BEBAS PLAGIASI"

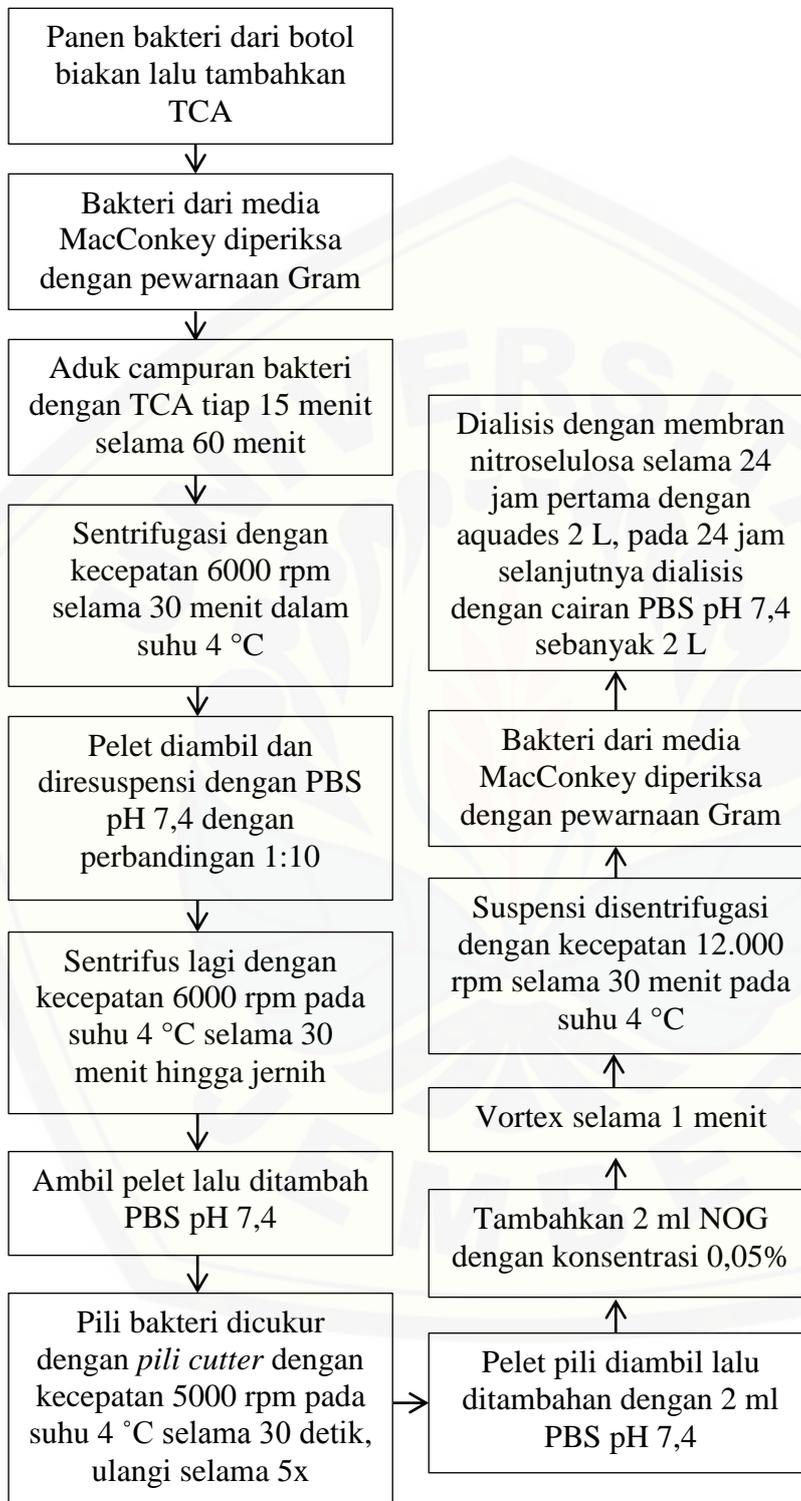
Surat Rekomendasi ini dapat digunakan sebagaimana mestinya.

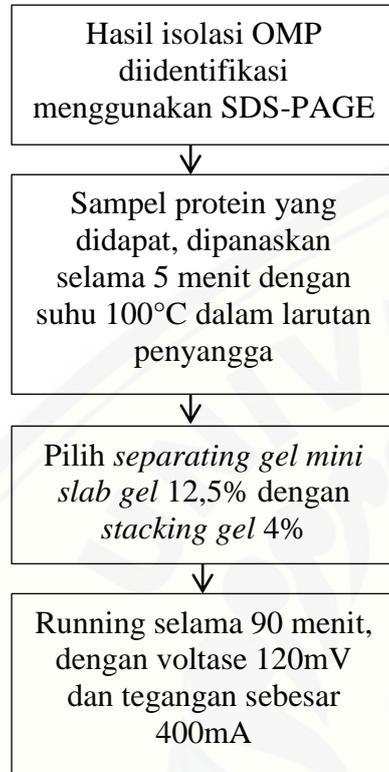
Jember, 25 Januari 2019

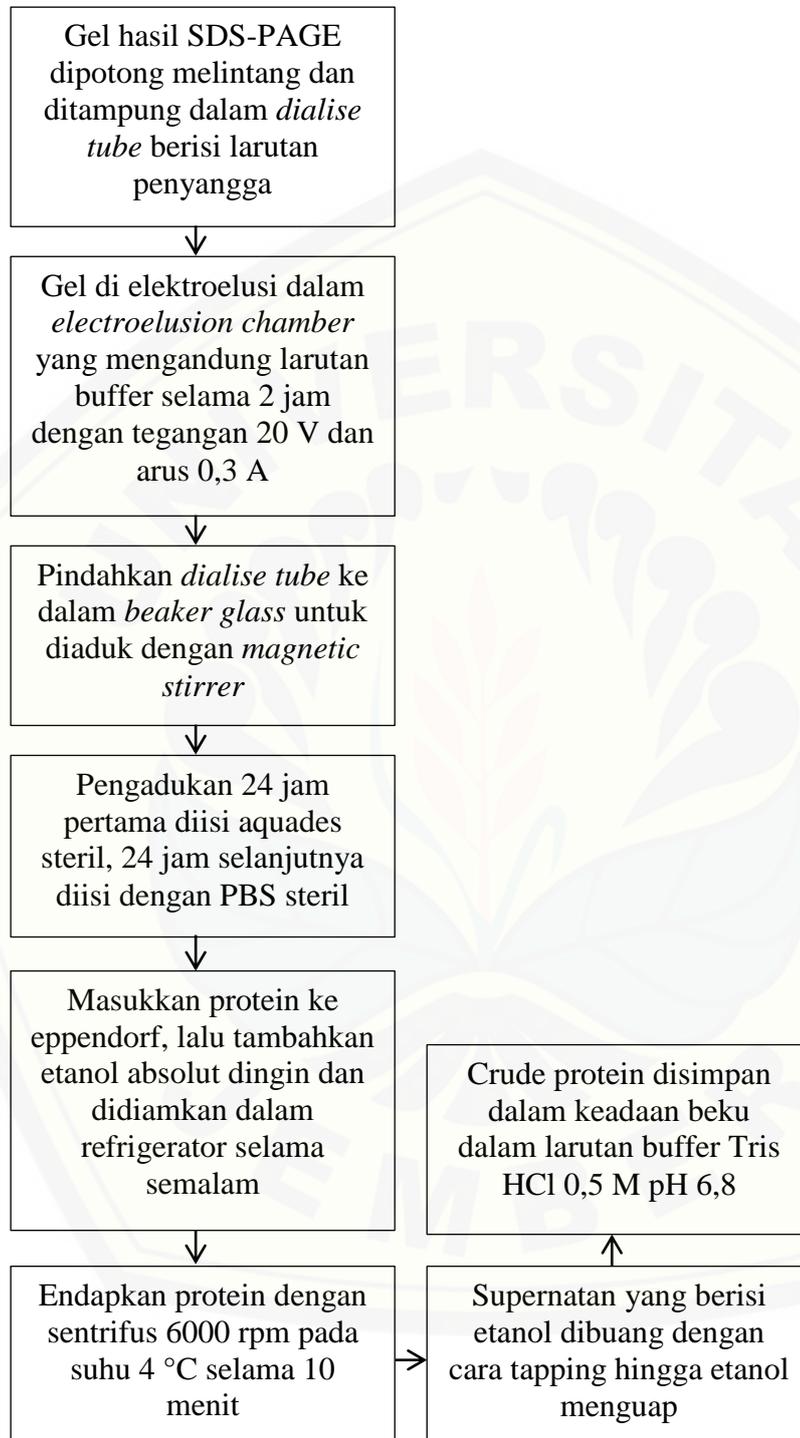
Ketua Komisi Bimbingan Skripsi & Ilmiah

Yunita Armiyanti, M.Kes
NIP. 19740604 200112 2 002

Lampiran 3.3 Prosedur Identifikasi dan Kultur Bakteri *K. pneumoniae*

Lampiran 3.4 Prosedur Isolasi OMP Bakteri *K. pneumoniae*

Lampiran 3.5 Prosedur Identifikasi Berat Molekul OMP Bakteri dengan Elektroforesis (SDS-PAGE)

Lampiran 3.6 Prosedur Pemurnian OMP Bakteri *K. pneumoniae*

Lampiran 3.7 Prosedur Uji Hemaglutinasi

Tiap sumur berisi PBS dan sampel sebanyak 50 μ L, dibuat pengenceran



Tambah sel darah merah mencit dengan konsentrasi 0,5% sebanyak 50 μ L pada tiap sumur



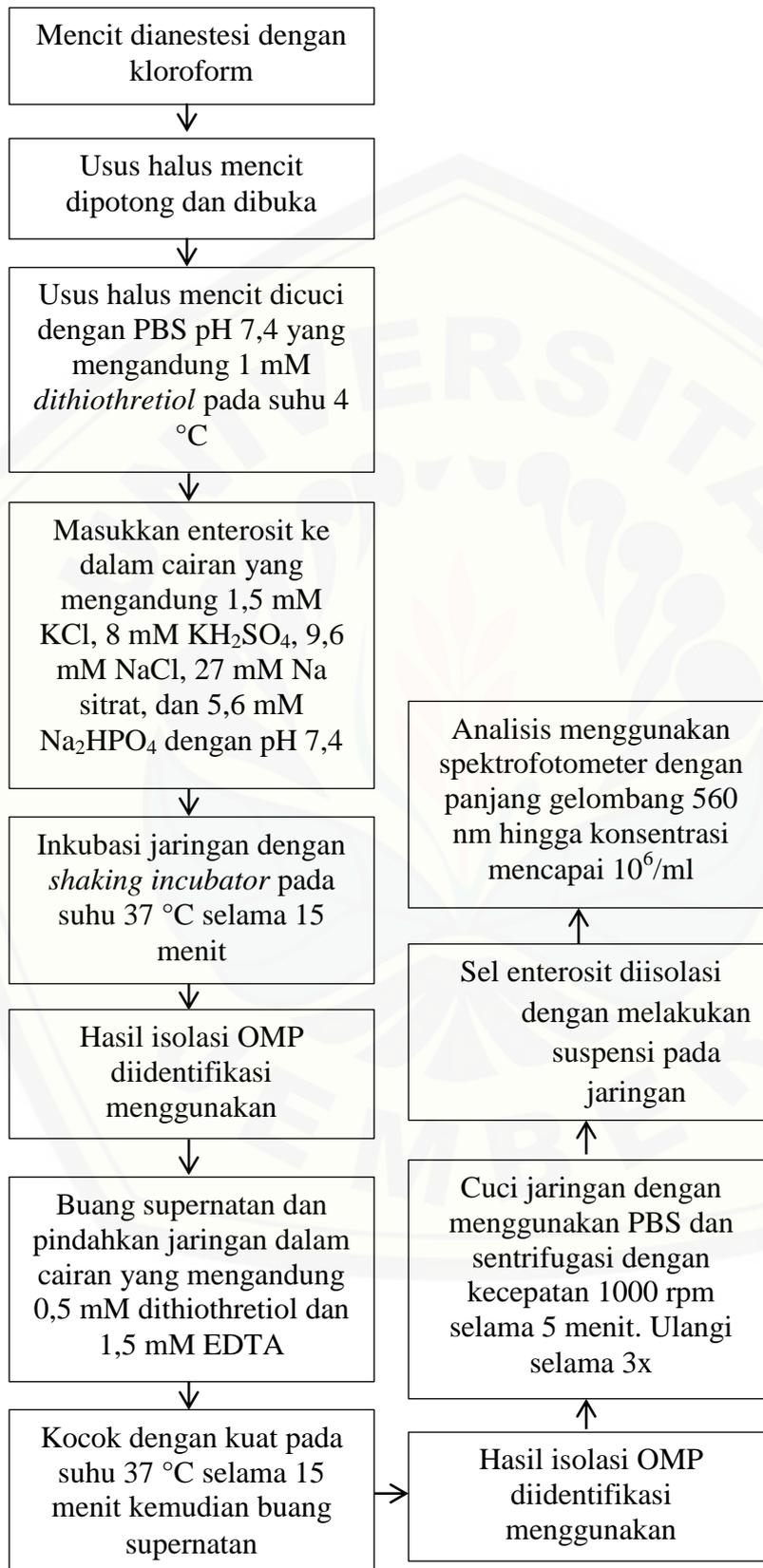
Goyang suspensi dengan *rotator plate*



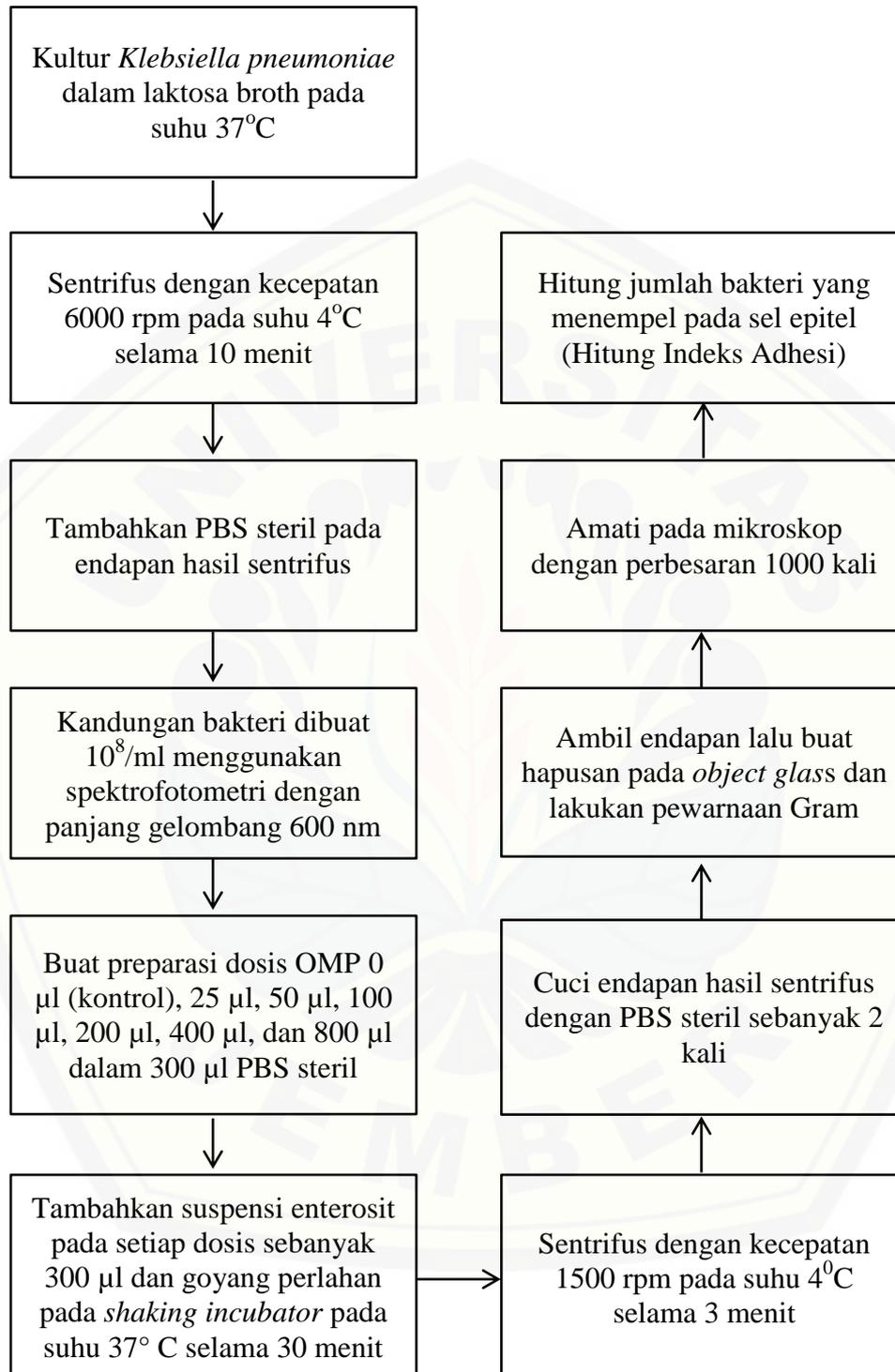
Diamkan dalam suhu ruangan selama satu jam



Amati adanya aglutinasi sel darah merah pada pengenceran terendah untuk mengetahui besarnya titer

Lampiran 3.8 Prosedur Isolasi Sel Enterosit Mencit

Lampiran 3.9 Prosedur Uji Adhesi



Lampiran 3.10 Penggunaan Alat Pelindung Diri (APD), Penggunaan Biosafety Cabinet, dan Tata Cara Pembuangan Limbah Mikrobiologi

1. PENGGUNAAN ALAT PELINDUNG DIRI (APD)

Alat pelindung diri yang digunakan dalam penelitian ini ialah:

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

2. PENGGUNAAN BIOSAFETY CABINET

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

- a. Laminar.

Sebelum pemakaian laminar, sinar UV yang berada didalam laminar dihidupkan terlebih dahulu selama 30 menit. Setelah itu seluruh prosedur penelitian dilakukan didalam laminar untuk mencegah penyebaran bakteri di ruang laboratorium.

- b. Bunsen.

Bunsen digunakan di dalam laminar untuk lebih memastikan terhindarnya penyebaran bakteri selama penelitian. Bunsen berfungsi untuk memanaskan alat-alat untuk mematikan bakteri yang menempel pada alat.

3. TATA CARA PEMBUANGAN LIMBAH MIKROBIOLOGI

Pembuangan limbah mikrobiologi termasuk juga pembuangan media agar padat dan media cair yang sebelumnya telah digunakan untuk menanam bakteri. Prosedur pembuangan limbah mikrobiologi ialah sebagai berikut.

- a. Media yang telah ditanam bakteri dan tidak terpakai di *autoclave* selama 1 jam
- b. Media yang telah di *autoclave* kemudian dimasukkan dalam kaleng alumunium untuk mencegah bocor

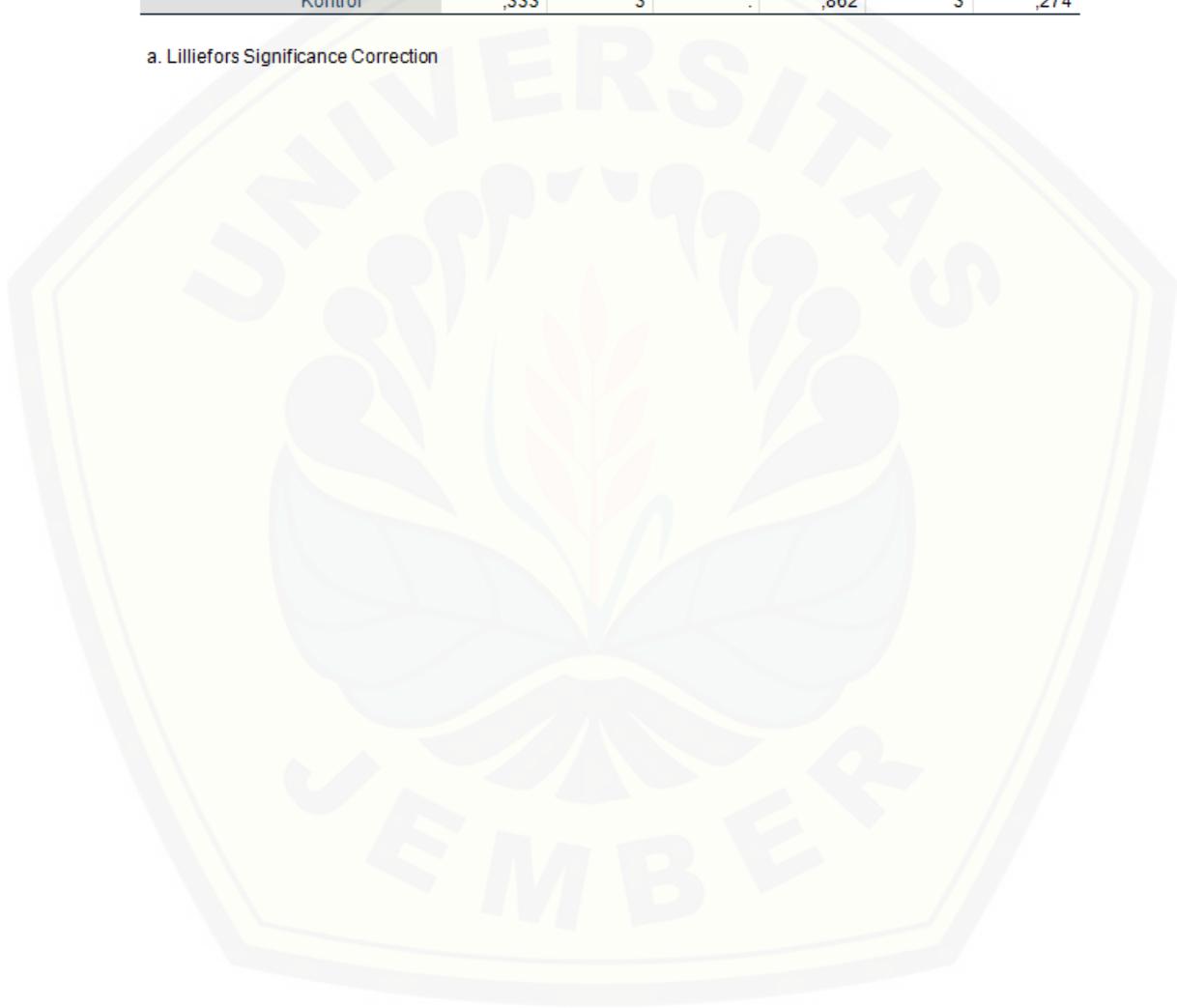
- c. Kaleng tersebut dimasukkan kedalam tanah yang telah digali sampai dapat menutupi kaleng
- d. Bagian dalam kaleng kemudian dibakar sampai mengering
- e. Setelah dibakar kaleng tersebut ditutup dengan tanah. Peneliti melakukan penguburan di tanah kosong bagian belakang Laboratorium Mikrobiologi FK UNEJ untuk menghindari pemukiman masyarakat
- f. Selanjutnya barang-barang laboratorium yang telah digunakan untuk pembuatan media diguyur dengan klorine dan dicuci dengan sabun lalu di sterilisasi kering pada suhu 170°C selama 1 jam.

Pembuangan limbah alat pelindung diri seperti masker N95 sekali pakai, *disposable face mask*, dan *handscoon nitril cobalt blue* mengikuti prosedur Laboratorium Mikrobiologi FK UNEJ. Peneliti membuang limbah alat pelindung diri sekali pakai tersebut dengan terlebih dahulu menampungnya pada tas kresek lalu selanjutnya dimasukkan ke dalam tempat sampah yang ada di Laboratorium Mikrobiologi FK UNEJ. Kemudian setiap hari petugas bagian umum dan perlengkapan FK UNEJ akan mengambil sampah tersebut untuk selanjutnya di proses dengan menggunakan insinerator.

Lampiran 4.1 Tabel Hasil Uji Normalitas

Tests of Normality							
	Pengenceran	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Indeks Adhesi	1/10	,314	3	.	,893	3	,363
	1/100	,253	3	.	,964	3	,637
	1/1000	,359	3	.	,811	3	,141
	1/10000	,253	3	.	,964	3	,637
	Kontrol	,333	3	.	,862	3	,274

a. Lilliefors Significance Correction



Lampiran 4.2 Tabel Hasil Uji Korelasi

		Pengenceran	Indeks Adhesi
Pengenceran	Pearson Correlation	1	,812**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	15	15
Indeks Adhesi	Pearson Correlation	,812**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	15	15

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

Lampiran 4.3 Tabel Hasil Uji Regresi

Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	
	B	Std. Error	Beta			
1	(Constant)	356,567	147,937		2,410	,031
	Pengenceran	223,433	44,605	,812	5,009	,000

a. Dependent Variable: Indeks Adhesi

