

ARTIKEL PENELITIAN

Faktor Virulensi *Outer Membrane Protein* 20 kDa *Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin

Dini Agustina,^{1*} Kirana Nadyatara,² Diana C. Mufida,¹ Ulfa Elfiah,³
Muhammad A. Shodikin,¹ Enny Suswati¹

¹Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember, Jember, Indonesia

²Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember, Jember, Indonesia

³Departemen Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Jember, Indonesia

*Penulis Korespondensi: dini_agustina@unej.ac.id

Diterima 31 Januari 2019; Disetujui: 28 Desember 2019

DOI: 10.23886/ejki.7.10425.

Abstrak

Klebsiella pneumoniae adalah bakteri batang gram negatif yang merupakan patogen sangat infeksius. Mekanisme virulensi *K. pneumoniae* masih belum sepenuhnya diketahui terutama kemampuannya sebagai protein hemagglutinin dan protein adhesin. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui peran outer membrane protein (OMP) 20 kDa bakteri *K. pneumoniae* sebagai protein hemagglutinin dan adhesin. Penelitian ekperimental ini dilakukan pada bulan Oktober – Desember 2018 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Fakultas MIPA Universitas Jember. Dilakukan identifikasi berat molekul OMP dengan 12,5% SDS-PAGE. OMP dengan berat molekul 20 kDa yang diperoleh kemudian digunakan untuk uji hemagglutinasia dan uji adhesi. Hasil penelitian didapatkan OMP 20 kDa *K. pneumoniae* merupakan protein hemagglutinin dan protein adhesin. Analisis dengan korelasi Pearson menunjukkan terdapat hubungan antara dosis OMP 20 kDa *K. pneumoniae* dengan indeks adhesi ($p = 0,029$; $R = -0.562$).

Kata kunci: *Klebsiella pneumoniae*, OMP, hemagglutinin, adhesin.

Virulence factor of 20 kDa Outer Membrane Protein (OMP) *Klebsiella pneumoniae* as Haemagglutinin and Adhesin Protein**Abstract**

Klebsiella pneumoniae is a Gram-negative rod bacterium, which is an exceptionally infectious pathogen. The mechanism of virulence of *K. pneumoniae* is still not fully known, especially its ability as a hemagglutinin protein and adhesin protein. The purpose of this study was to determine the role of the outer membrane protein (OMP) of 20 kDa *K. pneumoniae* bacteria as hemagglutinin and adhesin protein. This experimental research conducted in October - December 2018 in the Microbiology Laboratory of the Faculty of Medicine and the Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Jember. Outer membrane protein molecular weight identified with 12.5% SDS-PAGE. The OMP with a molecular weight of 20 kDa obtained then used for hemagglutination and adhesion tests. The results showed that 20 kDa *K. pneumoniae* OMP is a hemagglutinin protein and adhesin protein. Analysis with Pearson correlation shows there is a relationship between the OMP dose of 20 kDa *K. pneumoniae* and adhesion index ($p = 0.029$; $R = -0.562$).

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, OMP, hemagglutinin, adhesion.

Pendahuluan

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri batang gram negatif yang menyebabkan berbagai penyakit seperti pneumonia, infeksi saluran kemih, infeksi nosokomial, rhinitis ozaena, dan rhinoskleroma. *K. pneumoniae* adalah penyebab terbanyak pneumonia komunitas maupun pneumonia nosokomial.^{1,2} Di Indonesia, bakteri tersebut juga dilaporkan sebagai penyebab penyakit pneumonia terbanyak. Hal tersebut diketahui dari hasil identifikasi sputum pada pasien pneumonia di beberapa rumah sakit di Indonesia.³

K. pneumoniae memiliki tingkat resistensi cukup tinggi terhadap beberapa antibiotik sehingga pengobatan masih sangat terbatas. Tingginya resistensi karena *K. pneumoniae* memiliki kapsul, protein adhesin (fimbrial adhesin dan afimbrial adhesin), lipopolisakarida (LPS), resistensi serum, dan siderofor yang berperan dalam mekanisme virulensi.

Faktor-faktor virulensi yang dimiliki *K. pneumoniae* juga terlibat dalam proses kolonisasi di permukaan mukosa kemudian menetap di dalamnya dan menyebabkan infeksi.^{4,5} Dinding luar *K. pneumoniae* tersusun atas tiga unsur yaitu LPS, peptidoglikan, dan *outer membrane protein* (OMP) yang termasuk afimbrial adhesin dan merupakan komponen penting dalam proses adhesi dan invasi ke sel *hospes*. Selain itu, protein permukaan tersebut memiliki daya lekat di *hospes* lebih kuat dibandingkan dengan pili dan memiliki kemampuan untuk menggumpalkan sel darah merah (hemaglutinasi). OMP juga ikut memperkuat *K. pneumoniae* melawan beberapa antibiotik sehingga bakteri tersebut resisten terhadap antibiotik.^{4,6-8} Tujuan penelitian ini adalah mengetahui peran OMP 20 kDa bakteri *K. pneumoniae* sebagai protein hemaglutinin dan adhesin.

Metode

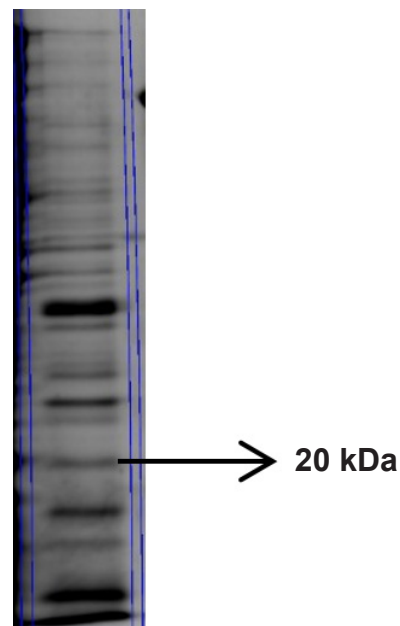
Penelitian analitik observasional ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Penelitian dilakukan pada bulan Oktober–Desember 2018. Sampel penelitian adalah OMP yang didapat dari isolat bakteri *K. pneumoniae*. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah berat molekul OMP 20 kDa *K. pneumoniae* dan titer pengenceran; variabel terikat adalah aglutinasi darah mencit dan indeks adhesi.

Penelitian dilakukan melalui beberapa tahap yaitu identifikasi dan kultur *K. pneumoniae* yang

diperoleh dari sputum pasien dari isolat malang yang terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, isolasi OMP *K. pneumoniae*, identifikasi berat molekul OMP bakteri dengan elektroforesis (SDS-PAGE), pemurnian OMP bakteri *K. pneumoniae*, uji hemaglutinasi, isolasi sel enterosit mencit, dan uji adhesi. Untuk mengetahui protein hemaglutinin pada OMP 20 kDa *K. pneumoniae* sebagai protein hemaglutinin dan adhesin, dilakukan analisis deskriptif dan uji korelasi-regresi untuk mengetahui hubungan indeks adhesi dengan konsentrasi OMP 20 kDa dengan batas signifikansi 0,05 ($p < 0,05$).^{9,10}

Hasil

Hasil identifikasi *K. pneumoniae* dengan mikroskop pembesaran 1000x menunjukkan morfologi bakteri berbentuk batang dan berwarna merah. Bakteri tersebut dikultur di media BHI *broth* dan TCG *Agar* selama 48 jam lalu dipanen dan dilakukan isolasi OMP. Dilakukan elektroforesis OMP menggunakan SDS-PAGE untuk mengetahui berat molekul protein (Gambar 1).



Gambar 1. Profil *K. pneumoniae* Hasil Elektroforesis SDS-PAGE

Terdapat beberapa *band* berat molekul OMP yang menonjol dari hasil *profiling* protein menggunakan elektroforesis SDS-PAGE, yaitu OMP dengan berat molekul 32 kDa, 23 kDa, 20 kDa, 17 kDa, dan 12 kDa. Protein yang digunakan untuk isolasi adalah OMP dengan berat molekul 20 kDa. Protein 20 kDa pada gel tersebut dipotong dan dimurnikan secara elektroelusi dan dialisis

sehingga diperoleh protein murni. OMP yang telah dimurnikan digunakan untuk uji hemaglutinasi

pada sel darah merah mencit dengan hasil seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Hemaglutinasi OMP 20 kDa *K. pneumoniae*

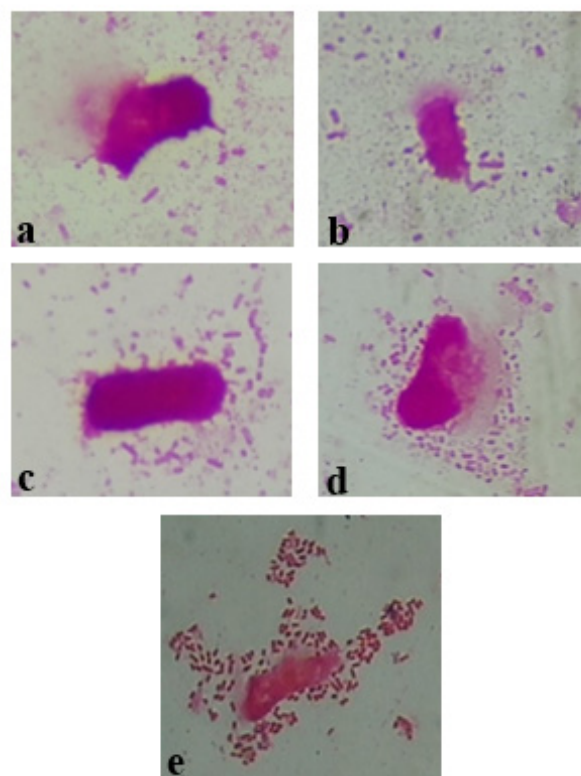
Sel darah merah mencit	Konsentrasi									
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
OMP 20 kDa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+ : OMP 20 kDa mampu mengaglutinasi eritrosit mencit

Tabel 1 menunjukkan bahwa OMP 20 kDa mampu mengaglutinasi sel darah merah mencit sampai pada pengenceran 1/16 sehingga disebut sebagai protein hemaglutinin. Uji hemaglutinasi dilanjutkan dengan uji adhesi di sel enterosit mencit pada dosis 0 (kontrol), 1/10, 1/100, 1/1000, dan 1/10000. Hasil uji adhesi kelompok kontrol menunjukkan gambaran bakteri menempel di sel enterosit mencit lebih banyak dibandingkan kelompok yang diberikan OMP. Pengamatan uji adhesi menggunakan mikroskop perbesaran

1000x seperti pada Gambar 2.

Keterlibatan OMP dengan berat molekul 20 kDa dalam menghambat perlekatan *K. pneumoniae* pada sel enterosit mencit terlihat pada Gambar 2 (a-d). Berkurangnya jumlah bakteri yang menempel pada sel enterosit mencit setelah ditambahkan dengan OMP 20 kDa menunjukkan bahwa OMP mampu menghambat bakteri dalam perlekatan pada sel enterosit mencit. Indeks adhesi *K. pneumoniae* di sel enterosit mencit tertera di Tabel 2.



Gambar 2. Uji Adhesi OMP 20 kDa di Sel Enterosit Mencit. Hasil uji adhesi dilakukan pewarnaan Gram dan diamati pada perbesaran 1000x dengan dosis (a) 1/10; (b) 1/100; (c) 1/1000; (d) 1/10000; (e) kontrol

Tabel 2. Indeks Adhesi *K. pneumoniae* di Sel Enterosit Mencit

Pengulangan	Pengenceran				
	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{10000}$	0
I	238	476	700	922	1700
II	300	436	598	908	1833
III	265	470	626	924	1821

Dari uji korelasi Spearman didapatkan nilai $p=0,029$ dan $R=-0,562$. Koefisien korelasi $-0,562$ berarti bahwa dosis OMP dengan indeks adhesi yang memiliki hubungan kuat dengan arah hubungan yang negatif. Uji korelasi dilanjutkan dengan uji regresi linier dengan nilai $R=0,562$ yang menunjukkan hubungan antar variabel yang kuat, sedangkan $R^2=0,316$ berarti 31,6% dosis OMP 20 kDa memengaruhi indeks adhesi.

Diskusi

K. pneumoniae adalah bakteri gram negatif berwarna merah, termasuk Enterobacteria-ceae. Di permukaan bakteri terdapat struktur yang membantu proses adhesi di sel hospes yaitu fimbrial adhesin (pili) dan afimbrial adhesin (OMP). Faktor adhesi dapat menginduksi pembentukan IgG seperti pada protein hemagglutinin pili *K. pneumoniae* 12,8 kDa.¹²⁻¹⁴

Proses adhesi merupakan proses penting dalam inisiasi dan perkembangan gejala klinis penyakit. Kemampuan bakteri melakukan adhesi ditandai protein hemagglutinin yang mampu menggumpalkan eritrosit mamalia. Hemagglutinasin dan hemolisis sel darah merah dianggap fitur karakteristik beberapa spesies bakteri terutama yang termasuk keluarga Enterobacteriaceae seperti *K. pneumoniae*. Untuk mendeteksi protein hemagglutinin dilakukan uji hemagglutinasin menggunakan darah mencit atau darah manusia. Sebagian kecil *K. pneumoniae* dapat menghemagglutinasin semua golongan darah manusia sehingga pada penelitian ini digunakan darah mencit.^{7,15}

Uji hemagglutinasin (HA) pada OMP 20 kDa mampu mengagglutinasin sel darah merah mencit hingga pengenceran 1/16, sehingga OMP 20 kDa *K. pneumoniae* dapat disebut sebagai protein hemagglutinin. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian Saraswati¹⁷ pada OMP 23 kDa *K. pneumoniae* dan Agustina et al⁷ pada pili 12,8 kDa yang menunjukkan titer HA 1/4 dan 1/256. Metode ini bergantung pada partikel mikroorganisme menyerap sel darah merah. Dengan tidak adanya

partikel dari mikroorganisme (bakteri), maka sel darah merah mengendap akibat gaya gravitasi ke dasar sumur, sehingga menimbulkan titik berwarna merah berbentuk kerucut yang jelas dalam sumuran. Sebaliknya jika terdapat partikel bakteri, sel darah merah akan menggumpal sebagai hasil interaksi antara protein hemagglutinin dari partikel tersebut dan sel darah merah, yang menyebabkan tidak terbentuknya titik merah dalam sumuran. Untuk melakukan uji HA, pengenceran dilusi/serial (dua kali lipat) dari sampel yang mengandung OMP 20 kDa dimasukkan ke masing-masing sumuran dari pelat mikrotiter 96-well, kemudian alikot sel darah merah ditambahkan.^{6,16}

Uji adhesi dilakukan untuk mengidentifikasi kemampuan OMP 20 kDa sebagai protein adhesin. Pada Gambar 2 (e) terlihat banyak bakteri menempel di sel enterosit mencit dibandingkan Gambar 2 (a-d). Hal tersebut disebabkan pada kelompok kontrol, sel enterosit mencit tidak ditambahkan OMP sehingga bakteri tidak memiliki kompetitor dalam melakukan perlekatan di reseptor sel enterosit.

Pada kelompok perlakuan, sel enterosit mencit telah ditambahkan OMP sesuai dosis yang ditentukan sehingga bakteri saling berkompetisi dengan OMP dalam melakukan perlekatan di reseptor sel enterosit. Pada Gambar 2 (a), bakteri menempel di sel enterosit lebih sedikit dari pada Gambar 2 (b) dan seterusnya. Pada Tabel 2 tampak bahwa semakin besar dosis OMP 20 kDa yang diberikan pada sel enterosit mencit semakin sedikit bakteri yang menempel di sel enterosit mencit. Hal tersebut disebabkan reseptor di sel enterosit mencit telah dijenuhi oleh OMP 20 kDa, sehingga semakin banyak reseptor yang telah jenuh oleh OMP dan semakin sedikit bakteri yang menempel di sel enterosit mencit.

Berdasarkan uji adhesi, didapatkan hasil secara empiris bahwa OMP molekul 20 kDa berperan sebagai protein adhesin. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan Suswati et al⁶ pada OMP 35 kDa *Proteus mirabilis*, Mufida¹¹

pada bakteri OMP 55 kDa *Salmonella typhi*, dan Lestari et al¹⁸ pada OMP 35,7 kDa *Shigella dysenteriae* yang hasilnya semua protein tersebut berperan sebagai protein hemagglutinin dan protein adhesin.

Terdapat korelasi kuat antara dosis OMP yang diberikan dengan indeks adhesi, dan terdapat perbedaan bermakna antara jumlah bakteri yang melekat di sel enterosit yang tidak ditambahkan OMP 20 kDa (kontrol) dengan jumlah bakteri yang melekat di sel enterosit yang ditambahkan OMP 20 kDa. Hasil penelitian tersebut serupa dengan penelitian Agustina et al⁷ pada protein pili 12,8 kDa *K. Pneumoniae* dengan hasil titer pengenceran antibodi dengan indeks adhesi ($p=0,032$) dan koefisien korelasi $-0,797$.

Kesimpulan

Bakteri *K. pneumoniae* memiliki OMP dengan berat molekul 20 kDa yang berperan sebagai protein hemagglutinin dan protein adhesin.

Daftar Pustaka

1. Johnson AG, Ziegler RJ, Hawley L. Essential mikrobiologi dan imunologi. Edisi Kelima. Jakarta: Binarupa Aksara; 2011.
2. March C, Moranta D, Regueiro V, Llobet E, Tomas A, Garmendia J, et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein A is required to prevent the activation of airway epithelial cells. J Biol Chem. 2011;286:9956–67.
3. Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. Pedoman diagnosis dan penatalaksanaan di Indonesia. Edisi Pneumonia Komuniti II. Jakarta: PDPI; 2014.
4. Pertiwi W, Sartono TR, Sumarno, Adi S. Sensitivitas dan spesifisitas metode dot blot menggunakan antigen outer membrane protein *Klebsiella pneumoniae* yang direspons sekretory-immunoglobulin A sputum penderita terinfeksi *Klebsiella pneumoniae*. Jurnal Respirologi Indonesia. 2009;29:1-15.
5. Agustina D. Respons imunoglobulin G terhadap protein hemagglutinin pili *Klebsiella pneumoniae* berat molekul 12,8 kDa sebagai protein adhesin [tesis.] Malang: Universitas Brawijaya; 2013.
6. Suswati E, Mufida DC. Protein haemagglutinin outer membran protein (OMP) 35 kDa sebagai protein adhesin *Proteus mirabilis* pada vesika urinaria kelinci. Jurnal Natur Indonesia. 2010;12:136-42.
7. Agustina D, Retoprawiro S, Noorhamdani. Inhibition of bacterial adhesion on mice enterocyte by the hemagglutinin pili protein 12,8 kDa *Klebsiella Pneumoniae* antibody. The Journal of Tropical Life Science. 2014;4:19-25.
8. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2016;80:629–61.
9. Syahrurachman A, Chatim A, Soebandrio A, Karuniawati A, Santoso AUS, Harun BMF, et al. Buku ajar mikrobiologi kedokteran. Edisi Revisi. Tangerang: Binarupa Aksara Publisher; 2010.
10. Sikarwar AS, Batra HV. Identification of *Klebsiella Pneumoniae* by capsular polysaccharide polyclonal antibodies. International Journal of Chemical Engineering and Applications. 2011;2: 130-4.
11. Mufida DC, Bumi C, Fatmawati H. Peran protein membran luar 55 kDa *Salmonella typhi* isolat Jember sebagai protein hemagglutinin dan adhesin. Journal of Biological Researches. 2009;15:11-6.
12. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA, Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. Edisi ke-20. USA: The McGraw-Hill Companies; 2013.
13. Wilson BA, Salyers AA, Whitt DD, Winkler ME. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Edisi ke-3. Washington: ASM Press. 2011.
14. Agustina D. Immunoblotting detection of immunoglobulin G post subcutaneous immunization of protein hemagglutinin pili *Klebsiella pneumoniae* 12,8 kDa on Mice BALB/C. Jurnal Agromedicine and Medical Sciences. 2017;3:40-6.
15. Rajkumar HRV, Ramakrishna D, Venkataramana K. Comparison of hemagglutination and hemolytic activity of various bacterial clinical isolates against different human blood groups. Cureus. 2016;8:1-9.
16. Wang-sick R. Molecular virology of human pathogenic viruses. Netherlands: Academic Press; 2017.
17. Saraswati AM. Peran outer membrane protein (OMP) 23 kDa bakteri *Klebsiella pneumoniae* sebagai protein hemagglutinin dan adhesin, 2018. Belum dipublikasi.
18. Lestari FE, Suyuti H, Prawiro SR. Hemagglutinin protein 35.7 kDa acts as an adhesion molecule in the outer membrane protein of *Shigella dysenteriae*. Int J Pharm Sci Res. 2017;8:4180-5.