



**PERAN PROTEIN PILI 38,6 kDa *Klebsiella pneumoniae*  
SEBAGAI PROTEIN HEMAGLUTININ DAN ADHESIN  
YANG BERFUNGSI SEBAGAI FAKTOR VIRULENSI**

**SKRIPSI**

Oleh

**Regina Finka Dita  
NIM 152010101094**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2019**



**PERAN PROTEIN PILI 38,6 kDa *Klebsiella pneumoniae*  
SEBAGAI PROTEIN HEMAGLUTININ DAN ADHESIN  
YANG BERFUNGSI SEBAGAI FAKTOR VIRULENSI**

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Regina Finka Dita  
NIM 152010101094**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2019**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, dengan segala rahmat dan karunia-Nya yang tak pernah henti membuat saya bersyukur akan nikmat iman dan Islam yang telah menjadi penerang dan pedoman dalam proses belajar selama ini beserta Nabi Muhammad SAW dan Khadijah binti Khuwailid yang selalu menjadi tauladan bagi saya;
2. Orang tua tersayang, Ayahanda Boyani (alm) dan Ibunda Endri Susmini, yang telah memberikan do'a, bimbingan, kasih sayang, dan pengorbanan yang tak terhingga;
3. Kakak saya Yoga Dwiprasetyo yang telah menjadi saudara dan teman dari saya kecil hingga sekarang;
4. Saudari saya Zulfa Alfania dan Fenny Afifatul Awwaliyah yang telah menjadi sahabat yang menginspirasi dalam perjalanan hidup saya;
5. Guru-guru saya dari masa kecil hingga sekarang, karena ilmu yang diajarkan membuat saya menjadi pribadi yang bertaqwa dan berakhlak;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas kesempatan belajar dan menjadi bagian keluarga besar didalamnya.

**MOTO**

Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya  
(terjemahan Surat Al Baqarah ayat 286)\*)



---

\*)Departemen Agama Republik Indonesia. 2006. *Al Qur'an dan Terjemahannya*.

Jakarta: Maghfirah Pustaka

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Regina Finka Dita

NIM : 152010101094

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Peran Protein Pili 38,6 kDa *Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin yang Berfungsi sebagai Faktor Virulensi” 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 manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 18 Januari 2019

Yang menyatakan,

Regina Finka Dita

NIM 152010101094

**SKRIPSI**

**PERAN PROTEIN PILI 38,6 kDa *Klebsiella pneumoniae* SEBAGAI  
PROTEIN HEMAGLUTININ DAN ADHESIN YANG  
BERFUNGSI SEBAGAI FAKTOR VIRULENSI**

Oleh

**Regina Finka Dita  
152010101094**

Pembimbing

Dosen Pembimbing I

: dr. Dini Agustina, M.Biomed

Dosen Pembimbing II

: dr. Dwita Aryadina Rachmawati, M.Kes.

**PENGESAHAN**

Skripsi yang berjudul “Peran Protein Pili 38,6 kDa *Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin yang Berfungsi sebagai Faktor Virulensi” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Rabu, 23 Januari 2019

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

dr. Enny Suswati, M.Kes  
NIP 197002141999032001

Anggota II,

dr. Dini Agustina, M.Biomed  
NIP 198308012008122003

Anggota I,

dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed  
NIP 198304052008121001

Anggota III,

dr. Dwita Aryadina Rachmawati, M.Kes  
NIP 198010272008122002

Mengesahkan  
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

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

## RINGKASAN

**Peran Protein Pili 38,6 kDa *Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin yang Berfungsi sebagai Faktor Virulensi;** Regina Finka Dita, 152010101094; 2019; 52 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

*Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang pendek yang menjadi penyebab infeksi pada berbagai bagian tubuh termasuk sistem pencernaan, sistem pernapasan dan sistem perkemihan. Faktor yang menyebabkan *K. pneumoniae* mampu menginfeksi tubuh perlu diketahui untuk selanjutnya digunakan sebagai dasar untuk menentukan diagnosis dan alternatif pencegahan infeksi. Pili menjadi faktor yang sangat berpengaruh terhadap kemampuan *K. pneumoniae* untuk masuk kedalam tubuh manusia. Hal ini disebabkan oleh adanya protein pada pili yang akan berikatan dengan reseptor permukaan sel (protein adhesin) dan molekul gula membran sel (protein hemagglutinin). Hasil elektroforesis (SDS-PAGE) menunjukkan bahwa protein dengan berat molekul 38,6 kDa merupakan protein yang paling tinggi konsentrasinya akan tetapi peran protein ini sebagai protein hemagglutinin dan adhesin belum ada yang melaporkan. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui peran protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* sebagai protein hemagglutinin dan adhesin yang berfungsi sebagai faktor virulensi.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia Fakultas Kedokteran serta Laboratorium Bioteknologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan (MIPA) Universitas Jember pada bulan November-Januari 2018. Sampel penelitian berupa bakteri *K. pneumoniae* yang terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember serta sel eritrosit dan sel enterosit mencit strain BALB/C. Peneliti menggunakan data primer yang diperoleh dari identifikasi protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae*, kemampuan hemagglutinasinya, dan perbandingan indeks adhesi dengan konsentrasi protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae*.

Sampel *K. pneumoniae* yang telah diidentifikasi kemudian dilakukan pemotongan pili. Hasil potongan pili kemudian dielektroforesis (SDS-PAGE) dan diidentifikasi berat molekul proteinnya. Protein yang diperoleh kemudian diuji hemaglutinasi dan adhesi untuk mengetahui perannya sebagai protein hemaglutinin dan adhesin. Data yang telah didapatkan kemudian dianalisis secara deskriptif untuk profil berat molekul protein pili *K. pneumoniae* serta hasil uji hemaglutinasi. Sedangkan data indeks adhesi protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* dengan konsentrasi pengenceran protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* dianalisis secara korelasi regresi untuk mengetahui hubungan diantara kedua variabel tersebut.

Identifikasi bakteri menunjukkan bahwa sampel merupakan *K. pneumoniae*. Isolasi protein pili dengan berat molekul 38,6 kDa dari sampel didapatkan konsentrasi sebesar 4,7 mg/ml. Pengenceran secara dilusi pada uji hemaglutinasi protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* menunjukkan hasil positif dengan titer tertinggi yaitu  $\frac{1}{2}$  yang memiliki arti bahwa dengan konsentrasi 2,35 mg/ml protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* bisa mengaglutinasi eritrosit mencit. Hasil uji korelasi Spearman antara indeks adhesi dengan titer pengenceran protein pili 38,6 *K. pneumoniae* diperoleh nilai *p-value* 0,000 ( $p < 0,05$ ) yang bermakna bahwa kedua variabel memiliki hubungan yang signifikan, dengan koefisien korelasi -0,964 yang berarti kekuatan hubungan kedua variabel sangat kuat dengan arah hubungan negatif. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* yang diberikan maka jumlah *K. pneumoniae* yang melekat pada sel eritrosit akan semakin sedikit. Sehingga dapat disimpulkan bahwa protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* merupakan protein hemaglutinin dan adhesin.

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah AWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Peran Protein Pili 38,6 kDa *Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin yang Berfungsi sebagai Faktor Virulensi”. Skripsi ini diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Kedokteran Universitas Jember (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran.

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

1. dr. Supangat, M.Kes., Ph.D., Sp.BA, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. Dosen Pembimbing Utama dr. Dini Agustina, M.Biomed dan Dosen Pembimbing Anggota dr. Dwita Aryadina Rachmawati, M.Kes yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
3. Kepala Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah memberikan izin penelitian;
4. Dosen Penguji I dr. Enny Suswati, M.Kes dan Dosen Penguji II dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed yang telah meluangkan waktu dan memberikan saran untuk skripsi ini;
5. Dosen Pembimbing Akademik dr. Dwita Aryadina Rachmawati, M.Kes yang telah memberikan bimbingan selama penulis menjadi mahasiswa;
6. Kedua orang tua saya, Ayahanda Boyani (alm) dan Ibunda Endri Susmini yang telah membimbing saya untuk menjadi pribadi yang lebih baik dan pantang menyerah;
7. Kakak saya Yoga Dwiprasetyo yang senantiasa sabar dalam menghadapi saya;
8. Saudari saya Zulfa Alfania yang senantiasa memberikan bantuan dan semangat;

9. Saudari-saudari saya tercinta, Dharatri Nundrisari, Alifia Husnun Adila, dan Emda Zein Cik Fitria yang senantiasa berbagi suka duka dalam satu atap;
10. Teman-teman kelompok KeRis Mikrobiologi, Astri Mutia Saraswati, Hanifa Riski A.S, Laila Rizqi Kuniawati, Kirana Nadyatara, dan Bima Setya S.N yang telah bersama-sama mewujudkan terlaksananya program tersebut;
11. Seluruh keluarga besar TBM Vertex yang telah menjadi rumah dan keluarga, semoga tetap jaya;
12. Teman-teman angkatan 2015 yang telah bersama-sama menapaki setiap tahapan pembelajaran dengan berbagai cerita yang tidak akan terlupakan;
13. Sahabat-sahabat saya Siti Nur Anisah, Elok Rahmawati, dan Dessi Endriyani yang senantiasa memberikan hangatnya persahabatan sejak SMA;
14. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini yang tidak dapat disebut satuper satu, terimakasih atas bantuannya.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhir kata penulis berharap, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca.

Jember, 18 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 .....	xii
DAFTAR TABEL .....	xv
DAFTAR GAMBAR .....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat</b> .....	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i></b> .....	<b>5</b>
2.1.1 Morfologi dan Taksonomi .....	5
2.1.2 Epidemiologi dan Transmisi .....	6
2.1.3 Faktor Virulensi .....	9
2.1.4 Imunitas Terhadap <i>Klebsiella</i> .....	11
<b>2.2 Protein Hemaglutinin</b> .....	<b>12</b>
<b>2.3 Protein Adhesin</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4 <i>Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i></b> <b>(SDS-PAGE)</b> .....	<b>13</b>

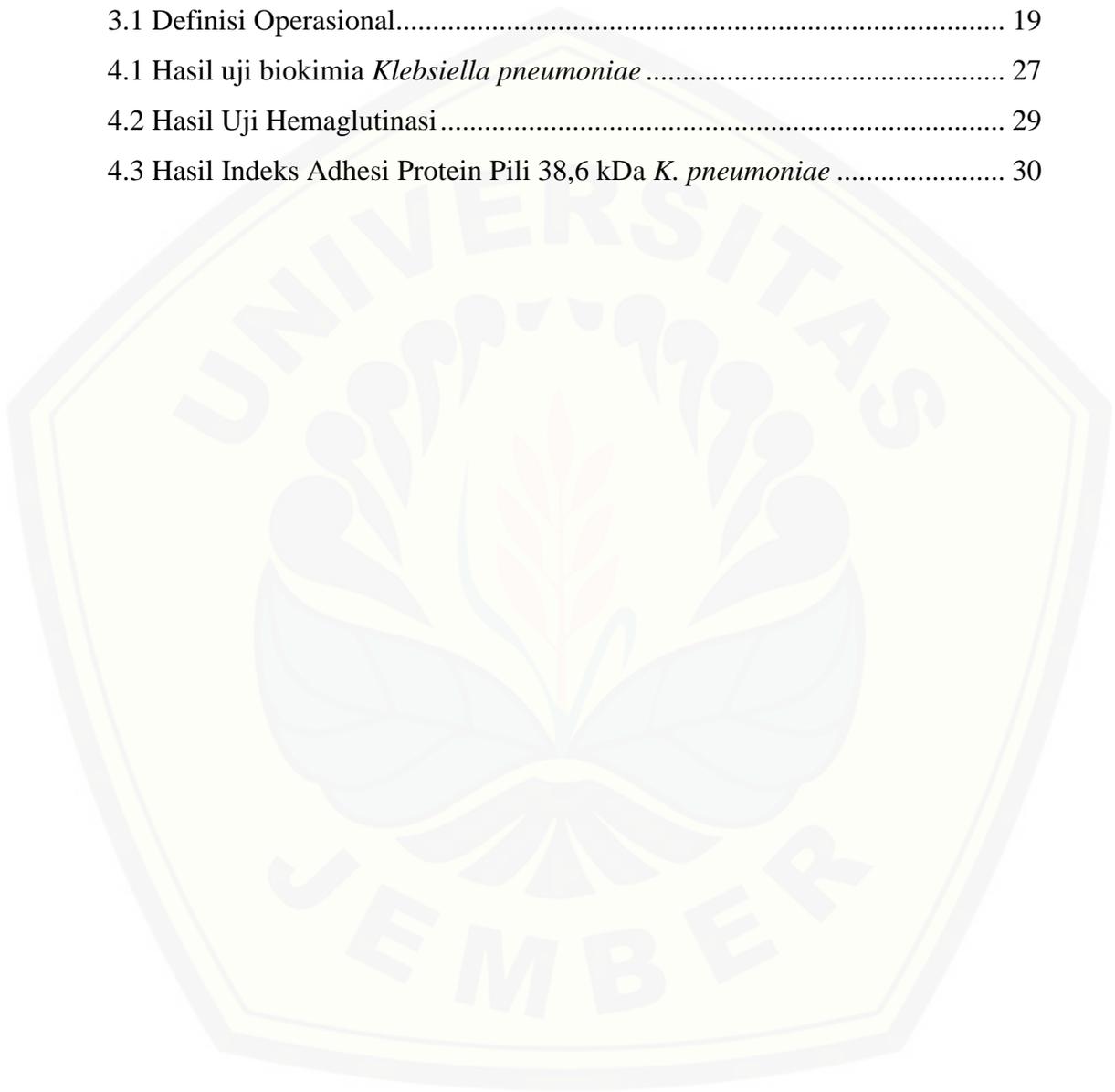
2.5 Kerangka Teori.....	15
2.6 Kerangka Konsep .....	16
2.7 Hipotesis .....	17
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>18</b>
3.1 Rancangan Penelitian.....	18
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	18
3.3 Sampel Penelitian .....	18
3.4 Jenis dan Sumber Data .....	18
3.5 Variabel Penelitian .....	18
3.6 Definisi Operasional .....	19
3.7 Alat dan Bahan .....	19
3.7.1 Alat .....	19
3.7.2 Bahan .....	20
3.8 Prosedur Penelitian .....	21
3.9 Analisis Data .....	24
3.10 Alur Penelitian .....	25
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>26</b>
4.1 Hasil Penelitian .....	26
4.1.1 Hasil Identifikasi dan Isolasi <i>K. pneumoniae</i> .....	26
4.1.2 Hasil Isolasi Protein Pili <i>K. pneumoniae</i> (SDS-PAGE) .....	27
4.1.3 Uji Hemaglutinasi dan Spektrofotometri Protein Pili <i>K.pneumoniae</i> .....	29
4.1.4 Uji Adhesi.....	29
4.2 Analisis Data .....	30
4.3 Pembahasan .....	32
4.3.1 Identifikasi <i>K. pneumoniae</i> .....	32
4.3.2 Isolasi Protein Pili <i>K. pneumoniae</i> (SDS-PAGE).....	33
4.3.3 Uji Hemaglutinasi.....	34
4.3.4 Uji Adhesi.....	35
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>37</b>
5.1 Kesimpulan.....	37

<b>5.2 Saran</b> .....	37
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	38
<b>LAMPIRAN</b> .....	43



**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Uji Biokimia Bakteri.....	5
3.1 Definisi Operasional.....	19
4.1 Hasil uji biokimia <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	27
4.2 Hasil Uji Hemaglutinasi.....	29
4.3 Hasil Indeks Adhesi Protein Pili 38,6 kDa <i>K. pneumoniae</i> .....	30

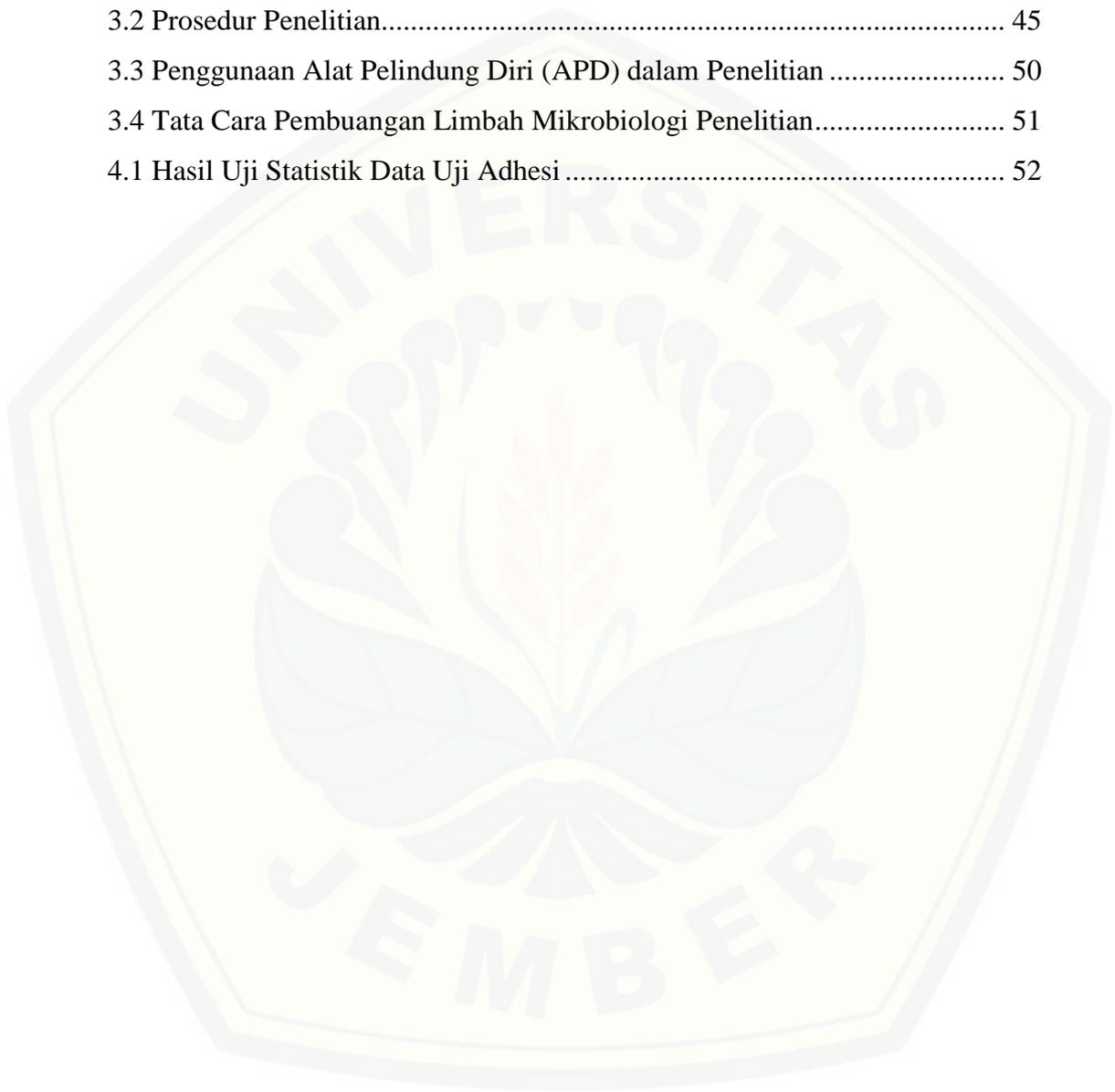


**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Morfologi Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	5
2.2 Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> pada media <i>Mac Conkey</i> .....	6
2.3 Faktor Virulensi <i>Klebsiella pneumoniae</i> serta efek terhadap sistem imun inang.....	10
2.4 Respon Imun Adaptif Terhadap Patogen Ekstraselular .....	11
2.5 Pola Adhesi Bakteri <i>Escherichia coli</i> pada Sel Hep-2.....	13
2.6 Pola Adhesi Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> pada Sel Int-407 .....	13
2.7 Kerangka Teori Penelitian .....	15
2.8 Kerangka Konsep .....	16
3.1 Skema Alur Penelitian.....	25
4.1 Hasil Identifikasi Bakteri .....	26
4.2 Hasil Uji Biokimia <i>K. pneumoniae</i> .....	27
4.3 Profil subunit protein pili <i>K. pneumoniae</i> hasil elektroforesis (SDS-PAGE) .....	28
4.4 Hasil elektroforesis (SDS-PAGE) Potongan Pili Pertama <i>K. pneumoniae</i> .....	28
4.5 Hasil Uji Hemglutinas.....	29
4.6 Hasil Uji adhesi protein pili 38,6 kDa <i>K. pneumoniae</i> dengan berbagai pengenceran.....	30
4.7 Grafik korelasi antara indeks adhesi dengan titer pengenceran protein pili 38,6 kDa <i>K. pneumoniae</i> .....	31

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
3.1 Lembar Persetujuan Etik ( <i>Ethical Clearance</i> ).....	43
3.2 Prosedur Penelitian.....	45
3.3 Penggunaan Alat Pelindung Diri (APD) dalam Penelitian .....	50
3.4 Tata Cara Pembuangan Limbah Mikrobiologi Penelitian.....	51
4.1 Hasil Uji Statistik Data Uji Adhesi .....	52



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

*Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri Gram negatif dari famili *Enterobacteriaceae*, non-motil, berbentuk batang pendek dan bersifat fakultatif anaerob (Brooks dkk., 2003). Bakteri *K. pneumoniae* ini merupakan patogen oportunistik yang terdapat di kulit, mulut, saluran pernafasan dan saluran pencernaan (Gorrie dkk., 2017). Semua organ tubuh dapat diserang oleh *K. pneumoniae*, tetapi sistem pencernaan, sistem pernapasan dan sistem urinaria lebih sering terinfeksi dari pada sistem organ lainnya. Zhang dkk (2017) melakukan surveilans tahunan di Cina dan melaporkan bahwa sebanyak 20,1% infeksi intraabdominal disebabkan oleh *K. pneumoniae*. Pemeriksaan sputum yang dilakukan di ruang rawat inap pada beberapa Rumah Sakit di Indonesia (RS Adam Malik, RS Dr M Jamil, RSUD DR Moewardi, RSUD Persahabatan, RSUD Dr Saiful Anwar, serta RSUD Dr Soetomo), didapatkan bahwa *K. pneumoniae* menjadi penyebab terbanyak (29%) pneumonia (Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2014). Infeksi saluran kemih juga banyak disebabkan oleh *K. pneumoniae*. Sebanyak 1135 isolat dari spesimen urin di RSUD dr Soetomo didapatkan 206 (18,1%) diantaranya merupakan *K. pneumoniae* (Sutandhio dkk., 2015). Syahputra (2018) melaporkan bahwa angka kejadian infeksi saluran kemih (ISK) yang disebabkan oleh *K. pneumoniae* di Rumah Sakit Daerah dr. Soebandi Jember mengalami peningkatan dari 5% pada tahun 2016 menjadi 11,7% pada tahun 2017.

Selain bisa menyebabkan berbagai infeksi, *K. pneumoniae* juga dilaporkan mengalami resistensi terhadap beberapa jenis antibiotik. Pada penelitian (Kazimoto dkk., 2018) menyebutkan bahwa terjadi indikasi peningkatan kejadian infeksi dengan *Multi-drug resistant* (MDR) termasuk yang memproduksi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dan *karbapenemase* pada bakteri Gram negatif termasuk *K. pneumoniae*. Hal ini akan mempersulit proses penyembuhan individu yang terinfeksi. Keadaan semakin mengkhawatirkan dengan adanya kolonisasi pada individu tanpa gejala yang mengakibatkan terbentuknya karier

asimtomatik sehingga menjadi reservoir transmisi yang semakin mempersulit kontrol epidemik dan mempermudah penyebaran (Koroglu dkk., 2015). Oleh karena itu, faktor virulensi yang menyebabkan *K. pneumoniae* mampu menginvasi inang dan menimbulkan patogenitas penting untuk diketahui sebagai dasar dalam menentukan diagnosis dan alternatif pencegahan dari infeksi maupun resistensi antibiotik yang disebabkan oleh *K. pneumoniae*.

Li dkk (2014) mengatakan bahwa faktor virulensi *K. pneumoniae* meliputi kapsul polisakarida (CPS), lipopolisakarida (LPS), pili, *outer membran protein* (Omp), akuisisi besi, dan utilisasi sumber nitrogen. (Stahlhut dkk., 2012) dalam penelitiannya mengatakan bahwa tahap awal perlekatan bakteri pada permukaan jaringan (adhesi) merupakan bagian yang penting dalam perkembangan infeksi oleh bakteri. Proses adhesi ini, salah satunya diperantarai oleh pili. Terdapat 4 tipe pili pada *K. pneumoniae* yaitu tipe 1, tipe 3, tipe Kpc, dan tipe KPF-28 adhesin yang masing-masing memiliki gen khas. Masing-masing tipe memiliki fungsi yang berbeda-beda. Tipe 1 berperan dalam adhesi dan pembuatan biofilm pada saluran kemih, tipe Kpc berperan dalam pembentukan biofilm bakteri, tipe KPF-28 adhesin berperan dalam adhesi pada saluran pencernaan, dan pili tipe 3 dari *K. pneumoniae* berperan dalam adhesi pada jaringan paru dan saluran kemih (Stahlhut dkk., 2012; Li dkk., 2014). Kemampuan adhesi yang tinggi dari *K. pneumoniae* penting untuk mempertahankan diri pada tubuh inang, Lin dkk (2014) dalam penelitiannya menjelaskan bahwa daya adhesi dan invasi yang tinggi dari *K. pneumoniae* menyebabkan bakteri ini mampu bertahan pada saluran kemih dan menimbulkan Infeksi Saluran Kemih (ISK) berulang (*Recurrent Urinary Tract Infection*) meskipun telah diterapi dengan antibiotik yang tepat.

Proses Adhesi, seperti yang telah dijelaskan diatas, diperantarai oleh adanya protein pada pili bakteri yang mampu berikatan dengan reseptor permukaan sel inang (Khater dkk., 2015). Protein tersebut juga mampu mengadakan ikatan layaknya ligand dan reseptor dengan molekul gula yang menjadi penyusun membran sel hewan dan manusia, protein spesifik ini disebut dengan protein hemaglutinin. Protein ini dapat diidentifikasi dengan terbentuknya gumpalan pada sel eritrosit yang dipaparkan dengan protein tersebut (Savage,

2003). Protein yang memiliki sifat imunogenik adalah protein dengan berat molekul 10-100 kDa (Parslow dkk., 2001). Pada penelitian sebelumnya ditemukan 7 pita protein dengan berat molekul 91,2 kDa, 42,4 kDa, 36 kDa, 27,4 kDa, 20,9 kDa, 12,8 kDa, dan 10,8 kDa, protein pili dengan berat molekul 12,8 kDa telah terbukti sebagai protein hemaglutinin dan adhesin (Agustina dkk., 2014). Hasil elektroforesis (SDS-PAGE) pada studi pendahuluan yang dilakukan peneliti didapatkan protein pili dengan berat molekul 38,6 kDa *Klebsiella pneumoniae* merupakan pita protein yang paling tebal, hal ini menunjukkan bahwa protein pili 38,6 kDa *Klebsiella pneumoniae* memiliki konsentrasi yang paling tinggi. Selain itu, protein dengan berat molekul 38,6 kDa belum ada yang melaporkan. Oleh karena itu, peneliti ingin mengetahui peran protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* sebagai protein hemaglutinin dan adhesin yang berfungsi sebagai faktor virulensi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* berperan sebagai protein hemaglutinin dan adhesin yang berfungsi sebagai faktor virulensi.

## 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui peran protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* sebagai protein hemaglutinin dan adhesin yang berfungsi sebagai faktor virulensi.

## 1.4 Manfaat

Manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Peneliti dapat mengetahui peran protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* sebagai protein hemaglutinin dan adhesin yang berfungsi sebagai faktor virulensi
- b. Tenaga medis dapat mengetahui peran protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* sebagai pertimbangan dalam penanganan dan pencegahan infeksi *K.pneumoniae*

- c. Pemerintah dapat lebih terdorong menggalakkan program promotif, preventif, dan rehabilitatif untuk pasien dengan infeksi yang disebabkan oleh *K. pneumoniae*.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Klebsiella pneumoniae*

#### 2.1.1 Morfologi dan Taksonomi

Menurut Brooks dkk (2003), *K. pneumoniae* merupakan bakteri Gram negatif, non-motil, berbentuk batang pendek, serta memiliki kapsul polisakarida yang lebar (Gambar 2.1). Kapsulnya memiliki Antigen K dan Antigen O. Bakteri ini bersifat fakultatif anaerob. Pada uji biokimia IMViC (*Indol, Methyl Red, Voges-Proskauer dan Simmon's Citrate*) bakteri ini memberikan hasil positif pada pemeriksaan tes *Simmon's Citrate* dan *Voges-Proskauer*. Hasil uji biokimia Tripel Sugar Iron Agar (TSIA) *K. pneumoniae* memiliki sifat Asam/Asam,+= menghasilkan gas dan tidak menghasilkan H<sub>2</sub>S (Tabel 2.1).



Pengecatan Gram dilihat dengan mikroskop perbesaran 1000x

Gambar 2.1 Morfologi *K. pneumonia* (Sumber: *Infectious Disease Society of America* (IDSA), 2008)

Tabel 2.1 Uji Biokimia Bakteri

Spesies Bakteri	Uji Indol	Uji Methyl Red	Uji Voges-Proskauer	Uji Simmon's Citrate	Uji TSIA
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	A/A; H <sub>2</sub> S (-); Gas (+)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+	A/A; H <sub>2</sub> S (-); Gas (+)
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	+	+	K/A; H <sub>2</sub> S (-); Gas (-)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	+	+	A/A; H <sub>2</sub> S (-); Gas (+)
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	+	K/A; H <sub>2</sub> S (+); Gas (+)

Sumber: Brooks dkk., 2003

Bakteri ini dapat tumbuh pada media yang mengandung karbohidrat seperti EMB, *MacConkey*, dan *Deoxycholate Medium Lactosa*. Hasil kultur *K. pneumoniae* memiliki karakteristik membentuk koloni yang lebar dan sangat mukoid, serta cenderung menyatu dengan inkubasi berkepanjangan (Gambar 2.2).



Gambar 2.2 Koloni *K. pneumoniae* pada media *Mac Conkey* (Sumber: *Infectious Disease Society of America (IDSA)*, 2008)

*National Center for Biotechnology Information (NCBI)* menyebutkan bahwa taksonomi *K. pneumoniae* adalah sebagai berikut:

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

### 2.1.2 Epidemiologi dan Transmisi

*K. pneumoniae* merupakan flora normal kulit, mulut, saluran pernafasan dan saluran pencernaan. Sebanyak 50% kejadian infeksi *K. pneumoniae* berasal dari flora normal tubuh inang sendiri (Gorrie dkk., 2017). Infeksi *K. pneumoniae* bukan hanya terjadi pada pasien Rumah Sakit atau yang sedang dalam keadaan imunokompromais. Akan tetapi, sekarang telah diketahui bahwa terjadi peningkatan kasus infeksi *K. pneumoniae* pada individu secara komunitas tanpa adanya immunodefisiensi (Harada dan Doi, 2018).

Resistensi antibiotik pada infeksi bakteri telah berkembang menjadi fokus kesehatan global, tidak terkecuali pada *K. pneumoniae*. Terdapat laporan yang menjelaskan bahwa terjadi indikasi peningkatan *Multi-drug resistant* (MDR) bakteri termasuk *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dan resistensi *Enterobacteriaceae* *karbapenemase-production* pada bakteri Gram negatif (Kazimoto dkk., 2018). Oleh karena itu, kini *K. pneumoniae* menjadi perhatian dunia sebagai patogen manusia yang sangat memprihatinkan (Littlea dkk., 2014).

Menurut Koroglu dkk (2015) *K. pneumoniae* menyebabkan berbagai variasi infeksi dan merupakan patogen oportunistik yang bertahan pada lingkungan Rumah Sakit. Selain itu, bakteri ini dapat menyebar melalui kontak tangan dari petugas pelayanan kesehatan serta secara nosokomial karena *K. pneumoniae* dapat bertahan selama beberapa jam pada atribut yang dikenakan petugas. Kolonisasi pada individu akan menyebabkan individu tersebut menjadi karier asimtomatik. Hal ini akan semakin mempersulit kontrol epidemik dan mempermudah penyebaran karena individu tersebut akan menjadi reservoir transmisi yang sulit untuk dideteksi.

*K. pneumoniae* dapat menimbulkan infeksi pada berbagai organ tubuh, terutama organ pada sistem pencernaan, sistem pernapasan dan sistem urinaria. Negara Cina telah melakukan surveilans tahunan penyebab infeksi intraabdominal, didapatkan bahwa bakteri famili *Enterobacteriaceae* menjadi penyebab terbanyak, dan *Escherichia coli* (*E. coli*) menempati posisi pertama diikuti oleh *K. pneumoniae* pada tahun 2000-2009. Tahun 2012 dan 2014 tidak jauh berbeda dengan tahun sebelumnya, *E. coli* menyebabkan 45,4% kasus infeksi intraabdominal diikuti oleh *K. pneumoniae* (20,1%) dan *Enterobacter cloacae* (5,2%). ESBL (+) ditemukan pada 55,6% dari infeksi intraabdominal yang disebabkan oleh *K. pneumoniae*. Infeksi intraabdominal paling sering terjadi pada kandung empedu dan peritoneum. Berbeda dengan organ lainnya, *K. pneumoniae* lebih sering menjadi penyebab infeksi di hepar dibandingkan *E. coli* (Zhang dkk., 2017).

Infeksi *K. pneumoniae* pada saluran pernapasan sering menimbulkan pneumonia. Penelitian terbaru menyebutkan bahwa *K. pneumoniae* dapat

menyebabkan pneumonia baik nosokomial, komunitas maupun pada pasien dengan status imunokompromais (Harada dan Doi, 2018). Beberapa Rumah Sakit di Indonesia melaporkan bahwa penyebab pneumonia komunitas terbanyak pada ruang rawat inap dari bahan sputum adalah *K. pneumoniae* (29%), *Acinobacter baumannii* (27%), *Staphilococcus aureus* (16%), *Streptococcus pneumonia* (12%), dan lain-lain (Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2014).

Akhtar dkk (2017) menyebutkan bahwa *K. pneumoniae* merupakan bakteri uropatogen tersering setelah *E. coli* dengan tingkat prevalensi 21,4% di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Bangladesh pada bulan Mei-Juni 2016. Hal ini tidak jauh berbeda dengan hasil laporan pemeriksaan spesimen urin di RSUD dr Soetomo Surabaya oleh Sutandhio dkk (2015), *K. pneumoniae* menyebabkan 18,1% (206 isolat) infeksi pada saluran kemih dengan 61,65% diantaranya ESBL (+). Pada dasarnya, *Urinary Tract Infections* (UTI's) dibagi menjadi 2, yaitu:

- a. *Uncomplicated* UTI's merupakan UTI's pada individu tanpa abnormalitas secara struktural maupun neurologis pada saluran kemihnya. Transmisi *K. pneumoniae* menyebabkan UTI's dimulai saat uropatogen termasuk *K. pneumoniae* yang terdapat dalam saluran pencernaan mengkontaminasi area periurethral dan mampu melakukan kolonisasi di urethra. Selanjutnya uropatogen tersebut dapat melakukan migrasi secara asenden ke vesika urinaria serta ginjal. Berdasarkan letaknya terdapat *lower* UTI's (sistitis) dan *upper* UTI's (pyelonephritis). Bakteri penyebab *uncomplicated* UTI's terbanyak adalah *Uropatogenic E. coli* (UPEC) dan *K. pneumoniae*
- b. *Complicated* UTI's terjadi apabila terdapat kelainan struktural atau neurologis seperti obstruksi saluran kencing, retensi urin, gagal ginjal, kehamilan, dan transplantasi ginjal. Selain itu penggunaan *indwelling catheter* dan imunosupresi juga merupakan faktor resiko *complicated* UTI's. Etiologi *complicated* UTI's terbanyak yaitu UPEC, *Enterococcus spp* dan *K. pneumoniae* (Flores-mireles dkk., 2015).

*K. pneumoniae* juga menyebabkan infeksi saluran kemih berulang (*Reccurent Urinary Tract Infection*) karena daya adhesi dan invasi yang kuat membuat

bakteri ini mampu bertahan pada saluran kemih walaupun telah diterapi dengan antibiotik yang tepat (Lin dkk., 2014).

### 2.1.3 Faktor Virulensi

Li dkk (2014) menjelaskan bahwa terdapat beberapa faktor virulensi dari *K. pneumoniae* yang akan meningkatkan kemampuan bakteri ini dalam melawan sistem pertahanan tubuh dari hospes. Faktor-faktor tersebut adalah sebagai berikut:

#### a. Kapsul Polisakarida (CPS)

Kapsul polisakarida pada *K. pneumoniae* bersifat asam dan disintesis melalui jalur *Wzy-dependent polymerization* yang mirip dengan *E. coli*. Telah ditemukan 78 tipe kapsul polisakarida (Antigen K) pada *K. pneumoniae*.

#### b. Lipopolisakarida (LPS)

Terdapat 3 lapisan lipopolisakarida pada *K. pneumoniae*, yaitu lipid A yang bersifat hidrofobik, antigen O pada lapisan terdalam, dan lapisan pemisah (*Core polysaccharide*) antara Lipid A dan Antigen O.

#### c. Pili

*K. pneumoniae* memiliki 4 tipe pili yaitu tipe 1, tipe 3, tipe Kpc, dan tipe KPF-28 adhesin. Masing-masing tipe memiliki gen khas yang dapat diidentifikasi dengan menggunakan *colony immunoblotting* (Di Martino dkk., 2003). Tipe 1 dapat diidentifikasi melalui keberadaan gen Fim A, B, C, D, E, F, G, H, I, dan K. Karakteristik pili tipe 1 yaitu tipis, kaku, adhesif, permukaannya menyerupai benang pada membran luar, tipe 1 ini mirip dengan pili tipe 1 dari *E. coli*. Pili melampaui kapsul dan menjadi mediator adhesi atau perlekatan bakteri pada struktur yang mengandung mimosin pada sel inang/matrix ekstraselular. Tipe 1 penting dalam infeksi pada saluran urinaria tetapi tidak pada saluran pernapasan ataupun pencernaan. Selanjutnya tipe 3 memiliki gen khas Mrk A, B, C, D, E, F, H, I, J. Pili tipe 3 mampu melekat pada molekul kolagen, sel epitel, jaringan ginjal dan jaringan paru. Tipe selanjutnya yaitu Kpc pili yang memiliki gen Kpc A, B, C, D yang berhubungan dengan Hipervirulen *K. pneumoniae* serta berperan dalam pembentukan biofilm bakteri

ini. Tipe KPF-28 adhesin yang berbentuk panjang, tipis, fleksibel, dengan diameter 4-5 nm dan panjang 0,5-2 mm, berperan dalam perlekatan pada saluran pernapasan mamalia. Tipe ini memiliki gen khas CAZ-5/5HV-4.

d. *Outer Membran Protein (Omp)*

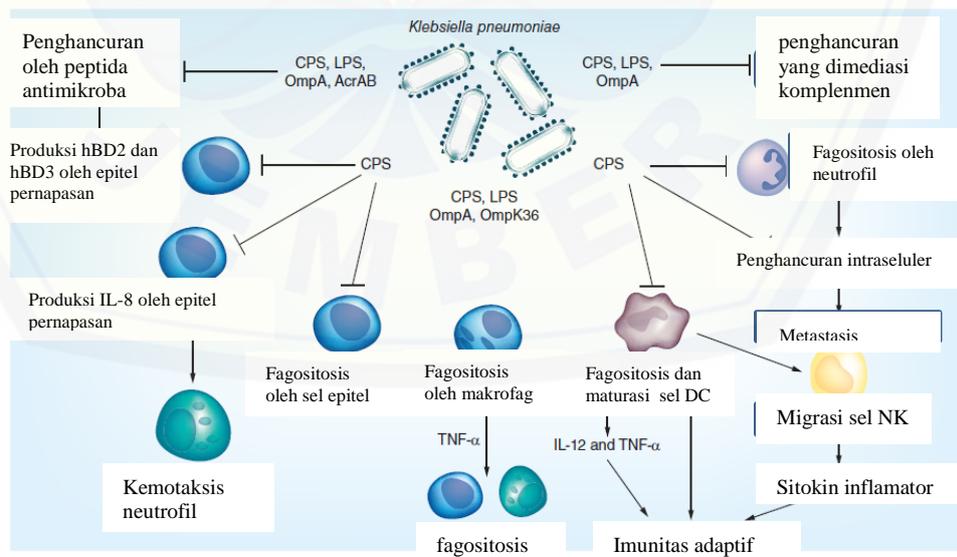
Terdapat beberapa jenis Omp, salah satunya adalah OmpA. OmpA merupakan protein membran mayor dari bakteri Gram negatif dan banyak terdapat pada *Enterobacteriaceae* seperti *K. pneumoniae*.

e. Akuisisi Besi

Besi penting untuk pertumbuhan bakteri. Apabila inang memiliki kadar besi yang rendah maka terdapat molekul yang berfungsi untuk mengikat zat besi (hemophores/siderophores). *K. pneumoniae* memiliki siderophores bernama enterobactin yang memiliki afinitas tinggi terhadap zat besi.

f. Utilisasi Sumber Nitrogen

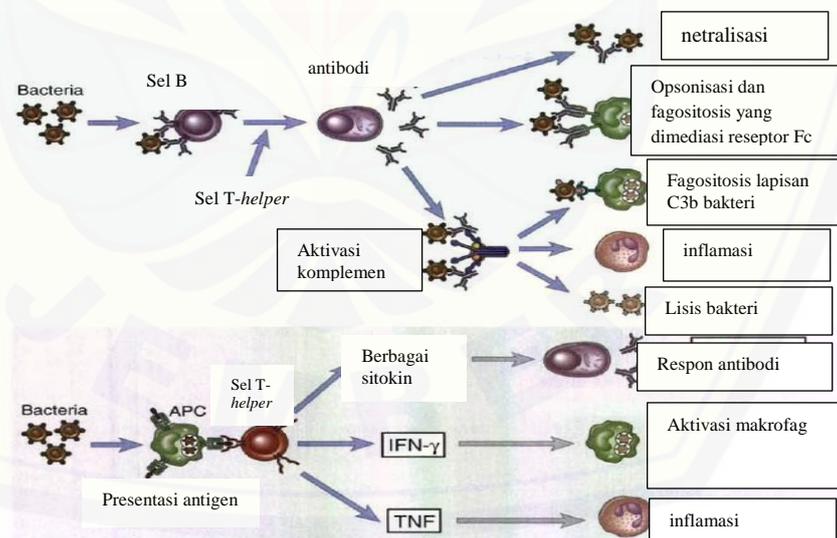
*K. pneumoniae* menggunakan urease untuk menghidrolisis urea menjadi ammonia dan  $CO_2$  sebagai sumber nitrogen. Inaktivasi urease akan menurunkan pertumbuhan bakteri ini pada saluran pencernaan. Secara keseluruhan faktor virulensi *K. pneumoniae* serta efek yang ditimbulkan dalam sistem imun inang dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Faktor Virulensi *K. pneumoniae* serta efek terhadap sistem imun inang (Sumber: Li dkk., 2014).

#### 2.1.4 Imunitas Terhadap *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* telah banyak diketahui sebagai patogen ekstraselular. Infeksi *K. pneumoniae* akan berpengaruh terhadap sistem imun alami dan adaptif dari inang. Prinsip dari sistem imun alami adalah terjadinya proses fagositosis oleh polimorfonuklear (PMN) dan efek bakterisidal oleh protein komplemen. Sistem imun adaptif memiliki prinsip kerja yaitu mengaktivasi antibodi dan  $CD4^+$  *T-helper* sel seperti pada Gambar 2.4. Mekanisme mayor dari bakteri untuk menghindari dari imunitas humoral adalah adanya variasi genetik pada antigen permukaannya. Beberapa antigen permukaan bakteri seperti *Gonococcus*, *Eschericia* dan *Klebsiella* merupakan protein yang terkandung di dalam pili mereka. Pili berperan dalam adhesi bakteri pada sel inangnya. Apabila protein yang terdapat pada pili memiliki variasi genetik yang tinggi maka akan semakin meningkatkan kemampuan antigen untuk menghindari dari antibodi spesifiknya. Oleh karena itu, kemampuan adhesi bakteri akan semakin kuat. Semakin tinggi kemampuan bakteri untuk melakukan adhesi terhadap sel inang menandakan semakin tinggi virulensi dari bakteri tersebut (Abbas dkk., 2013).



Gambar 2.4 Respon imun adaptif terhadap patogen ekstraselular (Sumber: Abbas dkk., 2013)

## 2.2 Protein Hemagglutinin

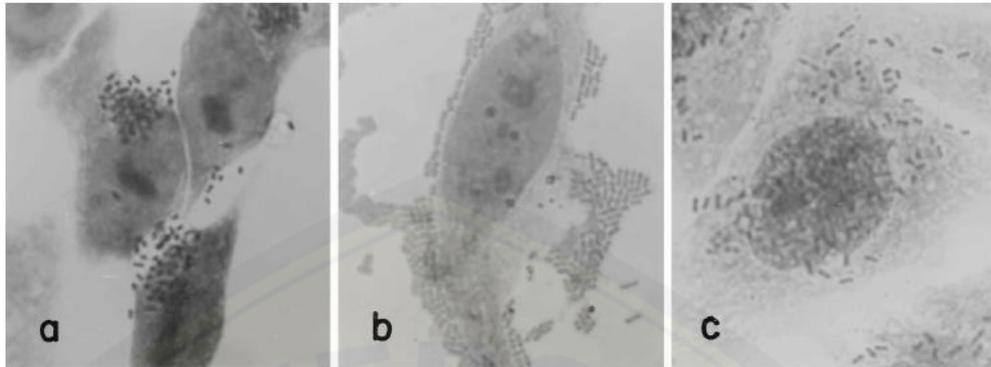
Hemagglutinin merupakan protein yang memiliki afinitas spesifik pada molekul gula. Karbohidrat merupakan penyusun utama membran sel manusia dan hewan sehingga hemagglutinin dapat melekat pada grup reseptornya. Identifikasi dan karakterisasi dari hemagglutinin dapat dilihat pada membran sel darah merah, hemagglutinin menyebabkan penggumpalan pada eritrosit (Savage, 2003).

Spesies bakteri yang telah banyak diteliti protein hemagglutinannya adalah *E. coli*. Contohnya pada penelitian Dahlberg dkk (2009) menyebutkan bahwa *E. coli* dapat menghemagglutinasikan sel hewan yang diperantarai bagian tubuhnya yaitu pili. Selain *E. coli*, protein berat molekul 12,8 kDa yang terdapat di pili *K. pneumoniae* juga mampu menghemagglutinasikan sel hewan (Agustina dkk., 2014). Hal ini menjelaskan bahwa pili berperan dalam adhesi bakteri pada inangnya. Kemampuan adhesi bakteri akan menyebabkan bakteri dapat membentuk kolonisasi, menstimulasi infiltrasi sel imun, aktivasi sel imun dan fagositosis.

## 2.3 Protein Adhesin

Adhesi bakteri pada sel epitel dan permukaan abiotik di mediasi oleh berbagai macam protein permukaan yang memungkinkan terjadinya adhesi (Khater dkk., 2015). Kemampuan sel bakteri untuk adhesi dan berinteraksi dengan permukaan akan menyebabkan bakteri mampu membentuk biofilm yang penting untuk bertahan pada lingkungan kompleks inang. Bakteri biasanya menggunakan pili atau flagella untuk menembus membran barrier dari inangnya. Pili bakteri selain berguna untuk kemampuan adhesi juga berperan dalam transfer DNA dan pembentukan biofilm (Berne dkk., 2015).

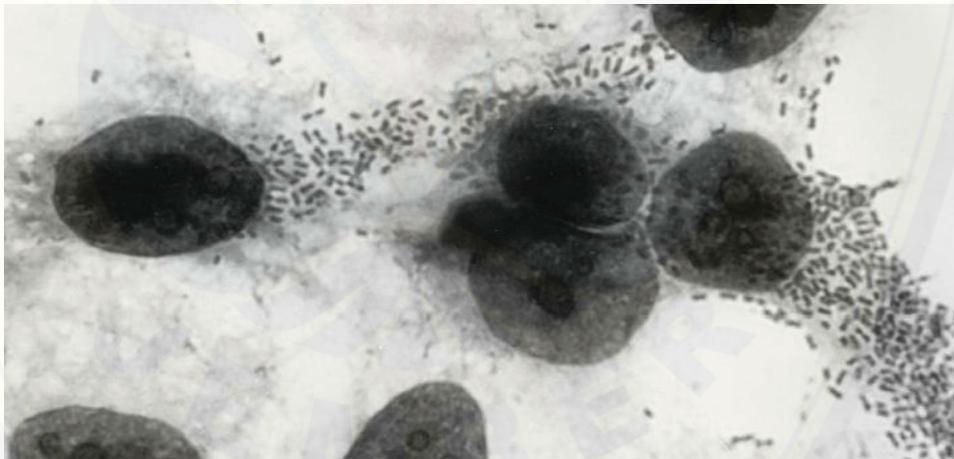
González dalam (Agustina dkk., 2014) menjelaskan bahwa terdapat 3 pola perlekatan bakteri *E. coli*. Pola pertama yaitu adhesi lokal, disebut demikian karena koloni melakukan perlekatan pada sebagian daerah (lokal) dari sel inang (Gambar 2.5 (a)). Pola kedua adalah adhesi agregatif dimana koloni melakukan adhesi dengan membentuk gumpalan (Gambar 2.5 (b)). Terakhir adalah pola adhesi difus dimana koloni melakukan perlekatan pada seluruh bagian sel inang (Gambar 2.5 (c)).



Pengecatan (a) Adhesi lokal; (b) adhesi agregatif; dan (c) adhesi difus

Gambar 2.5 Pola adhesi bakteri *E.coli* pada sel Hep-2 dengan pengecatan Giemsa 10% dan dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 880x (Sumber: Gonzalez dkk., 1997 dalam Agustina dkk., 2014)

*K. pneumoniae* menggunakan 2 pola adhesi yaitu adhesi lokal dan agregat seperti pada Gambar 2.6 (Favre-bonte dkk., 1995 dalam Agustina dkk., 2014).



Gambar 2.6 Pola adhesi *K. pneumoniae* pada sel Int-407 dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x (Sumber: Favre-bonte dkk., 1995 dalam Agustina dkk., 2014)

#### 2.4 Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

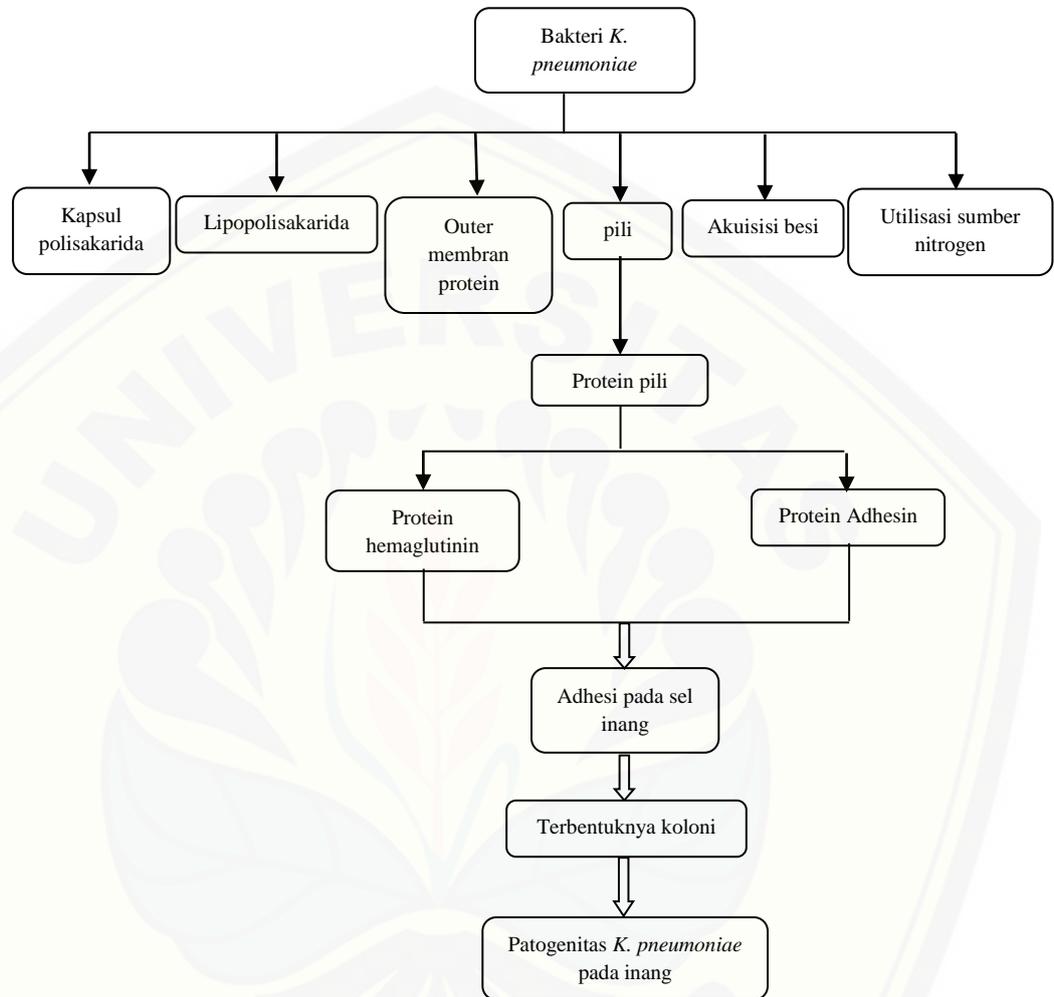
SDS-PAGE merupakan salah satu metode umum yang digunakan untuk memisahkan molekul protein berdasarkan massa molekulnya (Brown, 2017).

*Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) merupakan detergen yang berfungsi untuk memutus ikatan lemah yang terdapat pada struktur protein sekunder dan tersier serta memberikan muatan negatif pada protein. Protein yang bermuatan negatif kemudian akan bermigrasi menuju ke daerah yang bermuatan positif. Sedangkan *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) merupakan media penunjang berupa gel yang memiliki pori-pori. Protein akan melewati pori-pori ini dan terpisah berdasarkan massa molekulnya saat diberi arus listrik. Efek protein yang berpindahan dan melewati pori-pori dapat diilustrasikan seperti proses pengayakan, molekul paling rendah akan melewati pori-pori dan berada pada bagian dasar gel. Akan tetapi perbedaannya, jika pengayakan perpisahan zatnya berdasarkan ukurannya sedangkan SDS-PAGE berdasarkan massa molekulnya (Roy dan Kumar, 2012).

Teknik pewarnaan *staining* memungkinkan visualisasi migrasi protein dan membandingkan jarak migrasi dengan *standart (protein marker)* yang telah diketahui massa molekulnya dan biasanya terdapat pada bagian paling kiri atau paling kanan dari gel (Roy dan Kumar, 2012). Selain itu, proses pewarnaan juga akan membuat protein dengan massa molekul tertentu dapat terlihat paling menonjol baik dari luas daerahnya serta dari tingkat kegelapan warnanya. Hal ini karena konsentrasi massa molekul tersebut yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang lain.

## 2.5 Kerangka Teori

Kerangka teori pada penelitian ini seperti Gambar 2.7



Keterangan:

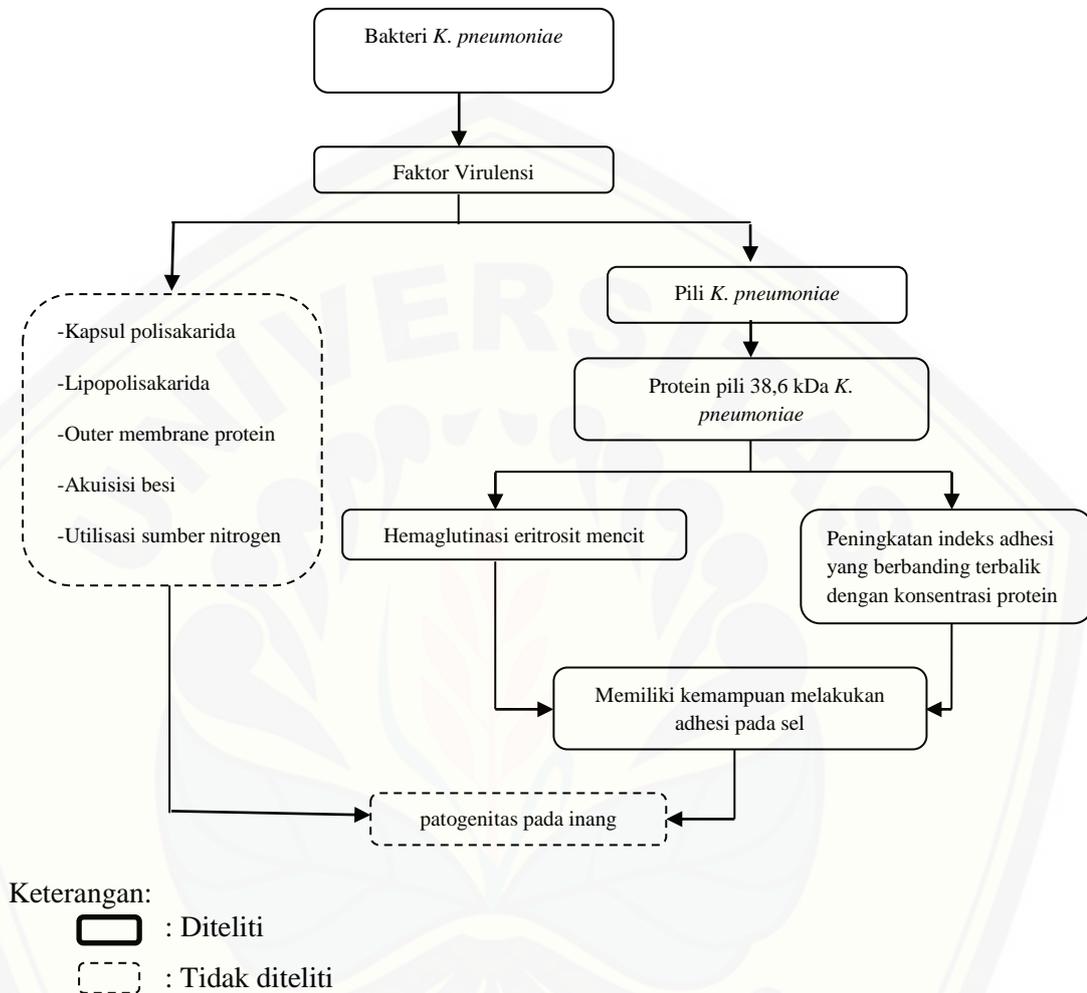
→ :Penyusun  
 ⇒ :Menyebabkan

Gambar 2.7 Kerangka Teori Penelitian

*K. pneumoniae* memiliki beberapa bagian tubuh yang berperan sebagai faktor virulensi, salah satunya pili (Li dkk., 2014). Pili disusun oleh protein yang diduga berperan sebagai protein hemaglutinin dan adhesin yang menyebabkan *K. pneumoniae* dapat melakukan adhesi pada sel inang (Khater dkk., 2015). Proses adhesi *K. pneumoniae* menyebabkan bakteri ini mampu membentuk kolonisasi dan menimbulkan patogenitas pada inang (Stahlhut dkk., 2012).

## 2.6 Kerangka Konsep

Kerangka konsep pada penelitian ini seperti Gambar 2.8



Gambar 2.8 Kerangka Konsep

*K. pneumoniae* memiliki beberapa faktor virulensi, salah satunya adalah pili yang mengandung protein (Li dkk., 2014; (Khater dkk., 2015). Peneliti akan melakukan penelitian terhadap protein pili *K. pneumoniae* dengan berat molekul 38,6 kDa untuk mengetahui fungsi protein tersebut sebagai protein hemagglutinin yang dapat diketahui melalui uji hemagglutinasinya pada eritrosit mencit dan fungsi protein tersebut sebagai protein adhesin melalui uji adhesi pada sel enterosit mencit yang dapat diketahui dengan peningkatan indeks adhesi yang berbanding lurus dengan konsentrasi protein.

## 2.7 Hipotesis

Protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* berperan sebagai protein hemagglutinin dan adhesin yang berfungsi sebagai faktor virulensi.



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni melalui uji adhesi. Selain itu, penelitian ini juga merupakan penelitian deskriptif observasional melalui uji hemaglutinasi.

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember serta Laboratorium Bioteknologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Jember pada bulan November 2018-Januari 2019.

### 3.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah *K. pneumoniae* yang terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember serta sel eritrosit dan sel enterosit mencit strain BALB/C usia 6-8 minggu dengan berat 25 gram dan dalam kondisi sehat.

### 3.4 Jenis dan Sumber Data

Jenis data pada variabel yang diukur dalam penelitian ini yaitu data primer. Data primer adalah data yang diambil dari *K. pneumonia* berupa identifikasi protein pili 38,6 kDa *K. pneumonia*, kemampuan hemaglutinasi protein pili *K. pneumoniae*, dan perbandingan indeks adhesi dengan konsentrasi protein pili 38,6 kDa *K. pneumonia*.

### 3.5 Variabel Penelitian

Variabel dependen (terikat) pada penelitian ini adalah indeks adhesi protein pili *K. pneumoniae* dan aglutinasi eritrosit mencit. Sedangkan variabel

independen (variabel bebas) pada penelitian ini adalah konsentrasi protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae*.

### 3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional penelitian ini dijelaskan pada Tabel 3.1

Tabel 3.1 Definisi operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Jenis Data
Protein pili	Protein yang terdapat pada pili bakteri dan berperan sebagai faktor perlekatan yang dapat dilihat dari band protein pada gel elektroforesis	Elektroforesis	Menggunakan persamaan linear	Kuantitatif	Rasio
Konsentrasi protein hemaglutinin pili	Protein yang didapat dari pili bakteri dan mampu menggumpalkan sel eritrosit mencit dengan berbagai macam pengenceran	Mikropipet	Hitung konsentrasi tiap pengenceran protein hemaglutinin pili	Kuantitatif	Rasio
Indeks adhesi	Jumlah rata-rata bakteri yang menempel pada setiap 100 sel enterosit mencit	Mikroskop	Menghitung jumlah bakteri yang menempel pada sel enterosit mencit	Kuantitatif	Rasio

### 3.7 Alat dan Bahan

#### 3.7.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

- Alat untuk kultur *K. pneumoniae* yaitu botol, *waterbath*, dan inkubator
- Alat untuk isolasi pili *K. pneumoniae* yaitu inkubator, sentrifuge, pili *cutter*, dan vortex
- Alat untuk elektroforesis guna mengetahui berat molekul protein dengan menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

- d. Alat untuk elektroelusi dan dialisis yaitu *dialise tube*, *electroelusion chamber*, *beaker glass*, *magnetic stirrer*, *ependrof*, sentrifuge, dan *refrigerator*
- e. Alat untuk uji hemaglutinasi protein pili *K. pneumoniae* yaitu *microplate V* dan *rotator plate*
- f. Alat untuk isolasi sel enterosit mencit yaitu pisau bedah, spektrofotometer, dan *shaking incubator*
- g. Alat untuk uji adhesi protein pili *K. pneumoniae* yaitu sentrifuge, spektrofotometer, *shaking waterbath*, dan *shaking incubator*.

### 3.7.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

- a. Bahan untuk kultur *K. pneumoniae* yaitu media *Thiaproline Carbontae Glutamate* (TCG) dan media *Brain Heart Infusion* (BHI)
- b. Bahan untuk isolasi pili *K. pneumoniae* yaitu *Tri Chloroacetic Acid* (TCA) dan cairan *Posphat Bufer Saline* (PBS) pH 7,4
- c. Bahan untuk eletroforesis guna mengetahui berat molekul protein yaitu PBS steril, larutan penyangga (5 mM pH 6,8 *Tris HCL*, *2-mercapto ethanol* 5%, *sodium dodecyl sulfate* 2,5%, gliserol 10%, dengan warna pelacak *bromophenol blue*), *mini slab gel* 12,5% dengan *stacking gel* 4%, dan *coomasive brilliant blue*
- d. Bahan untuk elektroelusi dan dialisis yaitu larutan buffer, aquades steril, PBS steril, etanol dingin, dan larutan buffer pH 6,8 *Tris HCL* 0,5 M
- e. Bahan untuk uji hemaglutinasi protein pili *K. pneumoniae* yaitu suspensi sel darah merah mencit
- f. Bahan untuk isolasi sel enterosit mencit yaitu mencit bb 25 gram, kloroform, PBS pH 7,4 yang berisi 1 mM *dithiothretiol*, PBS steril, cairan yang berisi 1,55 mM KCL; 9,6 mM NaCl; 8 mM *KH2SO4*; 27 mM Na *Citrate* dan 5,6 mM *Na2HPO4* dengan pH 7,4, cairan yang berisi 1,5 mM EDTA dan 0,5 mM *dithiothretiol*
- g. Bahan untuk uji adhesi protein pili *K. pneumoniae* yaitu *K. pneumoniae*, media *lactose broth*, PBS, enterosit mencit, dan pewarnaan gram.

### 3.8 Prosedur Penelitian

Prosedur dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

a. Uji Kelayakan Etik

Peneliti mengajukan permohonan persetujuan etik kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penelitian dapat dilaksanakan setelah mendapat persetujuan etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

b. Identifikasi dan Isolasi *K. pneumoniae*

Koloni bakteri yang didapat kemudian diperiksa karakteristik morfologi koloni pada media *MacConkey* agar kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan dilanjutkan dengan pewarnaan Gram dan uji biokimia (Ling dkk., 1988 dalam Khan dkk., 2018).

c. Kultur *K. pneumoniae*

Isolasi bakteri dengan menggunakan metode Ehara yaitu biakan yang tumbuh pada media *MacConkey* agar diambil kemudian dimasukkan ke dalam botol yang telah diisi dengan BHI sebanyak 1000 ml lalu dikocok kuat selama 30 menit pada *waterbath* suhu 37°C. Suspensi bakteri diambil 10 ml dan dimasukkan ke media TCG dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (Ehara dkk., 1987 dalam Sumarno dkk., 2015).

d. Isolasi Pili *K. pneumoniae*

Bakteri diambil dari botol biakan bakteri dan ditambahkan TCA sampai konsentrasi 3% lalu dikocok rata dan diletakkan pada suhu kamar selama 1 jam dengan pengulangan kocokan setiap 15 menit. Selanjutnya sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet diambil dan diresuspensi dengan PBS pH 7,4 dengan perbandingan 1:10. Pemotongan pili menggunakan pili *cutter (mixer)* yang dibuat sendiri di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Pili bakteri dipotong selama 30 detik dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C, dan diulangi sampai supernatan jernih dengan masa istirahat setiap pengulangan yaitu 1 menit. Hasil pemotongan pili di sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm

pada suhu 4°C selama 30 menit, kemudian diambil supernatannya (Ehara dkk., 1987 dalam Sumarno dkk., 2015).

e. Isolasi Protein Pili *K. pneumoniae* (SDS-PAGE)

Identifikasi berat molekul protein pili *K. pneumoniae* dilakukan dengan menggunakan SDS-PAGE dari metode penelitian Laemmli. Sampel protein dipanaskan selama 5 menit pada suhu 100°C dalam larutan penyangga yang mengandung 5 mM pH 6,8 Tris HCL, 2-mercapto ethanol 5%, sodium dodecyl sulfate 2,5%, gliserol 10%, dengan warna pelacak bromophenol blue. Isolasi protein ini menggunakan mini slab gel 12,5% dengan stacking gel 4%. Voltase yang digunakan 125 mV dengan waktu running 90 menit. Pewarna yang digunakan yaitu coomassive brilliant blue dan molekul standar pre stained broad range (Laemmli, 1970 dalam Podmirseg dkk., 2016).

f. Pemurnian Protein Pili *K. pneumoniae*

Proses pemurnian protein pili ini menggunakan metode Thomas, dalam penelitiannya, gel hasil SDS-PAGE dipotong melintang dan dimasukkan pada dialise tube yang berisi larutan buffer. Selanjutnya dilakukan elektroelusi pada electroelusion chamber yang berisi larutan buffer dengan tegangan 20 V dan arus 0,3 A selama 2 jam. Hasil elektroelusi kemudian didialisa dengan memasukkannya kedalam beaker glass berisi aquades steril pada magnetic stirrer dalam refrigerator selama 24 jam. Proses diulang dengan menggunakan beaker glass yang berisi cairan PBS steril selama 24 jam. Protein yang diperoleh ditampung pada eppendorf dan ditambahkan etanol absolut dingin dan didiamkan selama 1 malam pada refrigerator. Proses selanjutnya yaitu sentrifugasi protein dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C, buang supernatan yang berisi etanol dengan cara tapping dalam refrigerator sampai etanol habis menguap. Hasil dari proses ini adalah Crude protein yang dapat disimpan dalam deep freeze dengan larutan buffer Tris HCL 0,5 M pH 6,8 (Thomas dkk., 1989 dalam Dos Santos dkk., 2017).

g. Uji Hemaglutinasi

Uji ini merujuk pada metode yang digunakan pada penelitian Li yaitu pengenceran sampel dibuat pada microplate V dengan volume 50 µl. Suspensi

darah mencit dengan konsentrasi 0,5% dimasukkan pada setiap sumur *microplate U* lalu digoyangkan menggunakan *rotator plate* selama 1 menit. Kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 1 jam. Sampel yang diuji adalah *Crude protein* dan protein pili *K. pneumoniae*. Darah yang digunakan adalah darah mencit. Besar titer ditentukan dengan mengamati adanya penggumpalan eritrosit pada pengenceran terendah (Li dkk., 1999 dalam Norsworthy dan Pearson, 2017).

#### h. Isolasi Sel Enterosit Mencit

Mencit yang digunakan adalah mencit strain BALB/C betina, usia 6-8 minggu, berat 25 gram, dan dalam kondisi sehat. Isolasi ini menggunakan metode Weisser Honda. Mencit dianestesi menggunakan kloroform dan diambil bagian usus halus nya. Usus halus mencit dicuci menggunakan PBS pH 7,4 yang mengandung 1 mM *dithiothreitol* pada suhu 4°C. Kemudian usus halus tersebut dimasukkan ke dalam cairan yang berisi 1,55 mM KCL; 9,6 mM NaCl; 8 mM KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 27 mM Na *Citrate* dan 5,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dengan pH 7,4 dan diinkubasi pada *shaking incubator* selama 15 menit pada suhu 37°C. Supernatan dibuang dan jaringan dimasukkan kedalam cairan yang berisi 1,5 mM EDTA dan 0,5 mM *dithiothreitol* dan dikocok kuat selama 5 menit pada suhu 37°C dan supernatan dibuang, hasilnya dicuci dengan PBS dan disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Enterosit diisolasi dengan melakukan suspense pada jaringan dengan menggunakan PBS steril dan dianalisis dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 560 nm sampai konsentrasi 10<sup>6</sup>/ml (Honda dkk., 1988 dalam Baker-Austin dkk., 2017).

#### i. Uji Adhesi

Metode yang digunakan adalah modifikasi Honda. *K. pneumoniae* dibiakkan pada media *lactose broth* dengan suhu 37°C. Kemudian dipanen dengan melakukan sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm dengan suhu 4°C selama 10 menit. Suspensi endapan dengan PBS. Kandungan bakteri dibuat 10<sup>8</sup>/ml menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Selanjutnya sebanyak 500 µl suspensi bakteri diambil untuk masing-masing

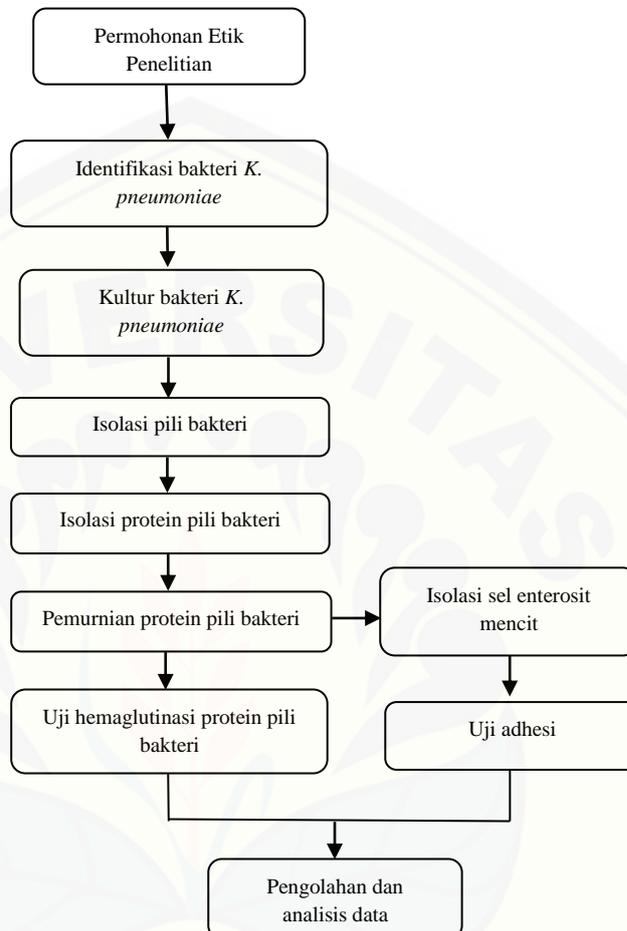
dosis protein pili. Protein pili 38,6 kDa dibuat pengenceran 1/10000, 1/20000, 1/40000, 1/80000, 1/160000, 1/320000 serta kontrol negatif yang tidak diberi protein. Setiap dosis tersebut ditambahkan 500 µl suspensi enterosit mencit. Homogenat tersebut diinkubasi pada *waterbath* dengan digoyang pelan pada suhu 37°C selama 30 menit, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit dan proses sentrifugasi diulangi sebanyak 2 kali. Suspensi diambil sebanyak 10 µl dengan dua kali pengulangan dan dilakukan preparasi dan pewarnaan gram. Kemudian dilakukan penghitungan indeks adhesi menggunakan mikroskop (Honda dkk., 1988 dalam Baker-Austin dkk., 2017).

### 3.9 Analisis Data

Data dianalisis secara deskriptif untuk profil berat molekul protein pili *K. pneumoniae*. Sedangkan data indeks adhesi dan konsentrasi pengenceran yang diperoleh dianalisis lebih lanjut dengan analisis korelasi regresi yang bertujuan untuk mengetahui seberapa erat hubungan antara indeks adhesi dengan konsentrasi pengenceran protein pili 38,6 kDa. Uji korelasi menggunakan korelasi Spearman, merupakan uji non parametrik untuk data yang tidak terdistribusi normal. Hasil uji korelasi dapat diterima dengan tingkat kemaknaan  $p < 0,05$ .

### 3.10 Alur Penelitian

Alur penelitian pada penelitian ini seperti Gambar 3.1



Gambar 3.1 Skema alur penelitian

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan kesimpulan yaitu protein pili dengan berat molekul 38,6 kDa *K. pneumoniae* merupakan protein hemagglutinin dan protein adhesin yang berfungsi sebagai faktor virulensi *K. pneumoniae*.

### 5.2 Saran

Berdasarkan kesimpulan dari hasil penelitian ini, beberapa saran yang dapat diberikan antara lain:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang sifat imunogenik protein pili 38,6 kDa *K. pneumoniae* serta pengembangan antibodi yang akan mencegah protein tersebut
2. Perlu dilakukan penelitian terkait protein pili *K. pneumoniae* yang berasal dari daerah lain terutama Kabupaten Jember, Jawa Timur untuk membandingkan hasil yang telah didapatkan
3. Pada penelitian sejenis selanjutnya, setelah homogenat dicuci menggunakan PBS, sebaiknya diambil dalam jumlah sedikit kemudian dipreparasi dengan pewarnaan Gram dan dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x untuk mengetahui jumlah bakteri yang tidak melekat pada sel enterosit. Jika dirasa masih terlalu banyak jumlah bakteri yang tidak menempel maka bisa dilakukan pengulangan. Penyesuaian jumlah pengulangan harus hati-hati untuk mendapatkan hasil yang memuaskan.

## DAFTAR PUSTAKA

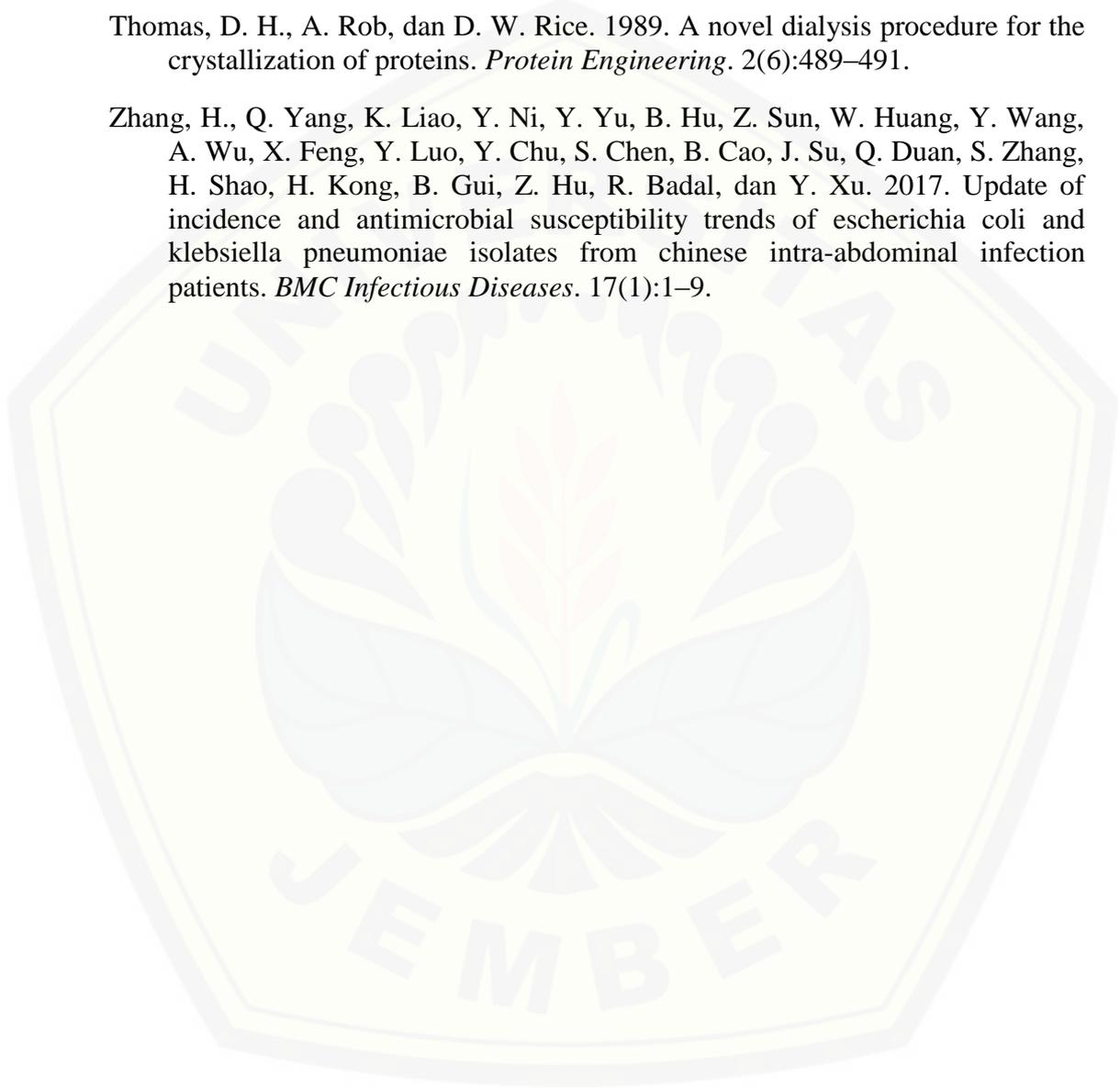
- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, dan S. Pillai. 2013. *Cellular and Molecular Immunology*. Edisi 6. Philadelphia: Saunders elsevier.
- Agustina, D., S. Retoprawiro, dan N. As. 2014. Inhibition of bacterial adhesion on mice enterocyte by the hemagglutinin pili protein 12 , 8 kda klebsiella pneumoniae antibody. *The Journal of Tropical life Science*. 4(1):19–25.
- Agustina, W., L. E. Fitri, T. Yudani, M. Raras, B. Siswanto, dan S. R. Prawiro. 2012. Antibody protein hemagglutinin subunit pili with mw 49 , 8 kda shigella dysenteriae can inhibit shigella dysenteriae adhesion on mice enterocyte. *IOSR Journal of Pharmacy*. 2(5):13–20.
- Akhtar, N., R. Rahman, S. Sultana, dan R. Rahman. 2017. Antimicrobial sensitivity pattern of bacterial pathogens associated with urinary tract infection. *Delta Med Col J*. 5(2):57–62.
- Baker-Austin, C., J. Trinanes, N. Gonzalez-Escalona, dan J. Martinez-Urtaza. 2017. Non-cholera vibrios: the microbial barometer of climate change. *Trends in Microbiology*. 25(1):76–84.
- Berne, C., D. Adrien, G. G. Hardy, dan B. Yves V. 2015. Adhesins involved in attachment to abiotic surface by gram-negative bacteria. *Microbiol Spectr*. 3(4):1–45.
- Brooks, B. W., C. M. Foran, S. Richards, J. Weston, P. K. Turner, J. K. Stanley, K. Solomon, M. Slattery, L. Point, dan B.w. 2003. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. Edisi 25. San Francisco: McGraw Hill. / *Chemosphere*.
- Brown, T. 2017. SDS-page (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). *International Journal of Science and Research*. 91:399–404.
- Dahlan, M. S. 2015. *Statistik Untuk Kedokteran Dan Kesehatan*. Edisi 6th. Jakarta: salemba medica.
- Dahlberg, S., S. Normark, B. Henriques-normark, K. A. Kline, dan S. Fa. 2009. *Review Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions*. Edisi 1. USA: Elsevier Inc. *Cell Host & Microbe*.
- Darmawati, S., B. Santosa, dan D. Indonesia. 2018. Aktivitas hemagglutinas protein pilli salmonella typhi terhadap eritrosit manusia dan domba. *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus*. 1:86–90.

- Di Martino, P., N. Cafferini, B. Joly, dan A. Darfeuille-michaud. 2003. Klebsiella pneumoniae type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in Microbiology*. 154:9–16.
- Dos Santos, R., A. L. Carvalho, dan A. C. A. Roque. 2017. Renaissance of protein crystallization and precipitation in biopharmaceuticals purification. *Biotechnology Advances*. 35(1):41–50.
- Ehara, M., M. Ishibashi, Y. Ichinose, M. Iwanaga, S. Shimotori, dan T. Naito. 1987. Purification and partial characterization of fimbriae of vibrio cholerae o1. *Butterworth & Co*. 5(December):283–288.
- 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.
- Fitrawati, F., M. H. Wibowo, S. Amanu, dan B. Sutrisno. 2015. Isolasi dan identifikasi egg drop syndrome virus dengan uji hemaglutinasi dan hemaglutinasi inhibisi. *Sain Veteriner*. 33(1):59–68.
- Flores-mireles, A. L., J. N. Walker, M. Caparon, dan S. J. Hultgren. 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Publishing Group*. 13(5):269–284.
- Gonza ´lez, R., C. Di ´az, M. Marino, R. Cloralt, M. Pequeneze, dan I. Pe ´rez-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.
- Gorrie, C. L., M. Mirceta, R. R. Wick, D. J. Edwards, N. R. Thomson, R. A. Strugnell, N. Pratt, J. Garlick, K. Watson, D. Pilcher, S. McGloughlin, D. W. Spelman, A. W. J. Jenney, dan K. E. Holt. 2017. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of k. pneumoniae infection in intensive care patients. *Communication in Medical Care*. 1(1):xi–xiii.
- Harada, S. dan Y. Doi. 2018. Hypervirulent klebsiella pneumoniae: a call for consensus definition and international collaboration. *American Society for Microbiology*. 9(June):45.
- 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.
- Honda, T., Y. Ni, dan T. Miwatani. 1988. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of kanagawa phenomenon-negative vibrio parahaemolyticus and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*. 56(4):961–965.

- Juwita, U., Y. Haryani, dan C. Jose. 2005. Jumlah bakteri coliform dan deteksi escherichia coli pada daging ayam di pekanbaru. *JOM FMIPA*. 1(2):48–55.
- Kazimoto, T., S. Abdulla, L. Bategereza, O. Juma, F. Mhimbira, M. Weisser, J. Utzinger, L. von Müller, dan S. L. Becker. 2018. Causative agents and antimicrobial resistance patterns of human skin and soft tissue infections in bagamoyo, tanzania. *Acta Tropica*. 186:102–106.
- Khan, L. B., S. Swift, T. Kamal, dan H. M. Read. 2018. Tips & tools simulation of microbact strip assay using colored liquids to demonstrate identification of unknown gram-negative organisms. *Journal of Microbiology & Biology Education*. 19(2):19–22.
- Khater, F., D. Balestrino, N. Charbonnel, J. F. Dufayard, S. Brisse, dan C. Forestier. 2015. In silico analysis of usher encoding genes in klebsiella pneumoniae and characterization of their role in adhesion and colonization. *PLoS ONE*. 10(3):1–24.
- Koroglu, M., A. Ozbek, T. Demiray, T. Hafizoglu, E. Guclu, dan M. Altindis. 2015. Investigation of clonal relationships of k. pneumoniae isolates from neonatal intensive care units by pfge and rep-pcr. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 9(1):829–836.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*. 227:680–685.
- Leboffe, M. J. dan B. E. Pierce. 2011. *A Photographic Atlas for The Microbiology Laboratory*. Edisi 4th. USA: Morton Publishing Company.
- Letourneau, J., C. Levesque, F. Berthiaume, M. Jacques, dan M. Mourez. 2011. In vitro assay of bacterial adhesion onto mammalian epithelial cells. *Journal of Visualized Experiments*. 1(51):3–6.
- Li, B., Y. Zhao, C. Liu, Z. Chen, dan D. Zhou. 2014. Molecular pathogenesis of klebsiella pneumoniae. - pubmed - ncbi. *Future Microbiol*. 9:1071–1081.
- Li, X. I. N., 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.
- Lin, W. H., C. Y. Kao, D. C. Yang, C. C. Tseng, A. B. Wu, C. H. Teng, M. C. Wang, dan J. J. Wu. 2014. Clinical and microbiological characteristics of klebsiella pneumoniae from community-acquired recurrent urinary tract infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 33(9):1533–1539.
- Ling, J. M., Y.-W. Hut, dan G. L. French. 1988. Evaluation of the microbact-24e bacterial identification system. *J Clin Pathol*. 41(March):910–914.

- Littlea, M. L., X. Qin, D. M. Zerra, dan S. J. Weissmana. 2014. Molecular epidemiology of colonizing and disease-causing. *Journal of Medical Microbiology Papers in Press*. 9(206):19.
- Norsworthy, A. N. dan M. M. Pearson. 2017. From catheter to kidney stone: the uropathogenic lifestyle of proteus mirabilis. *Trends in Microbiology*. 25(4):304–315.
- Nurhidayati, S., Faturrahman, dan M. Ghazali. 2015. Deteksi bakteri patogen yang berasosiasi dengan kappaphycus. *Jurnal Sains Teknologi dan Lingkungan*. 1(2):24–30.
- Parslow, T. G., D. P. Stites, A. i Terr, dan J. . Imboden. 2001. *Medical Immunology*. Edisi 10th. USA: Mc Graw Hill.
- Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. 2014. *Pneumonia Komunitas*. Edisi 2. Jakarta: Medicine Faculty of Indonesia University.
- Podmirseg, S. R., H. Jäkel, G. D. Ranches, M. K. Kullmann, B. Sohm, A. Villunger, H. Lindner, dan L. Hengst. 2016. Caspases uncouple p27kip1 from cell cycle regulated degradation and abolish its ability to stimulate cell migration and invasion. *Oncogene*. 35(35):4580–4590.
- Post, K. . dan G. Songer. 2005. *Microbiology Bacterial and Fungal Agent of Animal Disease*. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Roy, S. dan V. Kumar. 2012. A practical approach on sds page for separation of protein. *International Journal of Science and Research (IJSR) ISSN (Online Impact Factor)*. 3(8):2319–7064.
- Savage, G. P. 2003. *Hemagglutinins (haemagglutinins)*. Academic Press
- Soemarno, U. Yanuhar, M. Widodo, dan B. Sumitra. 2002. Molecular Weight of Reseptor Salmonella Thyphosa at Culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). Malang: Maj. Kedok. Unibraw. April 2002. Halaman 9–13.
- Stahlhut, S. G., C. Struve, dan K. A. Krogfelt. 2012. Klebsiella pneumoniae type 3 fimbriae agglutinate yeast in a mannose-resistant manner. *Journal of Medical Microbiology*. 61(3):317–322.
- Sumarno, R. P., A. S. Avanita, S. Winarsih, S. Hidayat, dan D. Y. Nurhidayati. 2015. Haemagglutination of shigella dysenteriae subunit pili protein with anti-haemagglutination of s. dysenteriae subunit pili protein as a molecule adhesion in mouse enterocyte. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(5):1275–1276.

- Sutandhio, S., L. Alimsardjono, dan M. I. Lusida. 2015. *Distribusi dan Pola Kepekaan Enterobacteriaceae dari Spesimen Urin di RSUD DR. Soetomo Surabaya Periode Januari – Juni 2015*
- Syahputra, R. R. I. 2018. *Pola Kepekaan Bakteri Terhadap Antibiotik Pada Pasien Infeksi Saluran Kemih Di RSD DR. Soebandi Jember*. Jember University.
- Thomas, D. H., A. Rob, dan D. W. Rice. 1989. A novel dialysis procedure for the crystallization of proteins. *Protein Engineering*. 2(6):489–491.
- Zhang, H., Q. Yang, K. Liao, Y. Ni, Y. Yu, B. Hu, Z. Sun, W. Huang, Y. Wang, A. Wu, X. Feng, Y. Luo, Y. Chu, S. Chen, B. Cao, J. Su, Q. Duan, S. Zhang, H. Shao, H. Kong, B. Gui, Z. Hu, R. Badal, dan Y. Xu. 2017. Update of incidence and antimicrobial susceptibility trends of escherichia coli and klebsiella pneumoniae isolates from chinese intra-abdominal infection patients. *BMC Infectious Diseases*. 17(1):1–9.



**Lampiran 3.1 Lembar Persetujuan Etik (*Ethical Clearance*)**

 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 : 1.271/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 PROTEIN PILI 27,7 kDa *Klebsiella pneumonia* SEBAGAI PROTEIN HEMAGLUTININ DAN ADHESIN YANG BERFUNGSI SEBAGAI FAKTOR VIRULENSI**

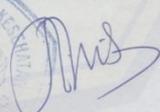
Nama Peneliti Utama : Regina Finka Dita  
*Name of the principal investigator*

NIM : 152010101094

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

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

Jember, 18-12-2018  
Ketua Komisi Etik Penelitian

  
dr. Rini Riyanti, Sp.PK

**Tanggapan Anggota Komisi Etik**

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

*Review Proposal :*

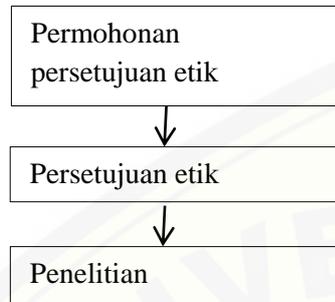
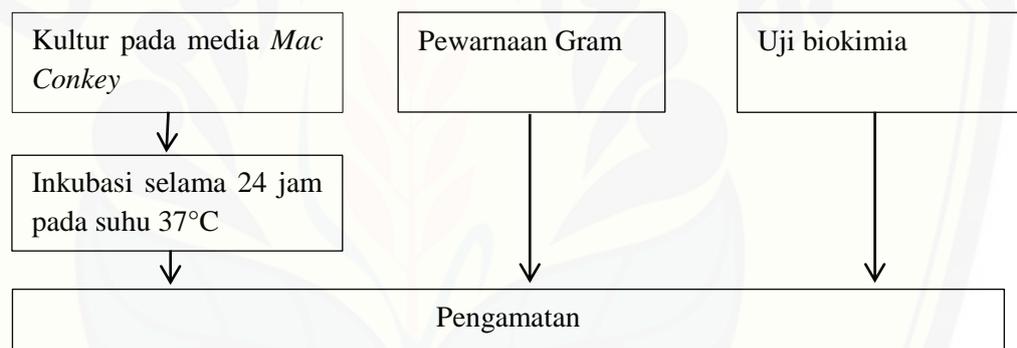
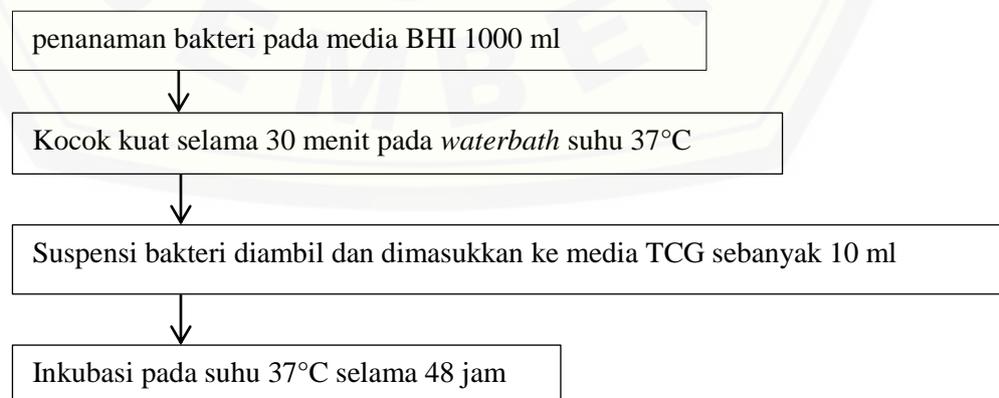
- Penelitian dapat dilanjutkan dengan melengkapi :
- penggunaan APD pd penelitian serta tatacara pembuangan limbah mikrobiologi
  - Dilengkapi dengan SOP sebagai lampiran penelitian :
    - a. SOP Identifikasi dan isolasi bakteri *K. pneumoniae*
    - b. SOP Kultur bakteri *K. pneumoniae*
    - c. SOP inokulasi pili bakteri *K. pneumoniae*
    - d. SOP isolasi protein pili *Balut. K. pneu.*
    - e. SOP Pemurnian protein pili
    - f. SOP Uji hemaglutinasi
    - h. SOP isolasi sel enterosit menci
    - g. SOP Uji adhen

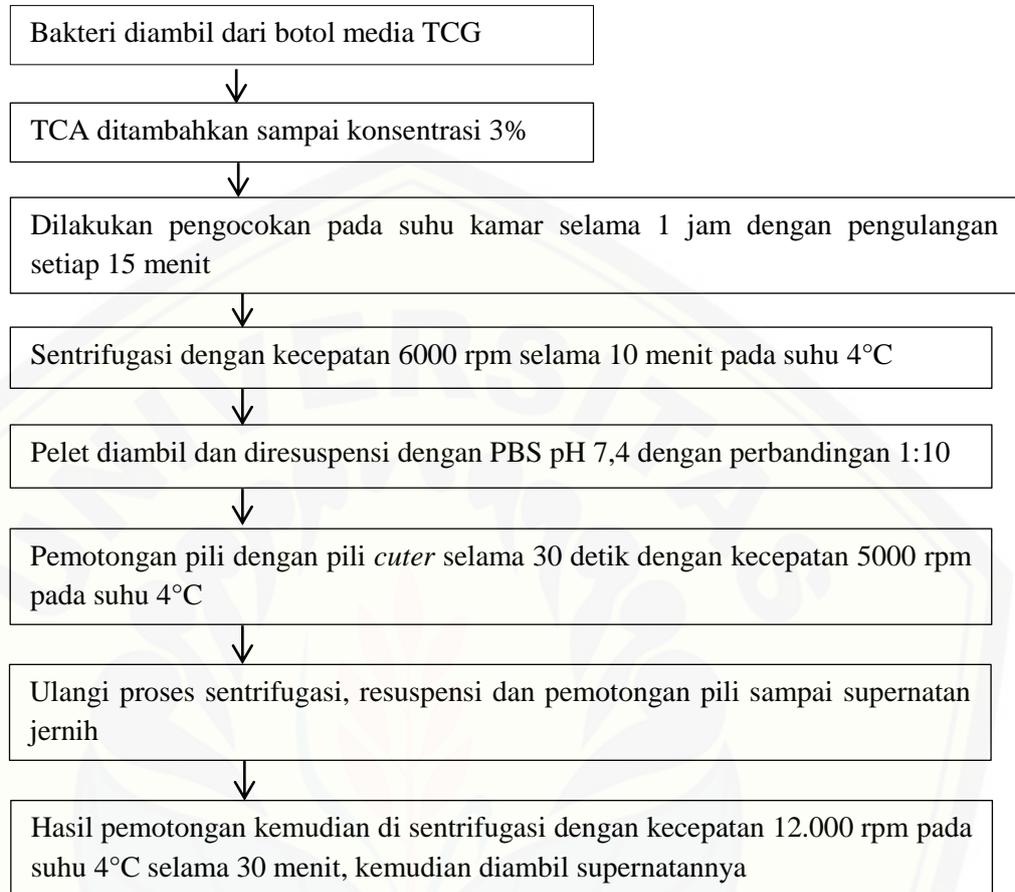
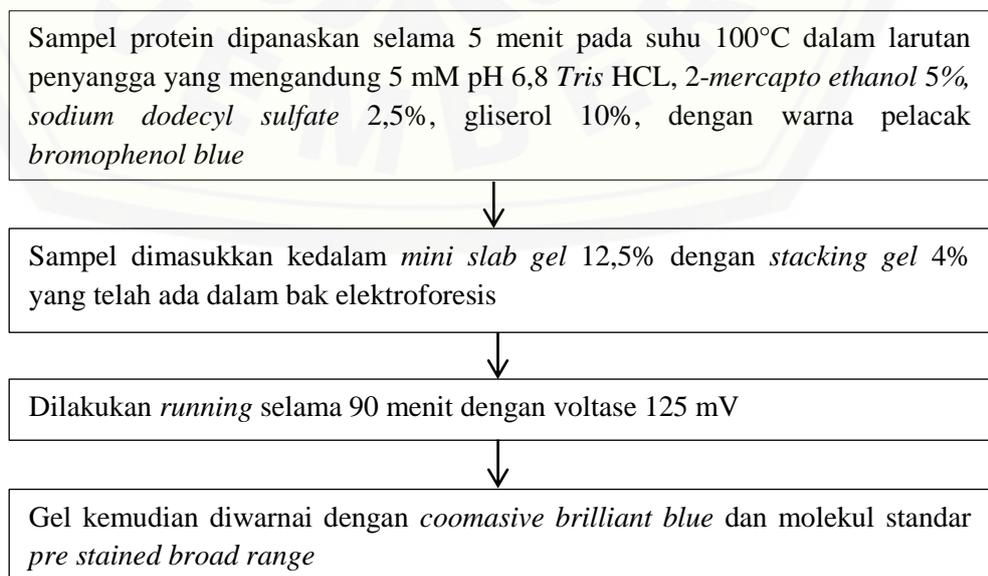


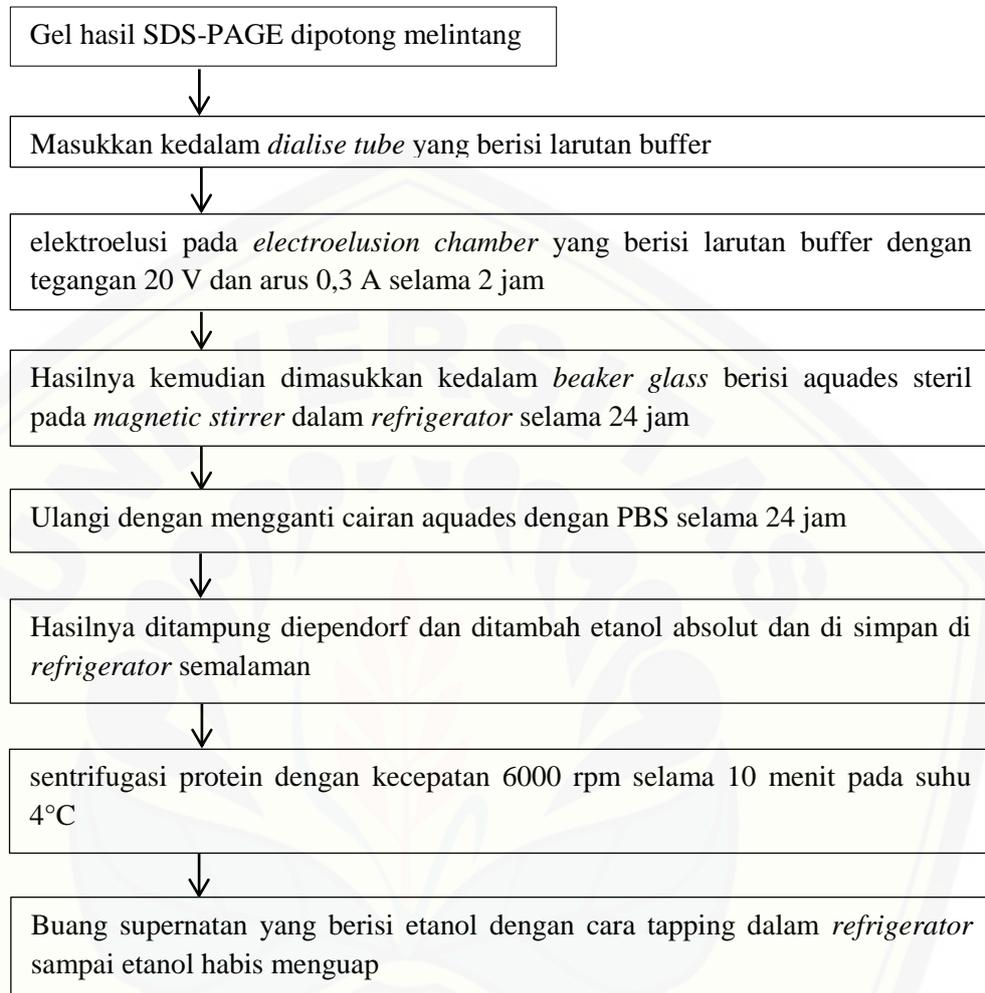
Nama : dr. Rini Riyanti, Sp.PK

**Lampiran 3.2 Prosedur Penelitian**

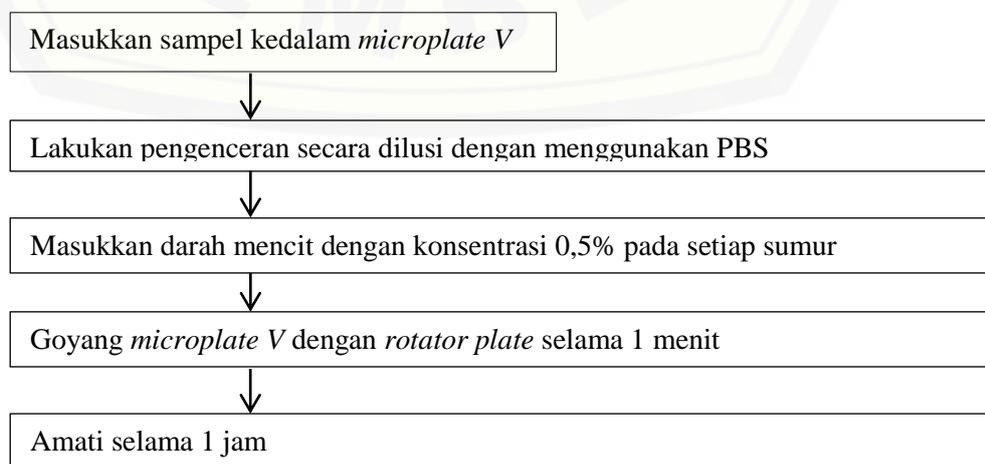
## a. Uji Kelayakan Etik

b. Identifikasi dan Isolasi Bakteri *Klebsiella pneumoniae*c. Kultur Bakteri *Klebsiella pneumoniae*

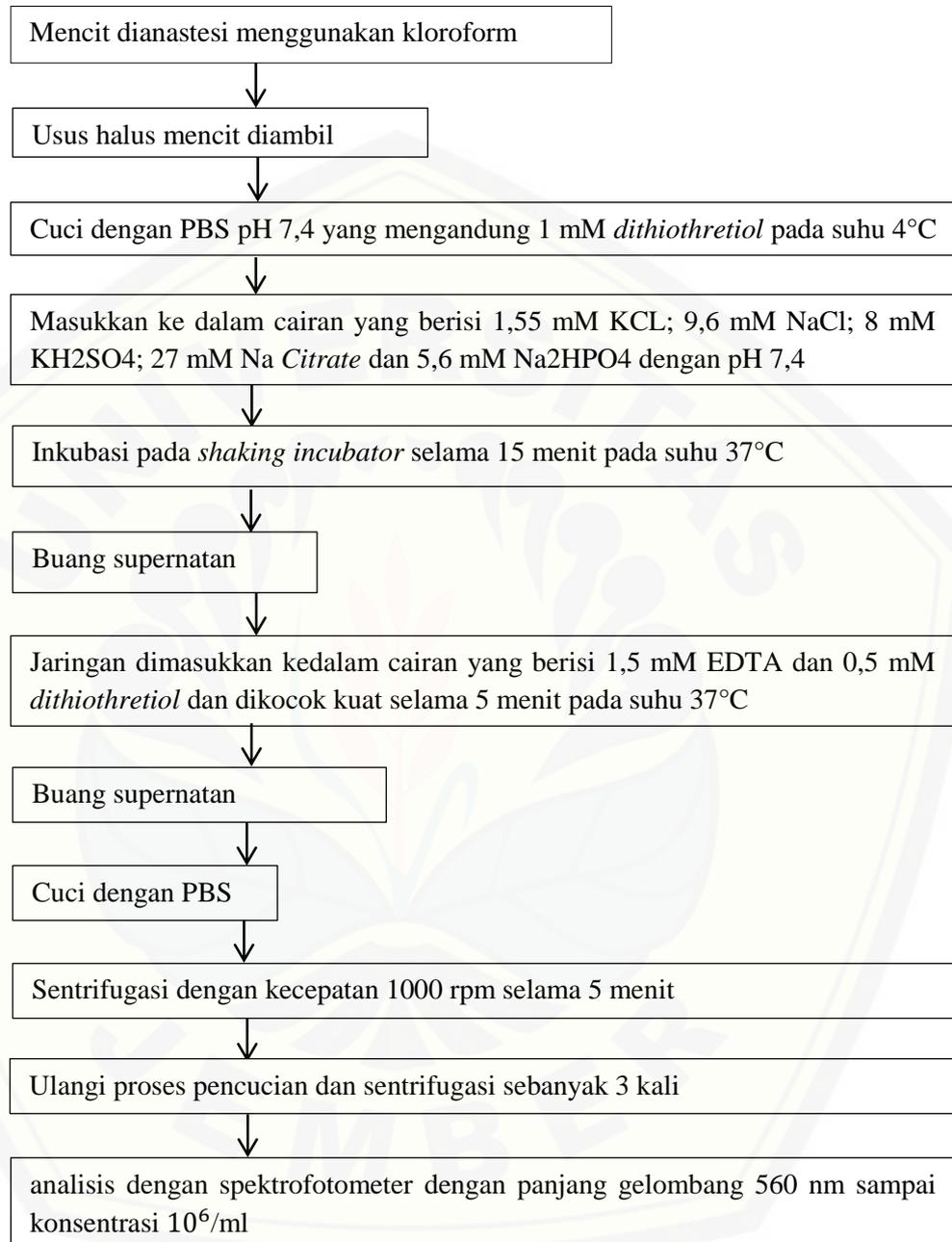
d. Isolasi Pili Bakteri *Klebsiella pneumoniae*e. Isolasi Protein Pili Bakteri *Klebsiella pneumoniae* (SDS-PAGE)

f. Pemurnian Protein Pili Bakteri *Klebsiella pneumoniae*

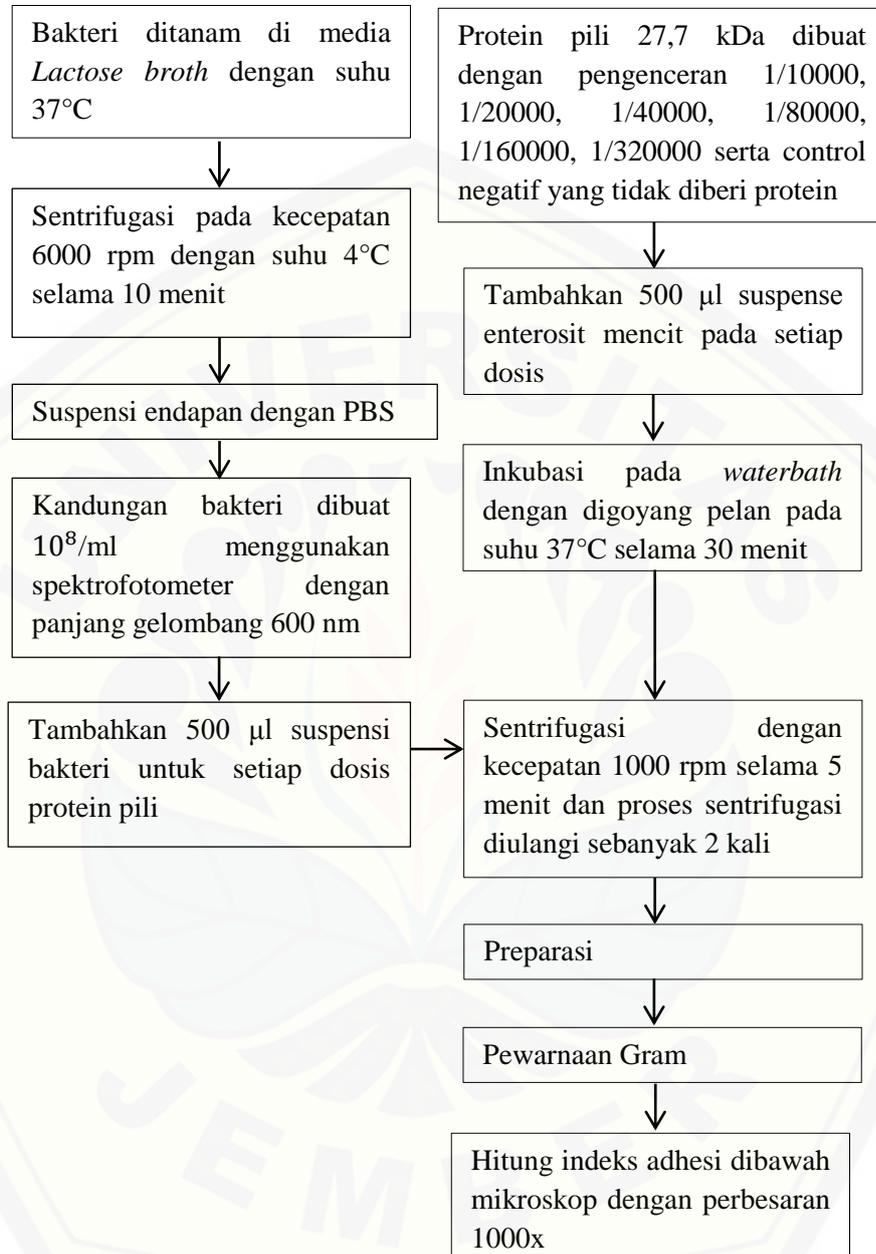
## g. Uji Hemaglutinasi



## h. Isolasi Sel Enterosit Mencit



## i. Uji Adhesi



### Lampiran 3.3 Penggunaan Alat Pelindung Diri (APD) dalam Penelitian

Alat pelindung diri yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

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

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

- a. Laminar yang sinar UV didalamnya dihidupkan selama 30 menit sebelum pemakaian. Selama penelitian prosedur penelitian dilakukan didalam laminar sehingga mencegah penyebaran bakteri di ruang laboratorium.
- b. Bunsen, meskipun telah menggunakan laminar, peneliti tetap menggunakan bunsen dalam laminar untuk lebih memastikan terhindarnya penyebaran bakteri selama penelitian.

### Lampiran 3.4 Tata Cara Pembuangan Limbah Mikrobiologi Penelitian

Pembuangan limbah mikrobiologi termasuk media agar maupun cair yang telah ditanam bakteri akan dilakukan sebagai berikut:

- a. Media yang telah ditanam bakteri dan tidak terpakai akan di autoclave selama 1 jam
- b. Media tersebut kemudian ditaruh pada kaleng alumunium untuk mencegah perembesan
- c. Kemudian kaleng tersebut dimasukkan kedalam tanah yang telah digali sampai dapat menutupi kaleng
- d. Bagian dalam kaleng kemudian dibakar sampai mengering dan ditutup
- e. Lalu 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 sudah dipakai untuk 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 menampung pada tas kresek kemudian setiap hari petugas bagian umum dan perlengkapan FK UNEJ akan mengambil sampah tersebut untuk selanjutnya di proses dengan menggunakan *incinerator*.

**Lampiran 4.1 Hasil Uji Statistik Data Uji Adhesi**

**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Indeks Adhesi	.365	7	.005	.671	7	.002

a. Lilliefors Significance Correction

**Tests of Normality (Transformasi)**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Transform_P2	.303	7	.052	.767	7	.019

a. Lilliefors Significance Correction

**Correlations**

		Titer Pengenceran		Indeks Adhesi	
Spearman's rho	Titer Pengenceran	Correlation Coefficient	1.000		-.964**
		Sig. (2-tailed)	.		.000
		N	7		7
	Indeks Adhesi	Correlation Coefficient		-.964**	1.000
		Sig. (2-tailed)		.000	.
		N		7	7

\*\* . 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	.508 <sup>a</sup>	.258	.109	506.1323230

a. Predictors: (Constant), Titer Pengenceran

**ANOVA<sup>a</sup>**

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	445020.232	1	445020.232	1.737	.245 <sup>b</sup>
	Residual	1280849.642	5	256169.928		
	Total	1725869.874	6			

a. Dependent Variable: Indeks Adhesi

b. Predictors: (Constant), Titer Pengenceran

**Coefficients<sup>a</sup>**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	808.555	245.565		3.293	.022
	Titer Pengenceran	-7427725.431	5635468.636	-.508	-1.318	.245

a. Dependent Variable: Indeks Adhesi