

DISERTASI

**EKSPRESI mRNA GEN TGF- β , MCP-1 DAN SOLUBLE PROTEIN TGF- β ,
MCP-1 PADA MENCIT YANG DIINDUKSI *KLEBSIELA PNEUMONIAE*
SETELAH PEMBERIAN PROPOLIS**

**EXPRESSION OF mRNA GENE TGF- β , MCP-1 AND SOLUBLE PROTEIN
TGF- β , MCP-1 IN MICE INDUCED BY *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AFTER
PROPOLIS ADMINISTRATION**



FENI FITRIANI TAUFIK

C013171015

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

EKSPRESI mRNA GEN TGF- β , MCP-1 DAN SOLUBLE PROTEIN TGF- β ,
MCP-1 PADA MENCIT YANG DIINDUKSI *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
SETELAH PEMBERIAN PROPOLIS

EXPRESSION OF mRNA GENE TGF- β , MCP-1 AND SOLUBLE
PROTEIN TGF- β , MCP-1 IN MICE INDUCED BY *KLEBSIELLA*
PNEUMONIAE AFTER PROPOLIS ADMINISTRATION

Disertasi
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor
Program Studi Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh :

Feni Fitriani Taufik

NIM: C013172020

Kepada:

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

DISERTASI

EKSPRESI mRNA GEN TGF- β , MCP-1 DAN SOLUBLE PROTEIN TGF- β , MCP-1
PADA MENCIT YANG DIINDUKSI *KLEBSIELA PNEUMONIAE*
SETELAH PEMBERIAN PROPOLIS

Disusun dan diajukan oleh

FENI FITRIANI TAUFIK
C013171015

*Telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji Ujian Disertasi dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
pada tanggal 3 Oktober 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*

Menyetujui


Promotor


Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok(K)
NIP. 1957036261988032001

Co Promotor

Co Promotor



Dr. dr. Ilhamjaya Patellongi, M.Kes
NIP. 195801281989031002


dr. Arif Santoso, Sp.P(K), Ph.D, FAPSR
NIP. 197707152006041012

Ketua Program Studi Doktor
Ilmu Kedokteran,

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,


Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes
NIP. 19671103 199802 1 001


Prof. Dr. dr. Haerani Rasvid, M.Kes, Sp.PD-KGH, Sp.GK
NIP. 196805301996032001



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297

EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Feni Fitriani Taufik
NIM : C013171015
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

EKSPRESI mRNA GEN TGF- β , MCP-1 DAN SOLUBLE PROTEIN TGF- β , MCP-1 PADA MENCIT YANG DIINDUKSI *KLEBSIELA PNEUMONIAE* SETELAH PEMBERIAN PROPOLIS

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 12 Oktober 2022

Yang menyatakan,

Feni Fitriani Taufik

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT dan sholawat tercurah kepada baginda Rasul Muhammad SAW bahwa atas restu dan karunia-Nya sehingga penyusunan disertasi dengan judul “EKSPRESI mRNA GEN TGF- β , MCP-1 DAN SOLUBLE PROTEIN TGF- β , MCP-1 PADA MENCIT YANG DIINDUKSI *KLEBSIELA PNEUMONIAE* SETELAH PEMBERIAN PROPOLIS” dapat terselesaikan dengan baik dan lancar. Penulis menyadari sepenuhnya disertasi ini dapat diselesaikan berkat bantuan, bimbingan, arahan, saran, koreksi dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis ingin menghanturkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

1. Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok, selaku promotor yang dengan penuh perhatian dan kearifan senantiasa memotivasi, membuka wawasan, membimbing, mendorong dan meluangkan waktu di tengah kesibukan bagi penulis sejak awal penelitian ini hingga pada akhir penulisan disertasi ini.
2. Dr. dr. Ilhamjaya Patellongi, M.Kes, selaku ko-promotor dengan penuh perhatian dan penuh kesabaran memberi semangat, motivasi, ide-ide, merangkul dan membantu sejak awal penelitian hingga selesainya disertasi ini.
3. dr. Arif Santoso, Sp.P(K), Ph.D, FAPSR, selaku ko-promotor dengan penuh perhatian dan penuh kesabaran memberi semangat, motivasi, ide-ide, merangkul dan membantu sejak awal penelitian hingga selesainya disertasi ini.
4. Dr. dr. Agus Dwi Susanto, Sp.P(K), selaku penguji yang sangat berkompeten dibidangnya yang telah memberikan dukungan sejak awal penelitian dan mendukung sebagai ketua PDPI Pusat untuk terlaksananya penelitian ini.
5. Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK, Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, PhD, SpMK(K), Prof. Dr. dr. Sutji Patiwi Rahardjo, Sp.THT-KL (K), dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K) Dr. dr. Irawaty Djaharuddin, Sp.P(K), Dr. dr. Nur Ahmad Tabri, Sp.PD(K).Sp.P selaku penguji yang berkompeten dibidangnya yang tidak lelah memberikan masukan, saran-saran dan nasehat yang sangat berguna bagi penyempurnaan disertasi ini.

6. Khusus untuk suami tercinta dr. Yudi Fadilla, Sp.JP dan anakku, Rania Fathiya Fadilla, S.Ked dan Naswa Humayra Fadilla yang selalu memberikan dukungan, semangat, dan doa serta pengorbanan yang sangat besar dengan penuh kesabaran dan pengertiannya mendampingi penulis menyelesaikan penelitian dan pendidikan ini.

7. Mama dan papa tercinta, Prof. dr. Hanifah Maani, Sp.PK(K) dan Almarhum Prof. dr. Taufik, Sp.P(K) yang terus memberikan dukungan moril, doa dan semangat untuk penulis dalam memulai dan menyelesaikan penelitian serta pendidikan ini.

Ucapan terimakasih dan penghargaan juga disampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat saya sampaikan satu demi satu yang telah dengan tulus serta segenap hati membantu saya sejak awal hingga akhir terselesaikannya proses pendidikan dan penelitian ini.

Saya juga menghanturkan maaf sebesar-besarnya apabila terdapat kesalahan dalam penyusunan disertasi ini. Semoga Disertasi ini dapat dijadikan panduan dan bermanfaat bagi banyak orang.

Makassar, 3 Oktober 2022

Feni Fitriani Taufik

ABSTRAK

FENI FITRIANI TAUFIK. *Eksresi mRNA Gen TGF- β , MCP-1, dan Soluble Protein TGF- β , MCP-1 pada Mencit yang Diinduksi Klebsiella Pneumoniae Setelah Pemberian Propolis* (dibimbing oleh Rosdiana Natzir, Ilhamjaya Patellongi, dan Arief Santoso).

Penelitian ini bertujuan menganalisis ekspresi mRNA gen TGF- β dan MCP-1 serta soluble protein TGF- β dan MCP-1 setelah pemberian propolis pada mencit yang diinduksi dengan klebsiella pneumoniae. Metode yang digunakan adalah eksperimental pada 20 ekor mencit Balb/c yang diinduksi dengan klebsiella pneumoniae intraperitoneal yang dibagi atas 4 kelompok yaitu: kelompok yang mendapatkan *levofloxacin*, kelompok placebo, kelompok propolis dan kelompok propolis + *levofloxacin*. Dua kelompok terakhir telah diberikan propolis selama 21 hari sebelum induksi ekspresi mRNA gen TGF- β dan MCP-1 serta soluble protein TGF- β dan MCP-1 diukur melalui sampel darah sebelum induksi, 24 jam dan 72 jam berikutnya. Dilakukan pula kultur jaringan paru pada semua kelompok. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat peningkatan ekspresi mRNA gen TGF- β dan soluble protein TGF- β pada 24 jam setelah induksi klebsiella pneumoniae pada semua kelompok dan terjadi penurunan setelah 72 jam kecuali pada kelompok placebo. Hal yang sama didapatkan pada ekspresi mRNA gen MCP-1 dan soluble protein MCP-1. Setelah 72 jam, terlihat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan (*levofloxacin*, propolis, *levofloxacin* + propolis) dibandingkan dengan kelompok placebo dalam hal ekspresi mRNA gen TGF- β dan MCP-1 serta soluble protein TGF- β dan MCP-1 ($p < 0.001$). Pada kultur jaringan paru didapatkan koloni tak berhingga pada kelompok placebo, 2 koloni pada kelompok propolis dan tidak ada pertumbuhan pada kelompok lainnya. Dapat disimpulkan bahwa propolis menurunkan ekspresi mRNA gen TGF- β dan MCP-1 serta soluble protein TGF- β dan MCP-1 pada mencit yang diinduksi klebsiella pneumoniae dan menghambat sebagian pertumbuhan bakteri pada kultur jaringan paru. Pada kelompok yang mendapat propolis didapatkan korelasi positif antara mRNA gen TGF- β dengan soluble protein TGF- β . Begitu pula antara mRNA gen MCP-1 dengan soluble protein MCP-1.

Kata kunci: mRNA gen TGF- β , MCP-1, soluble protein TGF- β , klebsiella pneumoniae, propolis



ABSTRACT

FENI FITRIANI TAUFIK. *mRNA Expression of TGF- β MCP-1 and Soluble Protein TGF- β MCP-1 Gene Expression in Klebsiella Pneumoniae Induced Minutes after Propolis Administration* (Supervised by **Rosdiana Natzir, Ilhamjaya Patellongi, and Arief Santoso**)

This study aims to analyze the mRNA expression of TGF- β and MCP-1 genes as well as soluble proteins TGF- β and MCP-1 after propolis administration in mice induced with *Klebsiella pneumoniae*. The experimental study used 20 Balb/c mice induced with *Klebsiella pneumoniae* intra peritoneal, divided into 4 groups, namely the group receiving Levofloxacin, the placebo group, the propolis group and the propolis + levofloxacin group. The last two groups had been given Propolis for 21 days before induction. Expression of TGF- β and MCP-1 mRNA genes as well as TGF- β and MCP-1 soluble proteins were measured through blood samples before induction, 24 hours and 72 hours later, and lung tissue culture was performed in all groups. There is an increase in the expression of TGF- β gene mRNA and soluble protein TGF- β at 24 hours after *Klebsiella pneumoniae* induction in all groups and a decrease after 72 hours except in the placebo group. The same thing is found in the mRNA expression of the MCP-1 gene and the soluble protein MCP-1. After 72 hours, there is a significant difference between the treatment groups (Levofloxacin, propolis, levofloxacin + propolis) compared to the placebo group in terms of mRNA expression of TGF- β and MCP-1 genes as well as soluble proteins TGF- β and MCP-1 ($p < 0.001$). In lung tissue culture, there are infinite colonies in the placebo group, 2 colonies in the propolis group and no growth in the other groups. So it is concluded that propolis decreases TGF- β and MCP-1 gene mRNA expression as well as TGF- β and MCP-1 soluble proteins in mice induced by *Klebsiella pneumoniae* and partially inhibited bacterial growth in lung tissue culture. In the group that received propolis, there is a positive correlation between the mRNA of the TGF- β gene and the soluble protein TGF- β as well as between the mRNA of the MCP-1 gene and the soluble protein MCP-1.

Keywords: mRNA Gen TGF- β , MCP-1, Soluble Protein TGF- β , *Klebsiella Pneumoniae*, Propolis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	II
HALAMAN PENGESAHAN	III
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	IV
PRAKATA	V
ABSTRAK	VII
ABSTRACT	VIII
DAFTAR ISI	IX
DAFTAR TABEL	XIII
DAFTAR GAMBAR	XV
BAB I	1
PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang Masalah	1
I.2 Rumusan Masalah	4
I.3 Tujuan Penelitian	5
I.3.1 Tujuan Umum	5
I.3.2 Tujuan Khusus	5
I.4 Manfaat Penelitian	6
1. Manfaat dari segi keilmuan	6
2. Manfaat bagi pelayanan	6
BAB II	7
TINJAUAN PUSTAKA	7
II.1 PNEUMONIA	7
II.1.1 Definisi	7

II.1.2 Etiologi dan Epidemiologi	7
II.1.3 Gejala Pneumonia	9
II.1.4 Patologi dan patogenesis	11
II.1.5 Patofisiologi Infeksi Pneumonia	15
II.1.6 Diagnosis Pneumonia	24
II.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
II.2.1 Patofisiologi	29
II.2.2 Epidemiologi <i>Klebsiella</i>	30
II.2.2 Struktur <i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
II.3 MAKROFAG	34
II.3.1 Perkembangan Makrofag	34
II.3.2 Mekanisme Kerja Makrofag	35
II.3.2 Fungsi Makrofag	36
II.3.3 Aktivasi Makrofag	36
II.4 Monocyte Chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2)	37
II.5 Transforming Growth Factor - β (TGF- β)	40
II.6 Ekspresi genetik sebagai Penanda Awal Penyakit	43
II.7 Propolis	49
II.7.1 Manfaat Propolis	51
II.7.2 Propolis sebagai anti inflamasi dan stress oksidatif	54
II.7.3 Manfaat Propolis pada Infeksi	56
II.8 Model Hewan yang diinduksi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	57
BAB III	60
KERANGKA TEORI	60
III.1 Kerangka Teori	60
III.2 Kerangka Konsep	61
BAB IV	64
METODE PENELITIAN	64

IV.1 Desain Penelitian	64
IV.2 Populasi dan Subjek Penelitian	64
IV.4 Bahan dan Penelitian	64
IV.5 Cara perhitungan sampel	71
IV.6 Protokol Penelitian	72
IV.7 Analisa statistik	73
IV.8 Alur Penelitian	76
BAB V	77
HASIL PENELITIAN	77
V.1 Gambaran Karakteristik Sampel Penelitian	77
V.2 Gambaran Karakteristik Variabel Terkait	77
BAB VI	89
PEMBAHASAN	89
VI.1 Gambaran Karakteristik Sampel Penelitian	90
VI.2 Ekspresi mRNA gen TGF- β , Ekspresi soluble protein TGF- β , Ekspresi mRNA gen MCP-1 dan Ekspresi soluble protein MCP-1.	93
VI.3 Pengaruh Propolis Terhadap Perubahan ekspresi mRNA gen TGF- β	94
VI.4 Pengaruh Propolis Terhadap Perubahan Ekspresi soluble protein TGF- β .	95
VI.5 Pengaruh Propolis Terhadap Perubahan Ekspresi mRNA gen MCP-1	95
VI.6 Pengaruh Propolis Terhadap Perubahan dan ekspresi soluble protein MCP-1.	96
VI.7 Hubungan antara ekspresi mRNA gen TGF- β dan soluble protein TGF- β setelah pemberian propolis pada mencit mencit yang diinduksi dengan <i>Klebsiella pneumoniae</i>	96

VI.8 Hubungan antara ekspresi mRNA gen MCP-1 dan soluble protein MCP-1 setelah pemberian propolis pada mencit mencit yang diinduksi dengan <i>Klebsiella pneumoniae</i>	97
VI.9 Pertumbuhan Koloni	97
BAB VII	99
PENUTUP	99
VII.1 Kesimpulan	999
VII.2 Keterbatasan	100
VII.3 Saran	100
DAFTAR PUSTAKA	101
LAMPIRAN	109

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Penyebab pneumonia komunitas menurut ATS/IDSA 2007.....	8
Tabel 2.2	Sistem skor berdasarkan Pneumonia Severity Index.....	11
Tabel 2.3	Rekomendasi antibiotik empiris pada HAP atau VAP sesuai jenis kuman.....	27
Tabel 2.4	Anjuran dosis empiris antibiotik intravena pada VAP, HAP dan HCAP dewasa onset lambat atau dengan faktor risiko kuman MDR.....	28
Tabel 2.5	Karakteristik <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains Klasik dan Hypervirulent.....	30
Tabel 2.6	Karakteristik infeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> nosokomial dan community.....	33
Tabel 2.7	Keterlibatan CCL2 di berbagai penyakit.....	41
Tabel 2.8	Keuntungan dan kerugian metode analisis ekspresi gen.....	47
Tabel 2.9	Senyawa bioaktif penting dari propolis (Paspuleti VR et al 2017).....	55
Tabel 5.1	Ekspresi mRNA Gen TGF- α Hari 0, 24 jam dan 72 jam setelah infeksi.....	81
Tabel 5.2	Ekspresi soluble protein TGF- β Hari 0, 24 jam dan 72 jam setelah infeksi.....	83
Tabel 5.3	Ekspresi mRNA Gen MCP-1 Hari 0, 24 jam dan 72 jam setelah infeksi.....	84
Tabel 5.4	Ekspresi soluble protein MCP-1 Hari 0, 24 jam dan 72 jam setelah infeksi.....	86
Tabel 5.5	Perbandingan ekspresi mRNA Gen TGF- β pada setiap kelompok setelah perlakuan.....	87

Tabel 5.6	Perbandingan ekspresi soluble protein TGF- β pada setiap kelompok setelah perlakuan.....	88
Tabel 5.7	Perbandingan ekspresi mRNA Gen MCP-1 pada setiap kelompok setelah perlakuan.....	88
Tabel 5.8	Perbandingan ekspresi soluble protein MCP-1 pada setiap kelompok setelah perlakuan.....	89
Tabel 5.9	Korelasi antara ekspresi mRNA gen TGF- β dengan soluble protein TGF- β pada 72 jam setelah infeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	90
Tabel 5.10	Korelasi antara ekspresi mRNA MCP1 dengan soluble protein MCP1 Setelah Infeksi 72 jam dan selesai intervensi.....	90
Tabel 5.11	Hasil kultur jaringan paru pada masing-masing kelompok setelah infeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	90

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Penilaian derajat berat penyakit dengan sistem skor CRB-65.....	10
Gambar 2.2	Mediator inflamasi pada patogenesis Pneumonia...	13
Gambar 2.3	Infeksi pada stress oksidatif.....	14
Gambar 2.4	Infalamsi sistemik yang terjadi pada Pneumonia.....	19
Gambar 2.5	Skema Kaskade Bakteri.....	24
Gambar 2.6	Empat faktor virulensi Strain <i>K. pneumoniae</i> (Kp) klasik dan hipervirulen.....	34
Gambar 2.7	Makrofag (A) berusaha menjangkau bakteri (C) dan menangkapnya dengan perpanjangan membran yang disebut pseudopodia (B).....	37
Gambar 2.8	Transduksi sinyal TGF- β melalui jaras smad-dependent dan independent.....	43
Gambar 2.9	Efek TGF- β pada leukosit.....	44
Gambar 2.10	Model analisis ekspresi gen dengan microarray.....	50
Gambar 3.1	Kerangka Teori.....	63
Gambar 3.2	Kerangka Konsep.....	64
Gambar 5.1	Ekspresi mRNA Gen TGF- β Hari 0, 24 jam dan 72 jam setelah infeksi.....	82
Gambar 5.2	Ekspresi soluble protein TGF- β Hari 0, 24 jam dan 72 jam setelah infeksi.....	83
Gambar 5.3	Ekspresi mRNA Gen MCP-1 Hari 0, 24 jam dan 72 jam setelah infeksi.....	85
Gambar 5.4	Ekspresi soluble protein MCP-1 Hari 0, 24 jam dan 72 jam setelah infeksi.....	86
Gambar 5.5	Pertumbuhan koloni kuman dari kultur jaringan paru pada setiap kelompok setelah terinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	87

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang Masalah

Pneumonia merupakan penyakit akibat infeksi yang menyerang saluran pernapasan bagian bawah. (Armstrong, Conn and Pinner, 1999). Pada peringatan Hari Pneumonia Sedunia tahun 2019, 9 organisasi kesehatan respirasi sedunia yaitu *American Thoracic Society, American College of Chest Physician, European Respiratory Society, Asosiasi Latinoamericana de Torax, Asia Pacific Respiratory Society, Pan African Thoracic Society, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Global initiative for Asthma* dan *Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* menyampaikan “fact sheet” tentang situasi Pneumonia saat ini. Pneumonia menjadi penyebab kematian utama pada anak (80% pada usia di bawah 2 tahun) dan lanjut usia, setiap tahun terjadi 700,000 kematian akibat pneumonia pada anak, setiap menit 2 anak meninggal akibat pneumonia. Kematian paling banyak terjadi pada negara dengan pendapatan perkapita rendah - menengah, dan menyebabkan gangguan kesehatan jangka panjang. (GOLD, 2019). Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar tahun 2018, prevalensi pneumonia di Indonesia sebesar 4%, sedikit menurun apabila dibandingkan dengan tahun 2013 sebesar 4,5%. Pada tahun 2020 angka kematian akibat pneumonia pada balita sebesar 0,16%. Angka kematian akibat Pneumonia pada kelompok bayi lebih tinggi hampir dua kali lipat dibandingkan pada kelompok anak umur 1 – 4 tahun. (Kemenkes RI., 2022). Kematian Balita di Indonesia akibat pneumonia, menduduki peringkat ke 7 di dunia (WHO, 2017).

Pneumonia disebabkan oleh bakteri Gram positif maupun Gram negatif, virus ataupun jamur. Pneumonia yang didapat di rumah sakit (Hospital Acquired Pneumonia) memiliki tingkat kematian yang lebih tinggi daripada infeksi yang didapat dari tempat lainnya. Bakteri penyebab HAP memiliki sifat yang lebih

virulen dan resisten terhadap antibiotik. Sebagian besar kuman HAP adalah gram negatif, meskipun dapat pula disebabkan oleh gram positif dan bakteri anaerob. Patogen penyebab HAP antara lain golongan Enterobacteriaceae (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter* spp), *Acinetobacter* spp, dan *Pseudomonas aeruginosa*. (Isbaniah & Handayani, 2018). *Klebsiella* merupakan patogen gram negatif yang sering ditemukan dan menyebabkan morbiditas yang tinggi. *Klebsiella pneumoniae* menimbulkan berbagai infeksi, termasuk pneumonia, infeksi saluran kemih, bakteri dan abses hati. Resistensi antibiotik banyak ditemukan pada strain *K. pneumoniae*. Berbagai penelitian mengenai *K.pneumoniae* yaitu mengidentifikasi faktor virulensi spesifik dan sistem imun bawaan, korelasi *K. pneumoniae* dengan komponen respons imun pada jaringan yang berbeda dan bagaimana virulensi dalam mengatasi pertahanan dari hostnya. (Paczosa, 2016). Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh McDaniel dan Allen 2019 menggambarkan model inflamasi paru akut yang menggunakan *K. pneumoniae*. Model ini berhasil menghasilkan banyak ciri khas pneumonia dan ALI seperti peningkatan infiltrasi neutrofil dan kerusakan jaringan. Infeksi yang diakibatkan oleh *Klebsiella pneumoniae* sangat bermanfaat untuk studi peradangan akut di paru. (McDaniel & Allen, 2019)

Beberapa tahun terakhir, tanaman obat telah menarik perhatian komunitas farmasi dan ilmiah sebagai sumber zat antimikroba. (Romulo, Zuhud and Rondevaldova, 2018) Salah satunya adalah penggunaan propolis sebagai terapi. Propolis (*bee glue*) adalah substansi resin (getah) yang diambil dan diakumulasi oleh lebah *Apis mellifera* dari beberapa sumber tumbuhan (Ramos AFN et al 2007). Dari berbagai penelitian saat ini, ditemukan bahwa propolis bermanfaat dalam dunia kesehatan dengan berbagai efek terapeutik diantaranya anti inflamasi, antioksidan, antikarsinogenik, antibakteri, antifungal, antiprotozoa, antivirus, antidiabetik (Paspuleti VR et al 2017). Senyawa utama yang berperan dalam fungsi tersebut adalah flavonoid (Ramos AFN et al 2007). Propolis juga telah teruji

menjadi agen potensial anti inflamasi dan agen untuk menurunkan produksi radikal bebas sehingga dipikirkan dapat bermanfaat untuk mengobati penyakit-penyakit inflamasi (Yangi B et al 2018).

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) adalah sitokin regulator poten yang memiliki berbagai efek pada sel hematopoiesis dan juga pada sistem imun. TGF- β berperan dalam regulasi proliferasi, diferensiasi dan survival berbagai sel dalam sistem imun. TGF- β juga mengatur inisiasi dan resolusi dari respons inflamasi dan dapat berperan dalam berbagai proses biologis termasuk fibrosis (Li MO et al, 2006). Diantara berbagai mediator inflamasi yang terlibat dalam PPOK, TGF- β yang dihasilkan oleh sel epitel saluran napas akan menginduksi terjadinya fibrosis paru (Chung KF et al, 2008).

Monocyte Chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) adalah suatu kemokin CC pada manusia yang diproduksi oleh berbagai sel baik secara konstitusional atau setelah diinduksi oleh stres oksidatif, sitokin atau faktor pertumbuhan. CCL2 diproduksi oleh banyak sel dengan sumber utama dari monosit/ makrofag. Fungsi dari CCL2 adalah untuk mengatur migrasi dan infiltrasi monosit, limfosit T memori, dan NK cell. Kemokin ini berperan dalam berbagai proses mekanisme berbagai penyakit (Deshmane SL et al, 2009). Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa neutrofil mengekspresikan CCR2 dan menunjukkan kemotaksis terhadap MCP-1, yang dapat melawan pneumonia bakterial akut. Mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi bakteri paru bergantung pada perekrutan neutrofil, monosit, dan makrofag yang efektif di tempat infeksi.

Meskipun kemajuan luar biasa telah dibuat dalam pengobatan manusia, penyakit menular masih menjadi masalah kesehatan masyarakat utama di negara-negara berpenghasilan rendah dan menengah, termasuk Indonesia, di mana infeksi saluran pernapasan bawah dan tuberkulosis adalah penyebab utama kematian. Pada pneumonia, selain penggunaan antibiotik sebagai terapi utama, penambahan propolis dapat dipertimbangkan sebagai terapi tambahan. Walaupun tidak dapat menggantikan peran antibiotik, penggunaan propolis sebagai terapi tambahan diharapkan dapat mempercepat pemulihan dan mengurangi jejas yang diakibatkan oleh proses infeksi yang terjadi pada host. Efek tersebut ditandai dengan menurunnya biomarker dari inflamasi diantaranya mediator inflamasi MCP-1 dan TGF- β .

Penelitian ini melihat pengaruh pemberian propolis terhadap mediator inflamasi MCP-1 dan TGF- β . Penelitian ini bertujuan untuk melihat apakah propolis dapat memengaruhi mediator inflamasi yang berperan dalam patomekanisme pneumonia yang dimulai dengan penelitian pada hewan mencit. Diharapkan hasil dapat memberi peluang baru untuk terapi tambahan maupun pencegahan progresivitas pneumonia secara *in vitro* maupun *in vivo*.

I.2 Rumusan Masalah

Apakah ada hubungan ekspresi mRNA gen TGF- β dan MCP-1 serta *soluble protein* TGF- β dan MCP-1 setelah pemberian propolis pada mencit yang diinduksi dengan *Klebsiella pneumoniae* dan pengaruhnya terhadap pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*

I.3 Tujuan Penelitian

I.3.1 Tujuan Umum

Untuk menganalisis ekspresi mRNA gen TGF- β dan MCP-1 serta *soluble protein* TGF- β dan MCP-1 setelah pemberian propolis pada mencit yang diinduksi dengan *Klebsiella pneumoniae*

I.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui ekspresi mRNA gen TGF- β pada mencit yang diinduksi dengan *Klebsiella pneumoniae*
2. Mengetahui ekspresi mRNA gen MCP-1 pada mencit yang diinduksi dengan *Klebsiella pneumoniae*
3. Mengetahui ekspresi *soluble protein* TGF- β pada mencit yang diinduksi dengan *Klebsiella pneumoniae*
4. Mengetahui ekspresi *soluble protein* MCP-1 pada mencit yang diinduksi dengan *Klebsiella pneumoniae*
5. Menganalisis hubungan antara ekspresi mRNA gen TGF- β dan *soluble protein* TGF- β setelah pemberian propolis pada mencit mencit yang diinduksi dengan *Klebsiella pneumoniae*
6. Menganalisis hubungan antara ekspresi mRNA gen MCP-1 dan *soluble protein* MCP-1 setelah pemberian propolis pada mencit yang diinduksi dengan *Klebsiella pneumoniae*
7. Melihat pertumbuhan bakteri pada mencit yang diinduksi dengan *Klebsiella pneumoniae*

I.4 Manfaat Penelitian

1. Manfaat dari segi keilmuan

Melalui penelitian ini diharapkan terkait ekspresi mRNA gen MCP-1 dan TGF- β setelah pemberian propolis pada pasien pneumonia sebagai peluang terapi komplemen untuk mencegah progresivitas pneumonia dalam bidang ilmu kedokteran respirasi.

2. Manfaat bagi pelayanan

Dari hasil penelitian ini diharapkan propolis dapat digunakan menjadi terapi komplemen untuk mencegah progresivitas pneumonia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 PNEUMONIA

II.1.1 Definisi

Pneumonia merupakan peradangan akut parenkim paru yang disertai dengan gejala khas yaitu demam, batuk yang baru muncul dengan atau tanpa produksi sputum atau batuk kronik disertai perubahan pada warna sputum, nyeri dada dan sesak napas. Pada pemeriksaan fisik auskultasi toraks dapat ditemukan kelainan seperti ronki basah kasar, suara napas bronkial. Pada pemeriksaan penunjang foto toraks juga didapatkan adanya infiltrat baru. Klasifikasi pneumonia berdasarkan klinis dan epidemiologis yaitu pneumonia yang didapat di masyarakat atau pneumonia komunitas (*Community-Acquired Pneumonia = CAP*), pneumonia didapat di rumah sakit (*Hospital-Acquired Pneumonia = HAP*, *Health Care Associated Pneumonia = HCAP*) dan pneumonia akibat pemakaian ventilator (*Ventilator Associated Pneumonia = VAP*). (Mandell *et al.*, 2007)

II.1.2 Etiologi dan Epidemiologi

Penyakit pneumonia dapat disebabkan oleh bakteri, virus, jamur dan protozoa. Pada berbagai negara dilakukan penelitian dan dilaporkan bahwa patogen yang menyebabkan pneumonia komunitas yaitu bakteri gram positif seperti *Streptococcus pneumoniae* dan *Haemophilus influenzae* dan kuman atipik

Mycoplasma pneumoniae, *Chlamydia pneumoniae* dan *Legionella pneumophila*. *Streptococcus pneumoniae* and *Legionella pneumophila* sering kali dihubungkan dengan pneumonia komunitas yang berat. Patogen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Pseudomonas aeruginosa* jarang ditemukan pada pneumonia komunitas. Penyebab pneumonia komunitas berdasarkan tipe pasien menurut ATS/IDSA 2007 dapat dilihat pada Tabel 2.1 (Mandell *et al.*, 2007).

Tabel 2.1. Penyebab pneumonia komunitas menurut ATS/IDSA 2007

Tipe pasien	Etiologi
Rawat jalan	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Chlamidophila pneumoniae</i> <i>Virus respirasi</i>
Rawat inap (non ICU)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamidophila pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Legionella spp</i> <i>Aspirasi</i> <i>Virus respirasi</i>
Rawat ICU	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Legionella spp</i> Basil gram negatif <i>Haemophilus influenzae</i>

Dikutip dari (Mandell *et al.*, 2007)

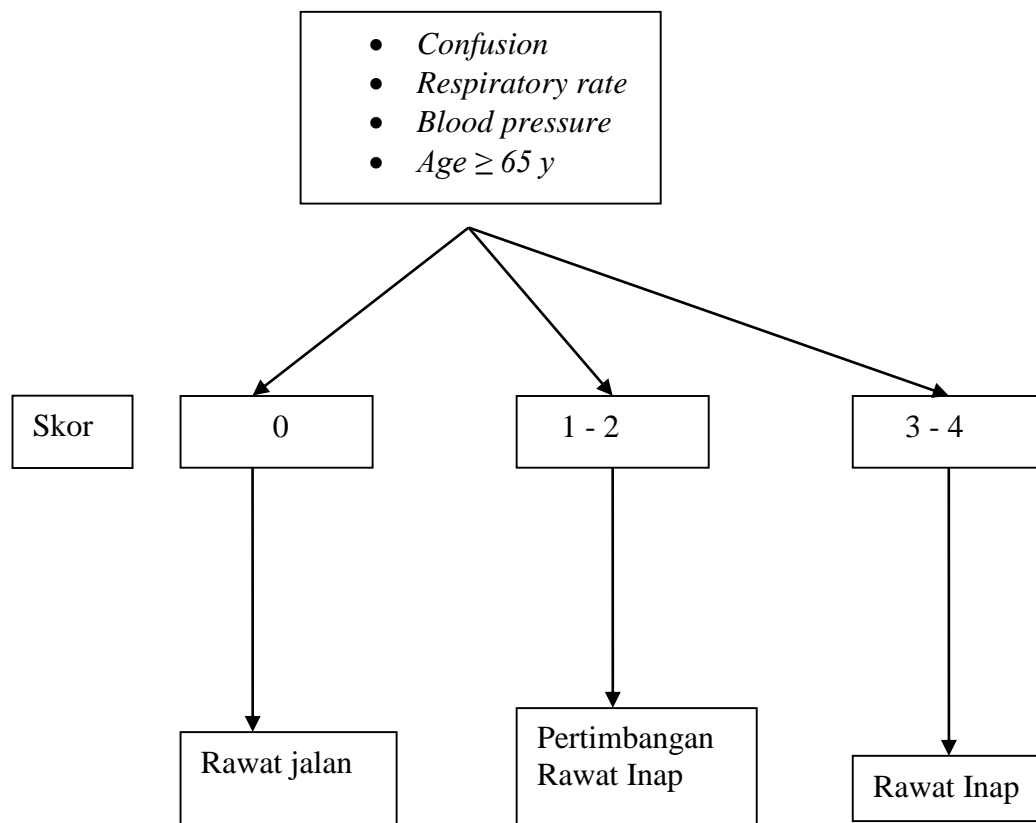
Terlihat perbedaan pada penelitian yang ada di Indonesia, penyebab pneumonia komunitas pada pasien rawat inap yang sering yaitu kuman gram negatif seperti *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*. *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans* dan *Staphylococcus aureus* yang merupakan gram positif jumlahnya lebih sedikit ditemukan. Data tahun 2012 di beberapa RS di Indonesia, penyebab pneumonia komunitas tersering yaitu

Klebsiella pneumoniae, *Acinetobacter pneumoniae* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Republik Indonesia (RI) merilis data Surveilans Sentinel SARI (*Severe Acute Respiratory Infection*) tahun 2010 didapatkan penyebab tersering kasus pneumonia di Indonesia adalah *Klebsiella pneumoniae* sebesar 29%, diikuti *Acinetobacter baumannii* sebesar 27%, *Staphylococcus aureus* 16%, *Streptococcus pneumoniae* 12%, *Acinetobacter calcoaticus* 8%, *Pseudomonas aeruginosa* 6% dan *Escherichia coli* 2%. Penelitian pada tahun 2013 yang dilakukan Faisal dkk, dari biakan sputum pasien rawat inap dengan pneumonia komunitas di RSUP Persahabatan kuman gram negatif yaitu *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* adalah yang paling sering ditemukan. *Streptococcus viridans* yang merupakan gram positif juga ditemukan namun dalam jumlah sedikit. (Faisal *et al.*, 2014)

II.1.3 Gejala Pneumonia

Berdasarkan derajat beratnya penyakit dapat ditentukan penanganan yang optimal sehingga dapat diharapkan dapat mengurangi biaya perawatan rumah sakit. Untuk menilai perawatan pasien dengan pneumonia dapat menggunakan sistem skoring prognosis yang biasanya digunakan untuk memprediksi mortalitas pasien. Diantaranya *pneumonia severity index* (PSI) sistem skoring yang digunakan oleh ATS/IDSA dan CRB-65 (confusion, respiratory rate, blood pressure and age > 65 years) sistem skoring yang digunakan oleh *British Thoracic Society* (BTS). Kelebihan *Pneumonia severity index* adalah mengidentifikasi pasien dengan mortalitas yang rendah , namun kekurangannya adalah dalam mendeteksi penyakit dengan tingkat mortalitas yang lebih berat terutama jika usia muda dan tanpa

komorbid. Namun untuk kondisi pasien dengan tingkat mortalitas yang tinggi lebih ideal dengan sistem skoring CRB-65. Sistem skoring berdasarkan CRB-65 dan PSI dapat dilihat pada gambar 2.1 dan tabel 2.2 (Faisal *et al.*, 2014)(Niederman, 2007)



Gambar 2.1. Penilaian derajat berat penyakit dengan sistem skor CRB-65

Dikutip dari (Armitage and Woodhead, 2007)

Tabel 2.2. Sistem skor berdasarkan *Pneumonia Severity Index*

Karakteristik pasien	Jumlah Poin
Faktor demografi	
• Usia : laki-laki	Usia (tahun)
Perempuan	Usia (tahun) - 10
• Perawatan di rumah	+10
• Penyakit penyerta	
Keganasan	+30
Penyakit hati	+20
Gagal jantung kongestif	+10
Penyakit serebrovaskular	+10

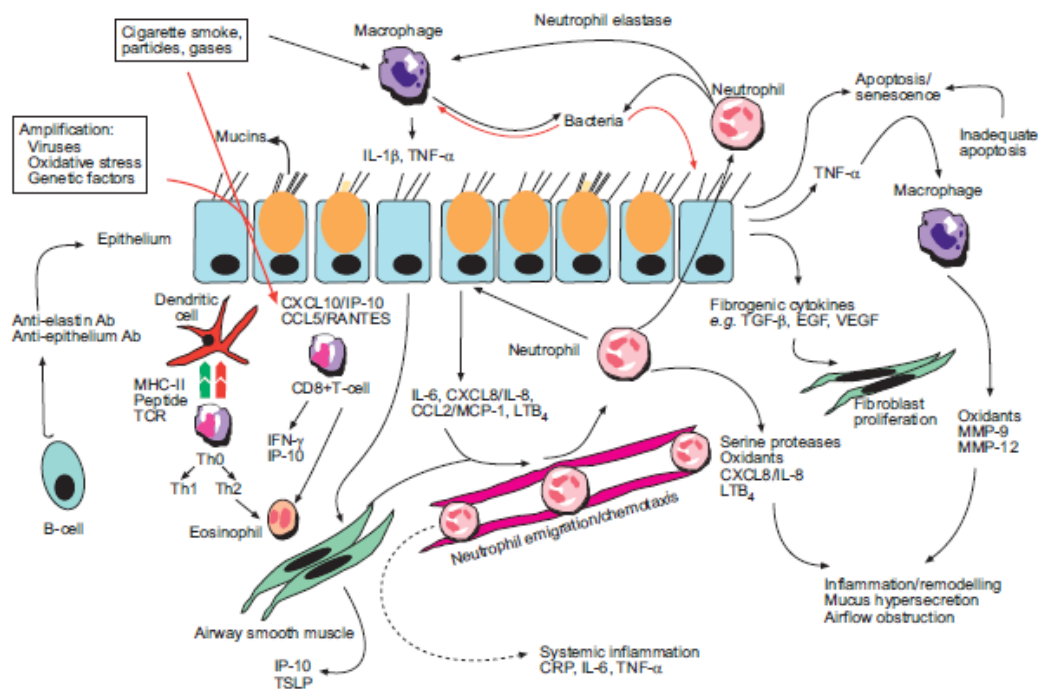
Penyakit ginjal				+10
Pemeriksaan fisis				
• Perubahan status mental				+20
• Pernapasan > 30 kali/menit				+20
• Tekanan darah sistolik < 90 mmHg				+20
• Suhu tubuh < 35°C atau > 40°C				+15
• Nadi > 125 kali/menit				+10
Hasil laboratorium / Radiologi				
• Analisis gas darah arteri pH < 7,35				+30
• BUN > 64 mg/dL				+20
• Natrium < 130 mEq/liter				+20
• Glukosa > 250 mg/dL				+10
• Hematokrit < 30%				+10
• PO ₂ < 60 mmHg atau sat. O ₂ < 90%				+10
Efusi pleura				+10
Total poin	Risiko	kelas Risiko	Mortalitas	Perawatan
Tidak diprediksi	Rendah	I	0,1%	Rawat jalan
≤70		II	0,6%	Rawat jalan
71 – 90		III	2,8%	Rawat inap/ jalan
91 – 130	Sedang	IV	8,2%	Rawat inap
> 130	Berat	V	29,2%	Rawat inap

Dikutip dari (Lim *et al.*, 2009)

II.1.4 Patologi dan patogenesis

Invasi dan penyebaran bakteri ke dalam parenkim paru pada tingkat alveolar menyebabkan pneumonia bakterial, dan respons inflamasi tubuh terhadapnya menyebabkan sindrom klinis pneumonia. Untuk mencegah perkembangbiakan mikroorganisme ini terdapat sejumlah pertahanan inang yang bekerja sama di paru-paru seperti mekanis (misalnya rambut di lubang hidung dan lendir di nasofaring dan orofaring) dan kimiawi (misalnya, protein yang dihasilkan oleh sel epitel alveolar seperti protein surfaktan A dan D, yang memiliki sifat intrinsik bakteri opsonisasi). Komponen lain dari sistem pertahanan paru terdiri dari

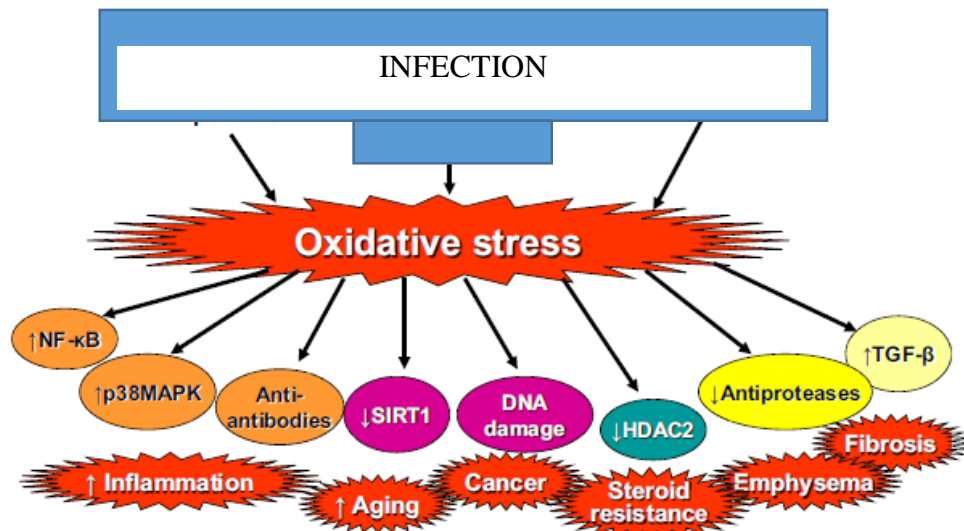
sel-sel kekebalan seperti makrofag alveolar, yang bekerja untuk menelan dan membunuh bakteri yang berkembang biak, tetapi begitu bakteri mengatasi kapasitas pertahanan inang, mereka mulai berkembang biak. Dalam mekanisme ini, makrofag alveolar memulai respons inflamasi untuk memperkuat pertahanan saluran pernapasan bagian bawah. Respons inflamasi ini merupakan alasan utama manifestasi klinis dari pneumonia bakterial. Sitokin dilepaskan sebagai respons terhadap reaksi inflamasi dan menyebabkan gejala konstitusional, misalnya IL-1 (interleukin-1) dan TNF (tumor necrosis factor) menyebabkan demam. IL-8 mirip kemokin (interleukin-8) dan faktor perangsang koloni seperti G-CSF (faktor perangsang koloni granulosit) masing-masing mendorong kemotaksis dan pematangan neutrofil, yang mengakibatkan leukositosis pada laboratorium serologis dan sekresi purulen. Sitokin-sitokin ini bertanggung jawab atas kebocoran membran alveolar-kapiler di tempat peradangan, menyebabkan penurunan kepatuhan dan sesak napas. Beberapa waktu tertentu bahkan eritrosit melewati penghalang ini dan menyebabkan hemoptisis. (Søndergaard *et al.*, 2018) (Karakuzu *et al.*, 2018) (Phillips *et al.*, 2018)



Gambar 2.2. Mediator inflamasi pada patogenesis Pneumonia

Dikutip dari (Chung KF et al, 2008)

Stres oksidatif merupakan mekanisme amplifikasi penting dari infeksi. Stres oksidatif ditandai dengan ketidakseimbangan keberadaan radikal bebas dalam sel yang meliputi oksigen reaktif dan turunannya, dengan ketersediaan enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (Montuschi et al 2004). Radikal bebas diklasifikasikan berdasarkan sumbernya yakni endogen dan eksogen (Montuschi et al 2004). Radikal bebas endogen dapat berasal dari aktivitas mitokondria dan aktivasi fagosit. Adapun radikal bebas eksogen dapat bersumber dari asap rokok dan toksin yang berasal dari lingkungan sekitar (Montuschi et al 2004). Radikal bebas memberikan dampak langsung pada biomolekul tubuh seperti DNA, lemak dan protein. Saat ini parameter pada stress oksidatif digunakan pada studi berbagai penyakit akut dan kronis mencakup kanker, penyakit kardiovaskular, penyakit neurodegeneratif, penyakit paru dan proses penuaan dini (Montuschi et al 2004)



Gambar 2.3. Infeksi pada stress oksidatif

Dikutip dari (Barnes PJ, 2014)

Stres oksidatif memainkan peran ganda dalam proses infeksi. Radikal bebas selain melindungi dari invasi mikroorganisme, mereka juga dapat menyebabkan kerusakan jaringan selama peradangan yang terjadi. Dalam proses infeksi, terjadi pembentukan spesies reaktif oleh myeloperoksidase, NADPH oksidase, dan sintase oksida nitrat. Di sisi lain, spesies reaktif dapat dihasilkan antara lain oleh sitokrom P450, beberapa logam, dan xantin oksidase. Beberapa patologi yang muncul selama infeksi dapat dikaitkan dengan stres oksidatif dan pembentukan spesies reaktif dalam infeksi bahkan dapat berakibat fatal. (Pohanka, 2013) Myeloperoksidase memiliki peran penting dalam melawan patogen karena sifat virucidal dan bakterisidalnya. Dalam percobaan *in vitro*, pemberian myeloperoksidase efektif dalam menonaktifkan beban HIV bahkan tanpa menyediakan substrat tambahan untuk enzim (Chochola et al. 1994) NADPH oksidase memiliki fungsi yang mirip dengan myeloperoksidase, dan terdiri dari neutrofil. Enzim mengkatalisis oksidasi NADPH dengan reduksi serentak oksigen menjadi superoksida. NADPH oksidase

diekspresikan selama reaksi inflamasi untuk membunuh patogen (Lee dan Yang 2012). Inducible NOS (*nitric oxide synthase*) adalah enzim yang diekspresikan selama patogenesis. Dibandingkan dengan iNOS, dua jenis NOS lainnya (endotel dan saraf) diekspresikan secara konstitutif. Selama infeksi, terdapat aktivitas iNOS yang melimpah di makrofag dan leukosit lainnya (Robinson et al. 2011)

Stres oksidatif dapat dimulai oleh aktivitas metabolisme patogen itu sendiri atau dalam proses perubahan metabolisme tubuh. Kerusakan sel dan jaringan inang merupakan dugaan stres oksidatif umum. Di sisi lain, stres oksidatif dapat memicu kerusakan jaringan yang mengakibatkan proses regulasi tidak seimbang. Efeknya menjadi lebih signifikan setelah sel-sel di jaringan yang rusak berkurang. Nekrosis dan apoptosis adalah proses kematian sel dasar (Amir et al. 2012). Kehadiran spesies oksigen atau nitrogen reaktif memulai apoptosis dan mendorong nekrosis di atas apoptosis ketika mereka melewati batas ambang. Stres oksidatif sering kali menyertai infeksi, dan efeknya dapat muncul melalui beberapa mekanisme termasuk spesies reaktif oksigen (ROS) dan nitrogen reaktif dan produksi nonspesifik dalam metabolisme basal. Senyawa beracun dan unsur kimia seperti logam berat juga dapat mendorong pembentukan ROS. Kehadiran spesies oksigen atau nitrogen reaktif memulai apoptosis dan mendorong nekrosis di atas apoptosis ketika melewati batas ambang (Khan et al. 2012; Ramalingam dan Kim 2012; Sung et al. 2012; Fukui et al. 2012).

II.1.5 Patofisiologi Infeksi Pneumonia

Pneumonia terjadi akibat invasi dan pertumbuhan berlebihan dari

mikroorganisme dalam melawan pertahanan paru yang berakibat peradangan parenkim paru. Inflamasi merupakan respons pertahanan host akibat rusaknya jaringan paru oleh karena infeksi mikroorganisme. Respons inflamasi pada dasarnya merupakan mekanisme untuk bertahan terhadap mikroorganisme patogen (Moldoveanu, et al, 2009).

a. Pertahanan Paru

Infeksi saluran napas bawah tergantung dari virulensi dan kolonisasi dari mikroorganisme yang dapat melampaui mekanisme pertahanan paru. Mekanisme pertahanan paru terdiri dari: (Mason CM, et al, 2005; Goetz MB, et al, 2005))

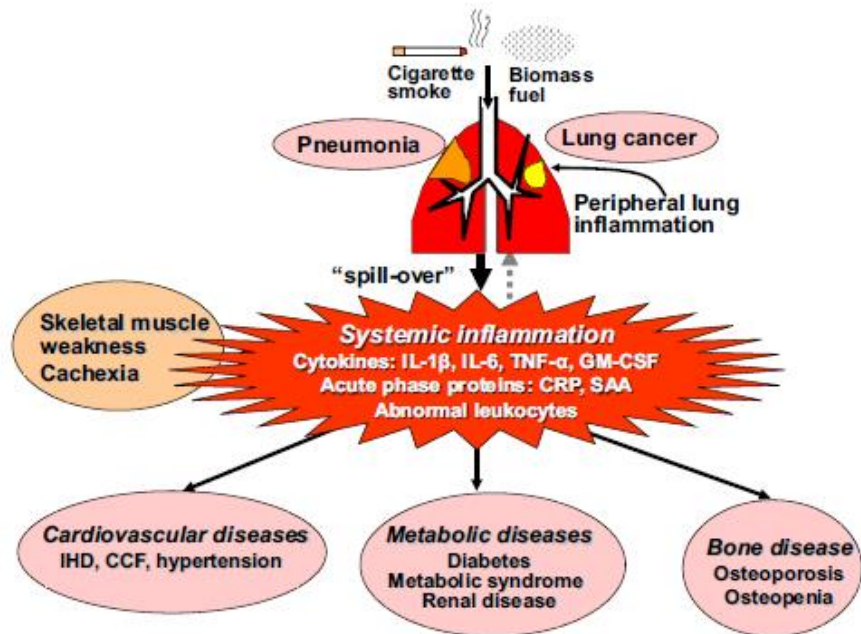
1. Saluran napas atas yaitu hidung berfungsi sebagai penyaring partikel dibuang melalui bersin dan faring berfungsi mengeluarkan partikel atau mikroorganisme melalui batuk atau tertelan.
2. Imun alamiah melalui sekresi sel epitel di saluran napas bawah seperti lisosom (enzim sel epitel berfungsi memecah dinding sel bakteri terutama pada bakteri gram positif), laktoferin (protein yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri), defensin (protein yang diproduksi oleh bermacam-macam sel epitel berfungsi merusak struktur bakteri dengan meningkatkan permeabilitas membran), leukoprotease inhibitor (protein yang berfungsi menghambat neutrofil elastase dan menghambat aktivitas bakteri), dan cathelicidin (peptida neutrofil berfungsi menghambat aktivitas bakteri gram negatif). Sistem imun alamiah lainnya seperti makrofag dan neutrofil yang berasal dari pembuluh darah kapiler masuk ke dalam alveoli melalui reaksi inflamasi makrofag.

3. Sistem pertahanan imun didapat yang berada di saluran napas adalah immunoglobulin (Ig) terutama
4. IgA dan IgG. Sekresi IgA berada di saluran napas atas sedangkan IgG serum antibodi di saluran napas bawah. Fungsi dari IgA dan IgG sebagai opsonin yaitu mengikat mikroorganisme pada reseptor fagosit sehingga memudahkan fagositosis jika makrofag dan neutrofil tidak dapat melawan mikroorganisme. (Maitra A, et al, 2007).
5. Pneumonia terjadi akibat invasi dan pertumbuhan berlebihan dari mikroorganisme dalam melawan pertahanan paru berakibat peradangan parenkim paru. Mekanisme agar mikroorganisme dapat mencapai permukaan saluran napas, dapat dicapai dengan berbagai cara antara lain dengan inhalasi bahan aerosol, penyebaran melalui pembuluh darah dan kolonisasi pada permukaan mukosa. Mekanisme dengan pembentukan kolonisasi ini merupakan cara yang terbanyak (Moldoveanu B, et al, 2009; PDPI 2014) Proses ini selanjutnya akan terjadi aspirasi dari kolonisasi daerah nasal, orofaring, dan lambung (Alcon A, et al, 2005; Mason CM, et al, 2005).
6. Mekanisme aspirasi orofaring pada individu yang sehat terjadi saat tidur namun host mampu melawan infeksi paru, sedangkan mekanisme aspirasi orofaring pada individu yang sakit terjadi melalui pemberian sedatif, intubasi, dan terapi antibiotik dapat merubah flora normal dan merusak fungsi mekanik saluran napas atas. Aspirasi lambung terjadi bila fungsi mekanik spingteresofagus mengalami gangguan (Alcon A, et al, 2005; Mason CM, et al, 2005).

7. Mekanisme kolonisasi orofaring terjadi bila fibronektin dari komponen saliva tidak berfungsi, berdampak pada penurunan flora normal dan peningkatan jumlah mikroorganisme patogen di saluran napas. Mekanisme kolonisasi lambung terjadi bila pH lambung meningkat akibat pemberian obat penghambat asam lambung sehingga dapat meningkatkan pertumbuhan mikroorganisme (Alcon A, et al, 2005: Mason CM, et al, 2005).

b. Respons Sistem Imun

Inflamasi merupakan respons pertahanan paru host akibat rusaknya jaringan paru oleh karena infeksi mikroorganisme. Respons inflamasi pada dasarnya merupakan mekanisme untuk bertahan terhadap mikroorganisme patogen. Respons inflamasi ini sebenarnya dapat terjadi tidak hanya pada kasus infeksi, tetapi juga pada kasus trauma dan hipersensitivitas. Dalam proses inflamasi ini akan melibatkan berbagai jenis sel-sel inflamasi untuk diaktifkan dan selanjutnya akan disekresi sitokin dan mediator untuk mengatur sel-sel inflamasi tersebut. (Moldoveanu, et al, 2009). Dapat dilihat pada gambar 2.4 inflamasi sistemik yang terjadi pada pneumonia.



Gambar 2.4. Infalamsi sistemik yang terjadi pada Pneumonia

Dikutip dari (Barnes PJ, 2014)

Inflamasi yang terjadi akibat respons imun host terdiri dari 2 cara pengenalan dan pemusnahan mikroorganisme melalui sistem imun bawaan yaitu fagositosis dan sistem imun adaptif. Proses pengenalan mikroorganisme melalui sistem imun alamiah dengan mengenal struktur mikroorganisme. Struktur mikroorganisme tersusun oleh molekul spesifik yaitu pathogen-associated molecular patterns (PAMP). Struktur tersebut seperti lipoprotein, lipopolysaccharides (LPS) pada gram negatif, peptidoglycans pada gram positif, dan viral envelope glycoproteins. Pengenalan PAMP melalui pattern-recognition receptor (PRR) diekspresikan oleh sistem imun alamiah yaitu monosit, makrofag, dan polimorfonuklear (PMN) dan terdiri dari beberapa famili seperti toll like receptor (TLR), cluster of differentiation (CD) 14, formyl peptide receptor dan reseptor kom- plemen. Ikatan melalui reseptor

ini dapat meningkatkan proses fagositosis sehingga mikroorganisme lebih mudah dimusnahkan. (Moldoveanu, et al, 2009; Baratawidjaja GK, et al, 2009).

Monosit adalah sistem imun alamiah dalam proses fagositosis. Monosit yang berada di pembuluh darah bersifat tidak aktif, menjadi aktif bila migrasi ke jaringan. Aktifasi monosit melalui membran CD (mCD)14 berikatan dengan lipopolysaccharides (LPS) bakteri yang dimediasi oleh tolls like receptor (Maitra A, et al, 2007; Moldoveanu, et al, 2009; Baratawidjaja GK, et al, 2009). Toll like receptor setelah mengenai PAMP akan mengaktifkan faktor transkripsi NF- κ B dan berbagai jenis sel inflamasi. Berbagai sel inflamasi tersebut yang telah teraktivasi akan memproduksi molekul adhesi, growth factor, kemokin dan sitokin pro inflamasi diantaranya IL-6, IL-8, TNF- α yang diperlukan untuk respons inflamasi TNF- α akan meningkatkan adhesi molekul sel endotel kapiler paru dan IL-8 berfungsi sebagai kemoaktratan untuk neutrofil sehingga berpindah ke tempat inflamasi (Abbas AK et al, 2013; Martinez R, et al, 2011).

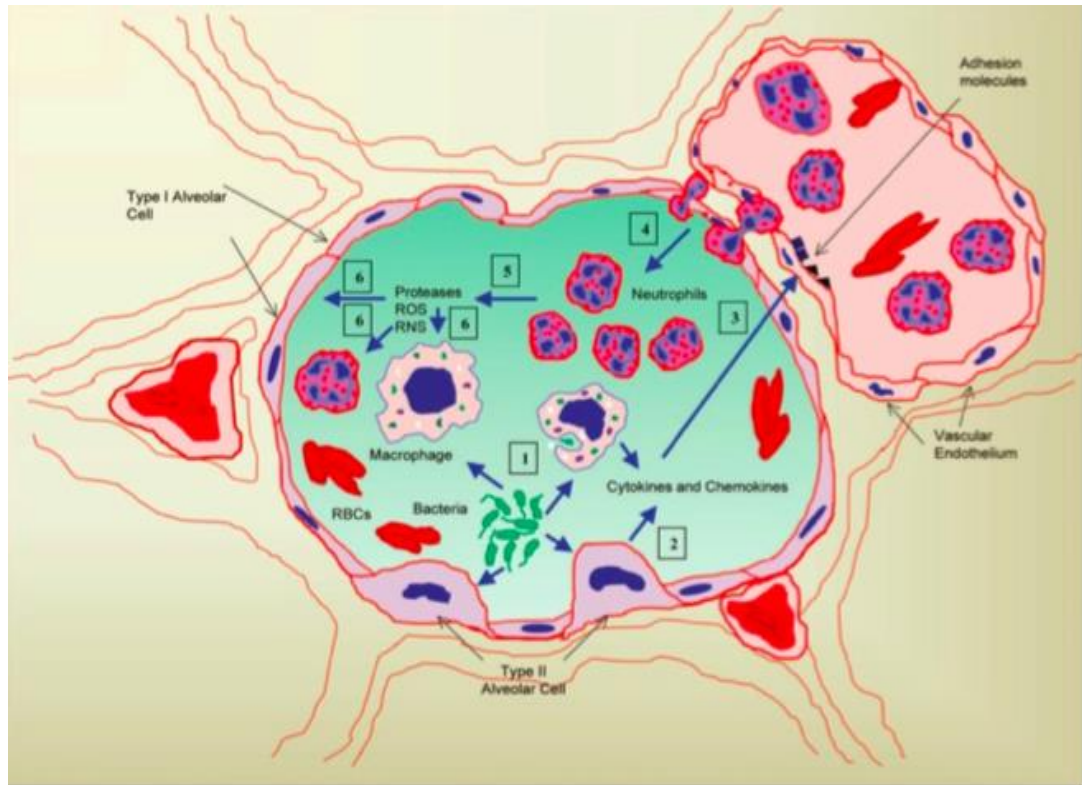
Setidaknya ada 10 jenis TLR yang dapat mengenali bakteri pada permukaan sel atau endosome. Toll-like receptor-4 mengenali endotoksin dan protein lipopolisakarida (LPS) dari bakteri gram negatif, sedangkan TLR-2 mengenali bakteri gram positif dan peptidoglikan. Ikatan LPS dengan TLR-4 pada makrofag alveolar akan mengaktifasi protein adaptor untuk menginisiasi sinyal transduksi ke nukleus melalui aktivasi NF- κ B yang menyebabkan terjadinya pelepasan sitokin proinflamasi antara lain TNF- α , IL-6, dan IL-1 β (Abbas AK, et al, 2013; Martinez R, et al, 2011; Moldoveanu B, et al, 2009). Tolls like receptor (TLR)4 merangsang produksi faktor transkripsi seperti nuclear factor κ B (NF κ B), dengan mengaktifkan gen protein berupa sitokin, enzim, atau bentuk protein lainnya dalam memudahkan proses fagositosis (Maitra A, et al, 2007; Moldoveanu B, et al, 2009; Baratawidjaja

GK, et al, 2009). Produk dari sel host yang rusak dan mati dikenali oleh imunitas bawaan untuk memulai proses perbaikan jaringan. Respons imunitas bawaan dapat merangsang respons imunitas adaptif agar efektif melawan berbagai jenis mikroba. (Abbas AK, et al, 2012).

Antigen bakteri gram negatif dikenali makrofag melalui TLR-4. Ikatan LPS dengan TLR-4 pada makrofag alveolar mengaktifasi protein adaptor untuk menginisiasi sinyal transduksi ke nukleus melalui aktivasi NF- κ B sehingga terjadi pelepasan sitokin proinflamasi antara lain TNF- α , IL-6 dan IL-1 β). Selain NF- κ B, terdapat faktor transkripsi lain yaitu peroxisome proliferasi aktivasi reseptor (PPAR)- γ yang berfungsi mengatur ekspresi gen inflamasi dan berperan serta dalam proses aktivasi NF- κ B. Antigen bakteri gram positif dikenal sebagai eksotoksin. Eksotoksin berperan sebagai superantigen dikenali oleh makrofag dan sel dendrit sebagai antigen presenting cell (APC) melalui TLR-2. Antigen bakteri gram positif ini membawa muatan polipeptida spesifik dari major histocompatibility complex (MHC) II akan berikatan dengan CD4+ melalui T cell receptor (TCR) atau reseptor limfosit T setelah dipresentasikan oleh APC. Antigen presenting cell kemudian memproduksi IL-12 yang akan mengaktifasi sel Th0 berproliferasi menjadi Th1 dan IL-4 yang akan mengaktifasi Th0 berproliferasi menjadi Th2. Sel Th1 teraktivasi menghasilkan sitokin IFN- γ yang akan merangsang makrofag mengeluarkan sitokin IL-1 β , TNF- α , IL-6 dan IL-8, sedangkan Th2 akan menghasilkan IL-4, IL-5, IL-6 dan IL-10. Sitokin proinflamasi antara lain TNF- α , IL-6, IL-1 β dan IL-8 yang diproduksi oleh epitel saluran napas, endotel dan otot polos vaskuler mengakibatkan pelepasan PCT (Martinez R, et al, 2011).

Makrofag aktif melalui sekresi sitokin IL-1 β , IL-6, IL-2, TNF- α dan IL-8. Fungsi makrofag dalam proses fagositosis sama seperti sel dendritik yaitu sebagai antigen presenting melalui major histocompatibility kompleks (MHC) kelas II dalam mengaktifasi CD4+T (Moldoveanu B, et al, 2009: Baratawidjaja GK, et al, 2009).

Polimorfonuklear (PMN) adalah sel darah putih yang tidak terdapat pada jaringan sehat namun bila terjadi peradangan neutrofil aktif melalui produksi sitokin. Neutrofil memiliki permukaan reseptor formyl peptide yang diperoleh dari metabolisme spesifik bakteri dan komplemen (C)5a. Pengikatan neutrofil pada bakteri terjadi melalui reseptor CD11b/CD18 dan reseptor komplemen (CR)3 untuk mengikat protein bakteri. Limfosit merupakan bagian sistem imun adaptif yang menggunakan antigen reseptor sel T dan B untuk mengenali target antigen (Moldoveanu B, et al, 2009: Baratawidjaja GK, et al, 2009). Neutrofil merupakan komponen utama respons imun terhadap infeksi bakteri (Nicod LP, et al, 2015). Jumlah neutrofil dalam darah perifer biasanya konstan, namun akan meningkat produksinya dari sumsum tulang. Selanjutnya melalui faktor transkripsi NF κ B mekanisme anti bakteri neutrofil akan diaktifkan seperti memproduksi kemokin, peningkatan adhesi dan interaksi sel-sel lain yang berhubungan dengan inflamasi tampak pada gambar 2.5 di bawah ini (Craig A, et al, 2009).



Gambar 2.5. Skema Kaskade Bakteri

Skema yang menggambarkan suatu kaskade bakteri yang menginduksi penarikan neutrofil dan terjadinya kerusakan paru dan saluran napas. (1) bakteri berinteraksi dengan sel di alveoli (2). bakteri menginduksi sekresi sitokin dan neutrofil kemoaktratan. (3). sitokin meningkatkan ekspresi molekul adhesi pada kapiler endotel (4). terjadinya migrasi neutrofil ke ruang alveoli. (5). neutrofil yang bermigrasi ke alveoli akan memproduksi protease, rektive oxygen species dan reactive nitrogen species. (6). proses berikutnya dapat terjadi kematian baik pada sel yang terinfeksi maupun pada neutrophil.

Dikutip dari (Craig A, 2009)

Neutrofil mengalir atas pengaruh ikatan antara selektin dan endotel dengan musin pada permukaan neutrofil. Kemokin (IL-8) di produksi oleh makrofag setelah terpajang bakteri patogen, peningkatan kemokin akan menyebabkan peningkatan afinitas integrin. Integrin adalah molekul adhesi yang terdiri dari rantai

α dan β . Rantai β (CD18) diekspresikan oleh neutrofil dan berpasangan dengan rantai α (CD11). Molekul CD11/ CD18 mengikat ligan termasuk intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). Kemokin yang dilepaskan ke permukaan sel endotel akan berikatan dengan reseptor spesifik yang terdapat di permukaan neutrofil. Interleukin-8 memacu perubahan integrin (Abbas AK, 2012; Mizgerd JP, 2002).

II.1.6 Diagnosis Pneumonia

Untuk menegakkan diagnosis pneumonia dapat dinilai dari gambaran klinismya yaitu batuk, demam, nyeri dada, produksi sputum dan foto thoraks. Pada pemeriksaan fisik auskultasi paru dapat ditemukan suara nafas bronkial dan ronki. Pemeriksaan penunjang selain rontgen paru yaitu CT Scan yang lebih sensitif untuk pneumonia. Pemeriksaan mikrobiologi juga dibutuhkan untuk memutuskan terapi antibiotik yang tepat. Namun pemeriksaan mikrobiologi sangat bergantung terhadap kualitas sputum yang diambil, sehingga pemeriksaan molekular juga dibutuhkan. (Society., 1995)

Untuk mengidentifikasi etiologi pada pasien rawat jalan kultur darah dan sputum harus dilakukan. Jika pada fasilitas kesehatan tersedia pemeriksaan pewarnaan gram dan kultur sputum sebaiknya tetap dilakukan. Kultur darah, urin dan sputum diperiksa pada kondisi pneumonia yang berat. Pasien dengan kondisi pneumonia berat dan dilakukan tindakan intubasi dapat dilakukan pemeriksaan aspirasi endotrakeal. (Society., 1995)

II.1.7 Tatalaksana Pneumonia

Keberhasilan penatalaksanaan pneumonia berat sangat bergantung terhadap pemberian antibiotik yang tepat. Pemberian antibiotik yang tepat dan adekuat jika

dosis yang diberikan tepat atau optimal, obat dapat mencapai ke target infeksi, cara pemberian antibiotik baik secara intravena atau oral serta pemberian terapi kombinasi perlu dipertimbangkan. Untuk menentukan antibiotik yang diberikan, diperlukan pengetahuan tentang mikroorganismenya, pola resistensi kuman, juga pemilihan obat yang rasional. (Lutfiyya *et al.*, 2006) (Pneumonia, 2005) Pemberian antibiotik yang tidak adekuat dapat meningkatkan resistensi kuman dan menyebabkan kegagalan dari terapi. Syarat terapi empiris dikatakan adekuat jika satu atau lebih antibiotik yang digunakan sensitif terhadap kuman penyebab dan berdasarkan pola kuman setempat. (Lutfiyya *et al.*, 2006) (Pneumonia, 2005)

Diperlukan dosis antibiotik dengan efikasi tinggi pada penatalaksanaan pneumonia baik HAP, HCAP, dan VAP. Pemberian dosis antibiotik untuk pneumonia baik HAP, HCAp, dan VAP dapat dilihat pada tabel 2.3 (Chastre and Fagon, 2001). Prinsip deeskalasi antibiotik merupakan strategi untuk infeksi bakteri yang berat pada HAP dan VAP. Pada pemberian antibiotik yang tidak adekuat atau lambat akan meningkatkan risiko kematian. Dengan melihat respons klinis pasien dalam 2 sampai 3 hari dan ditemukan hasil kultur dari sekret saluran napas bawah, menjadi pertimbangan dalam pemilihan atau penggantian jenis antibiotik. (Chastre and Fagon, 2001)

Tabel 2.3. Rekomendasi antibiotik empiris pada HAP atau VAP sesuai jenis kuman

Mikroba	Antibiotika
Onset dini tanpa faktor risiko	
spesifik	Seftriakson
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	atau
<i>Haemophilus influenza</i>	Levofloksasin, Moxifloksasin atau
<i>Methicillin-sensitive</i>	Siprofloksasin
<i>staphylococcus aureus</i>	atau
	Ampisilin/Sulbaktam

Bakteri gram negatif sensitif atau antibiotik	atau Ertapenem
<i>Enterobacter spp</i>	
<i>Eschericia coli</i>	
<i>Klebsiella pneumonia</i>	
<i>Proteus spp</i>	
<i>Serratia marcescens</i>	
Onset lambat dengan faktor risiko kuman MDR	Sephalosporin Antipseudomonas (Cefepim,Ceftazidim)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Klebsiella pneumonia</i> (ESBL)	atau Karbapenem antipseudomonas (Imipenem atau Meropenem)
<i>Acinetobacter spp</i>	atau
<i>Methicillin-resistant staphylococcus aureus</i> (MRSA)	β -laktam/ penghambat β -laktamase (Piperacillin-Tazobactam) ditambah Antipseudomonas flurokuinolon (Ciprofloksasin atau Levofloksasin) atau Aminoglikosida (Amikasin, Gentamisin atau Tobramisin) ditambah Linezolid atau Vancomisin

Dikutip dari (Chastre and Fagon, 2001)

Tabel 2.4. Anjuran dosis empiris antibiotik intravena pada VAP, HAP dan HCAP dewasa onset lambat atau dengan faktor risiko kuman MDR

Antibiotik	Dosis
Sefalosporin antipseudomonas	
Cefepim	1 – 2 g tiap 8 – 12 jam
Ceftazidim	2 g tiap 8 jam
Karbapenem	
Imipenem	500 mg tiap 6 jam atau 1 g tiap 8 jam
Meropenem	1 g tiap 8 jam
Kombinasi β laktam - penghambat β laktamase	
Piperasilin-Tazobaktam	4,5 g tiap 6 jam

Aminoglikosida	
Gentamisin	7 mg/kg/hari
Tobramisin	7 mg/kg/hari
Amikasin	20 mg/kg/hari
Kuinolon antipseudomonas	
Levofloksasin	750 mg tiap hari
Ciprofloksasin	400 mg tiap 8 jam
Vankomisin	15 mg/kg tiap 12 jam
Linezolid	600 mg tiap 12 jam

Dikutip dari (Chastre and Fagon, 2001)

Perlu dipertimbangkan farmakodinamik antibiotik spesifik untuk menyeleksi dosis yang adekuat. Beberapa jenis antibiotik tidak dapat mencapai lokasi infeksi dan tidak tercapainya konsentrasi tinggi. Seperti antibiotik β -laktam sebagian besar memiliki konsentrasi di paru hanya mencapai kurang dari 50%. Berbeda dengan fluorokuinolon dan linezolid memiliki konsentrasi serum yang tinggi di sekret bronkial. Mekanisme yang dimiliki antibiotik tertentu dapat mempengaruhi dosis, efikasi dan toksisiti. Sifat dari antibiotik salah satunya ada yang bakterisid dan ada juga bakteriostatik. Golongan aminoglikosida dan golongan kuinolon salah satu yang bekerja secara bakterisid. Pada *concentration-dependent killing* yang tinggi, golongan bakterisid dapat membunuh kuman secara lebih cepat. Konsentrasi yang subletal dapat mencetuskan resistensi. Melalui prinsip farmakokinetik dan farmakodinamik optimalisasi terapi dapat tercapai dan dapat mengurangi kejadian resistensi. Lama pemberian obat dipengaruhi konsentrasi obat yang ada di atas garis *minimal inhibitor concentration* (MIC) ($T > MIC$) dan bisa membunuh kuman. Seperti pada antibiotik β -laktam, karbapenem, monobaktam, glikopeptida dan linezolid, obat ini bersifat *time dependent killing*, diantara 2-4 MIC memiliki efek yang maksimal dan jika $T > MIC$ lebih dari atau

sama dengan 40% memiliki kemampuan untuk membunuh kuman.(Pneumonia, 2005):(J.E. *et al.*, 2002)

II.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae termasuk kedalam suku Klebsiellae, dan famili enterobacteriaceae. Seorang microbiologist yang berasal dari Jerman, Edwin Klebs yang pertama kali menemukan pada abad 19. Memiliki sifat yang nonmotile, rod-shaped, dan termasuk bakteri gram negatif dengan kapsul polisakarida yang prominen. Terdapat 2 tipe antigens pada permukaan selnya, yaitu antigen O dan antigen K. Kedua antigen tersebut berkontribusi terhadap patogenitas. *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* dan *Klebsiella granulomatis* merupakan spesies *Klebsiella* yang menyebabkan penyakit pada manusia : (Lim *et al.*, 2009)

Pada akhir abad 19 pertama kali *K. pneumoniae* strain hipervirulen (HV) diisolasi pada dan awalnya dikenal sebagai Bakteri Friedlander. Beberapa perbedaan strain klasik dengan *K. Pneumoniae* strain hipervirulen dapat dilihat pada Tabel 2.5 (Paczosa, 2016).

Tabel 2.5. Karakteristik *Klebsiella pneumoniae* strains Klasik dan Hypervirulent

Parameter	Characteristic(s) for strain type		References
	Classical	Hypervirulent	
Common types of infection	Pneumonia, UTI, bacteremia	Pyogenic liver abscess; bacteremia; lung, neck, and kidney abscesses; pneumonia; cellulitis; necrotizing fasciitis; myositis, meningitis; endophthalmitis	37, 42
Susceptible population(s)	Immunosuppressed (diabetics, patients with malignancies)	Diabetics, healthy people	32, 34, 35, 43, 44
Capsule type(s)	Capsule serotypes K1–K78	Hypercapsule serotype K1 (93%) or K2	38, 79, 226, 227, 235
Siderophores (% of strains expressing siderophore)	Enterobactin (100), yersiniabactin (17–46), salmochelin (2–4), aerobactin (6)	Enterobactin (100), yersiniabactin (90), salmochelin (>90), aerobactin (93–100)	227, 318, 319, 321, 329, 335
Geographical concentration	Worldwide	Primarily Taiwan and Southeast Asia	38–41
Primarily acquired infection type	Nosocomial	Community acquired	41, 48, 49
Frequency of reports of antibiotic resistance	Frequent (ESBL and carbapenemase producing)	Infrequent	45, 324, 325

Dikutip dari (Paczosa, 2016)

II.2.1 Patofisiologi

Pertahanan host terhadap infeksi bakteri sangat dipengaruhi fagositosis dari polymorphonuclear granulocytes dan efek bakterisidal serum. Peranan penting dari neutrophil myeloperoxidase dan lipopolysaccharide-binding protein pada host untuk melawan infeksi *K pneumoniae*. Neutrophil myeloperoxidase menginaktivasi oksidasi elastase, enzim yang berfungsi untuk merusak jaringan diberbagai penyakit. Komponen dari dinding sel bakteri menuju sel inflamasi difasilitasi oleh Lipopolysaccharide-binding protein. Penelitian pada mencit dengan gen yang defisiensi dua agent ini, memperlihatkan infeksi yang kuat. (Lim *et al.*, 2009)

Innate host immunity dapat dilewati bakteri melalui beberapa cara. Salah satunya melalui kapsul polisakarida sebagai patogenesis utama. Kapsul polisakarida mengandung asid polisakarida kompleks, yang berfungsi melindungi bakteri dari fagositosis polimorfonuklear granulosit. Kematian bakteri dapat dicegah karena adanya faktor serum bakterisid pada kapsul. (Lim *et al.*, 2009)

Salah satu faktor patogen bakteri adalah lipopolisakarida. Lipopolisakarida mampu mengaktifasi komplemen, dan menyebabkan deposisi C3b pada molekul LPS pada membran sel bakteri. Hal ini bertujuan untuk menghambat pembentukan membrane attack complex (C5b-C9) yang mencegah kerusakan membran dan kematian sel bakteri. (Lim *et al.*, 2009)

II.2.2 Epidemiologi Klebsiella

Pada manusia *K. Pneumoniae* dapat berkoloni di kulit, faring, gastrointestinal, luka yang steril, dan urin. *Klebsiella* merupakan flora normal pada colon, traktus intestinal dan traktus billier. Pada infeksi *Klebsiella* di orofaring sering kali berhubungan dengan tindakan intubasi endotrakeal, gangguan pertahanan host dan penggunaan antibiotik yang irasional. Infeksi pada paru menyebabkan destruksi dari sel parenkim paru. Ditemukan sputum seperti jelly, sampai sputum yang berdarah akibat dari nekrosis, inflamasi dan perdarahan. Insiden infeksi *Klebsiella* lebih sering pada usia pertengahan dan laki laki usia lanjut dengan kondisi seperti alkoholisme, komorbid diabetes melitus, dan penyakit bronkopulmoner kronik. (Lim *et al.*, 2009)

Klebsiellae bisa juga menyebabkan infeksi nosokomial. Infeksi *Klebsiella* dapat berupa pneumonia, bakterimia, tromboplebitis, infeksi saluran kemih, kolesistitis, diare, infeksi saluran napas atas, infeksi luka, osteomilitis sampai meningitis. Peningkatan infeksi nosokomial yang disebabkan oleh *Klebsiella* dapat disebabkan karena alat alat invasif, alat respirasi yang terkontaminasi, penggunaan kateter urin dan penggunaan antibiotik. (Lim *et al.*, 2009)

Studi di Malaysia dan Jepang menemukan insiden pada usia lanjut sebesar 15-40%. Di US ditemukan pada orang dengan alkoholisme memiliki risiko yang tinggi sekitar 66%, mortalitas yang tinggi sebesar 50% sampai 100% pada orang dengan alkoholisme dan bakterimia. (Lim *et al.*, 2009) *Klebsiella pneumoniae* salah satu penyebab kasus hcap dan hap yang serius. Terapi antibiotik pada HCAP yang utama adalah golongan β -lactam. Kondisi resisten terhadap antibiotik ini merupakan tantangan pada rumah sakit. (Bachman *et al.*, 2011)

Dua mekanisme pada resistensi golongan carbapenem pada *K.pneumoniae*: produksi *extended-spectrum β -lactamase* (cephalosporinase atau ESBL) yang dihubungkan dengan porin loss dan produksi dari carbapenemhydrolyzing β -lactamase yaitu Ambler's class A carbapenemases (KPC-type), class B metallo- β -lactamase (VIM-, NDM- atau IMP-type) atau class D carbapenemase OXA-48. Peningkatan MBL-producing *K.pneumoniae* secara global sehingga diperlukan evaluasi regimen dalam terapi infeksi karena strain ini. (Bachman *et al.*, 2011)

Klebsiella pneumoniae termasuk ke dalam patogen yang *multi drug resistance*, khususnya *K. pneumoniae* carbapenemases (KPCs). *K. Pneumoniae* memerlukan iron untuk replikasi dan menggunakan ironscavenging siderophores, seperti enterobactin (Ent). Untuk meniadakan Ent, netrofil dan permukaan mukosa memproduksi innate immune protein lipocalin 2 (Lcn2, atau neutrophil gelatinase-associated lipocalin [NGAL], siderocalin, 24p3, atau uterocalin). Lcn2 mengikat Ent pada cup-shaped ligand site, kompetisi dengan reseptor bakteri Ent, dan menjadi bacteriostatik. Lcn2 juga menstimulasi respons inflamasi akut saat berikatan dengan ferric Ent, yang menginduksi chemokine interleukin 8 (IL-8) dan promosi neutrophil influx sebagai respons terhadap *K. pneumoniae* nasal colonization. (Bachman *et al.*, 2011)

Dua kategori pneumonia yang disebabkan *K. pneumoniae*: pneumonia yang didapat masyarakat (CAP) dan pneumonia yang didapat di rumah sakit (HAP). Penjelasan mengenai dua kategori pneumonia yang disebabkan *K.pneumoniae* dapat dilihat pada Tabel 2.6 (Paczosa, 2016).

Tabel 2.6. Karakteristik infeksi *Klebsiella pneumoniae* nosokomial dan community

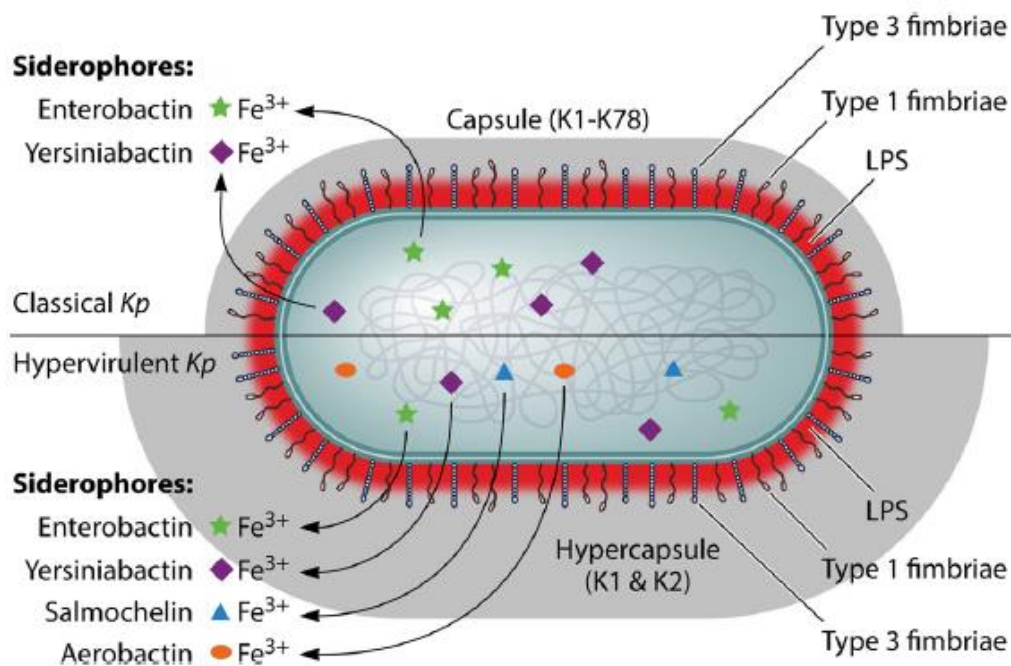
Parameter	Characteristic(s) for infection type	
	Nosocomial	Community acquired
Types of infection	Pneumonia, UTI, bacteremia	Pyogenic liver abscess, UTI, meningitis
Frequency as etiological agent of pneumonia (%)	11.8	3–5 in North America, Europe, and Australia; 15 in Asia and Africa
Frequency as etiological agent of UTIs (%)	2–6	4.3–7
Common underlying conditions	Diabetes, malignancies	Malignancies, diabetes, chronic obstructive pulmonary disease, chronic alcoholism
Antibiotic resistance rate (%)	23 for ESBL-producing strains, 11 for carbapenemase-producing strains	
Primary strain type(s)	Classical	Classical and HV

Dikutip dari (Paczosa, 2016)

II.2.2 Struktur *Klebsiella pneumoniae*

Terdapat empat kelas utama faktor virulensi pada *K. Pneumoniae*. Empat faktor virulensinya yaitu: kapsul, LPS, fimbriae (tipe 1 dan tipe 3) dan siderophores

Gambar 2.6. (Paczosa, 2016)



Gambar 2.6. Empat faktor virulensi Strain *K. pneumoniae* (*Kp*) klasik dan hipervirulen

Kapsul adalah matriks polisakarida ekstraseluler yang membungkus bakteri. Strain *K. pneumoniae* klasik menghasilkan kapsul salah satu serotipe K1 hingga K78; K1 dan K2 dikaitkan dengan peningkatan patogenisitas. Strain HV membuat hiperkapsul, yang memperkuat produksi bahan kapsuler, menghasilkan kapsul yang relatif lebih besar dan lebih dominan dari serotipe K1, sedangkan strain yang tersisa adalah serotipe K2. LPS, bagian membran luar, diproduksi oleh *K. pneumoniae* klasik dan HV dan dapat berupa serotipe O-antigen 1 sampai 9 (O1 hingga 9). Kedua jenis *K. pneumoniae* membuat struktur *membrane-bound adhesive*, fimbriae type 1 dan type 3, dan mensekresikan siderofor pemulung besi. Dari siderofor, enterobactin dibuat oleh hampir semua strain, dan yersiniabactin dibuat oleh sekitar setengah dari strain klasik dan hampir semua strain HV. Salmochelin dan aerobaktin jarang diproduksi oleh strain klasik tetapi biasanya disekresikan oleh

strain HV, dengan aerobaktin menjadi yang paling tinggi diekspresikan oleh siderophores.(Paczosa, 2016)

II.3 MAKROFAG

Makrofag adalah sel darah putih yang berukuran besar, yang mencerna mikroba, antigen dan zat-zat lainnya. Sitoplasma makrofag mengandung beberapa granula dan melepaskan berbagai bahan, antara lain enzim lisosom, komplemen, interferon dan sitokin yang semuanya memungkinkan mencerna dan menghancurkan mikroba yang tertelan oleh makrofag. Makrofag tidak ditemukan di dalam darah, tetapi terdapat di tempat-tempat strategis, dimana organ tubuh berhubungan dengan aliran darah atau organ luar. Misalnya makrofag ditemukan di daerah di mana paru-paru menerima udara dari luar dan sel-sel hati berhubungan dengan pembuluh darah. Makrofag ini termasuk sistem fagosit mononuklear, makrofag dulu disebut dengan *Retikulo Endotelial System* (RES), untuk sel-sel yang sangat fagositik yang tersebar luas di seluruh tubuh terutama pada daerah yang kaya akan pembuluh darah (KG, 2002)

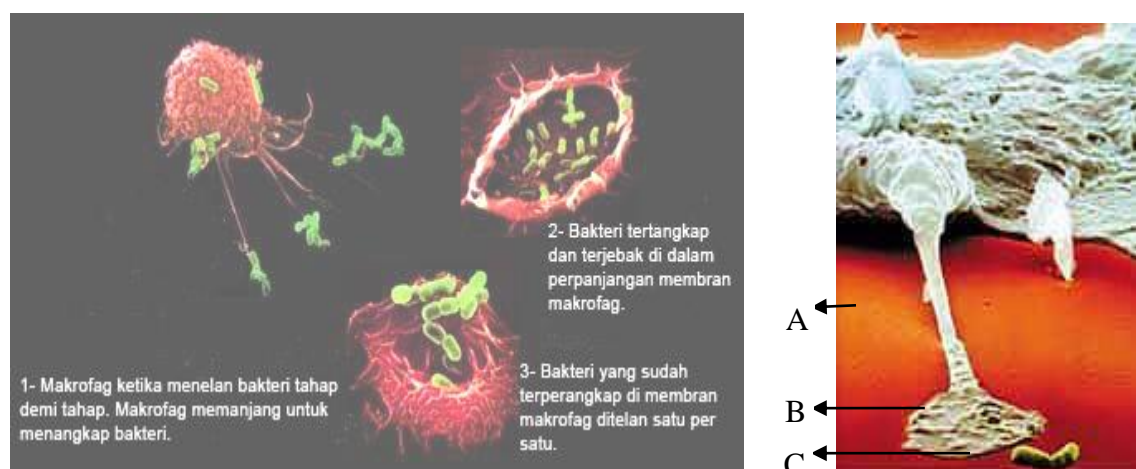
II.3.1 Perkembangan Makrofag

Makrofag terutama berasal dari sel prekursor sum-sum tulang dari promonosit yang akan membelah menghasilkan monosit yang beredar dalam darah. Pada tahap kedua monosit bermigrasi ke dalam jaringan ikat tempat mereka menjadi matang disebut makrofag. Di dalam jaringan, makrofag dapat berproliferasi secara lokal menghasilkan sel sejenis lebih banyak. Keberadaan sel-

sel sistem makrofag terdapat pada jaringan ikat longgar berupa makrofag atau histiosit, di dalam darah berupa monosit, dalam hati melapisi sinusoid dikenal sebagai sel kupffer, makrofag perivaskular sinusoid limfa, limfonodus dan sumsum tulang dan pada susunan syaraf pusat berupa microglia berasal dari mesoderm.(Kresno, 2001)

II.3.2 Mekanisme Kerja Makrofag

Fagositosis merupakan suatu proses atau cara untuk memakan mikroorganisme atau benda asing yang dilakukan setelah benda asing melekat pada permukaan makrofag sehingga makrofag membentuk sitoplasma dan melekok ke dalam membungkus bakteri atau benda tersebut. Tonjolan sitoplasma (pseudopodia) yang saling bertemu itu akan melebur menjadi satu sehingga benda asing atau bakteri akan tertangkap di dalam sebuah vakuola fagostik intrasel. Enzim lisosom merupakan sistem pencernaan intrasel makrofag dengan kemampuan memecah materi yang berasal dari luar maupun dari dalam. Jadi lisosom akan menyatu dengan vakuola akan memusnahkan bakteri atau benda asing tersebut (Efendi, 2003) .



Gambar 2.7. Makrofag (A) berusaha menjangkau bakteri (C) dan menangkapnya dengan perpanjangan membran yang disebut pseudopodia (B).

Dikutip dari (Efendi, 2003)

II.3.2 Fungsi Makrofag

Sifat fagositik atau gerakan amuboidnya aktif dalam pertahanan tubuh terhadap mikroorganisme, memiliki reseptor untuk immunoglobulin pada membran selnya. Makrofag mempunyai fungsi utama memakan partikel (fagositosis) dan dicerna oleh lisosom dan menyalurkan sederetan substansi yang berperan dalam fungsi pertahanan dan perbaikan. Dalam sistem imun tubuh, sel ini berperan serta dalam mempengaruhi aktivitas dari respons imun, menelan, memproses dan menyimpan antigen dan menyampaikan informasi pada sel-sel berdekatan secara imunologis (limfosit dan sel plasma). Makrofag yang aktif merupakan sel sekretori yang dapat mengeluarkan beberapa substansi penting termasuk enzim lisozim, elastase, kolagenase, dua protein dari sistem komplemen dan agen anti virus yaitu interferon (Kresno, 2001):(Efendi, 2003)

II.3.3 Aktivasi Makrofag

Makrofag terlibat dalam semua respons imun, dimulai dengan makrofag menangkap antigen kemudian memprosesnya lalu menyajikan antigen yang telah diproses dan diikat pada MHC kelas II kepada sel T-helper (Th). Dengan demikian makrofag berfungsi mengaktifkan limfosit. Sel Th teraktivasi memproduksi berbagai faktor kemotaktik yang menarik lebih banyak makrofag, granulosit dan limfosit. Setelah mengaktifkan limfosit, peran makrofag selanjutnya adalah meningkatkan proses inflamasi, tumorisidal dan mikrosidal. Aktivitas makrofag

dipengaruhi oleh *Macrophage Activating Factor* (MAF), IFN-gamma (Interferon gamma) dan IL-3 (Interleukin 3) yang disekresikan oleh sel T (Kresno, 2001)

Fagosit sangat penting untuk pertahanan terhadap bakteri. Metchnikoff menemukan bahwa, neutrofil dan mononuklear fagosit menelan, membunuh dan mencerna mikroba. Umumnya, neutrofil fokus pada fagosit ekstraseluler dan mononuklear pada patogen intraseluler. Patogen ekstraseluler sering menghindari fagositosis, sedangkan bakteri intraseluler sering membiarkan proses menelannya dan kemudian memblokir pembunuhan intraseluler. Selanjutnya, fagosit terlibat dengan parenkim dan sel imun untuk reaksi inflamasi, penyembuhan jaringan dan remodeling. Hal ini memungkinkan host untuk mengatasi berbagai jenis mikroba. (Kaufmann and Dorhoi, 2016)

II.4 Monocyte Chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2)

Monocyte Chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) adalah kelompok famili C-C kemokin dan merupakan faktor kemotaktik poten dari kemokin. Kemokin atau sitokin kemotaktik sendiri adalah suatu protein kecil yang berikatan dengan heparin yang tersusun dari kelompok besar peptida (60-100 asam amino) dan strukturnya terkait dengan sitokin yang fungsi utamanya untuk regulasi sel. Kemokin menginduksi kemotaksis melalui aktivasi dari *G-protein coupled receptors* (GPCRs). CCL2 adalah kemokin CC pada manusia yang ditemukan pertama kali. CCL2 memiliki ukuran 13 kDa, berlokasi di kromosom 17 dan terbentuk dari 76 asam amino. MCP-1 sendiri merupakan kelompok MCP yang terdiri dari MCP-1, 2, 3, dan 4. CCL2 diproduksi oleh berbagai jenis sel, baik secara konstitusional atau setelah diinduksi oleh stres oksidatif, sitokin atau faktor pertumbuhan. Terdapat dua daerah dari struktur primer terkait aktivitas biologi

CCL2. Daerah pertama terdiri dari sekuens dari Thr-10 dan Tyr-13 dimana daerah kedua terdiri dari residu 34 dan 35. Kedua daerah tersebut penting untuk aktivitasnya dibuktikan dari mutasi daerah tersebut menyebabkan penurunan fungsi (Deshmane SL et al, 2009).

CCL2 diproduksi oleh banyak jenis sel, termasuk diantaranya endotelial, fibroblas, epitel, otot polos, mesangial, astrositik, monosit, dan sel mikroglia. Sel ini sangat penting untuk respons imun antivirus di sirkulasi perifer dan jaringan. Sumber utama CCL2 adalah monosit/ makrofag. CCL2 berfungsi dalam mengatur migrasi dan infiltrasi monosit, limfosit T memori, dan sel natural killer (NK cell). CCL2 paling sering diteliti dari kemokin lain dimana dikatakan CCL2 memiliki potensi menjadi intervensi tatalaksana berbagai penyakit, termasuk multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, atherosclerosis, dan diabetes mellitus tipe 2. CCL2 direkrut monosit untuk fokus inflamasi aktif. Selain itu, CCL2 juga dapat memengaruhi imunitas sel T. Pertama, ekspresi dari CCL2 terkait dengan respons Th2 terpolarisasi dan dapat meningkatkan sekresi IL-4 oleh sel T. Kedua, penyakit terkait sistem imun Th2, seperti asma, CCL2 diekspresikan pada kadar yang tinggi dan netralisasinya pada percobaan hewan dapat menghilangkan penyakit. Akhirnya, kemokin lain dan reseptornya terkait dengan respons sel T-helper. CCL2 juga dapat secara langsung mengaktifasi promotor IL-4 sehingga produksi IL-4 meningkat di sel dengan stimulus dari T cell receptor (TCR) yang dapat menginisiasi proses diferensiasi limfosit T (Deshmane SL et al, 2009).

Baik CCL2 dua maupun reseptornya CCR2 terlibat dalam berbagai penyakit dapat dilihat pada table 7 dibawah ini. Hal ini dilihat dari percobaan pada tikus dan juga studi epidemiologi pada manusia.

Tabel 2.7. Keterlibatan CCL2 di berbagai penyakit

<i>Effects</i>	<i>Mechanism</i>	<i>References</i>
Thrombus formation	By generating tissue factor	Charo and Taubman 2004
Tuberculosis	Lower levels of IL-12 p40	Flores-Villanueva and others 2005
Immunotolerance in endometriosis	Apoptosis of T-lymphocytes	Salem and others 2006
Recurrent miscarriage	IL-1 β -induced MCP-1	Huang and others 2006
Viral clearance from CNS	Increased infiltration of T lymphocytes	Carmen and others 2006
Multiple sclerosis	Correlation between CCL2 and axonal damage	Tanuma and others 2006
Secondary progressive multiple sclerosis	CCL2 and IP-10 in hypertrophic astrocytes	
Nociception (perception of pain)	CCL2-mediated depolarization of neurons	Sun and others 2006
HIV-neurological complications	Tat-mediated upregulation of COX-2, MCP-1, IL-1 β , TNF- α , and iNOS, and activation of microglial cells	Flora and others 2005
Oxygen-induced injury (retinopathy)	Marked increase in CCL2 in microglia/macrophages	Davies and others 2006
HIV-associated neurocognitive impairment	Correlation between plasma MCP-1 and tissue status TNF- α and anisotropy measurements	Ragin and others 2006
Tumor neovascularity	CCL2 influence by affecting macrophage infiltration	Wang and others 2006
Brain development and heterologous desensitization, influence of neuronally active pharmacological agents such as opioids and cannabinoids	Chemokine-based intracellular communication interaction with neurotransmitter systems	Adler and others 2006
Nephropathy	p38 MAPK phosphorylation	Granata and others 2006
Inflammatory bowel disease	CCL2-mediated differentiation of intestinal macrophages	Spoettl and others 2006
Allergic asthma	IL-4 and IL-13-induced release of CCL2 in bronchial epithelium	Ip and others 2006
Rheumatoid arthritis	Increased CCL2 before onset	Rantapaa-Dahlqvist and others 2007
Insulin resistance	Increased MCP-1, TNF- α , and IL-6	Kamei and others 2006
Ischemia-related neuronal death	Astrocytes expressing CCL2, MIP1- α , and cells expressing its receptors	Sakurai-Yamashita and others 2006
Excitotoxic (NMDA) neuronal injury	CCL2 production by astrocytes	Katayama and others 2002

Dikutip dari (Deshmane SL et al, 2009)

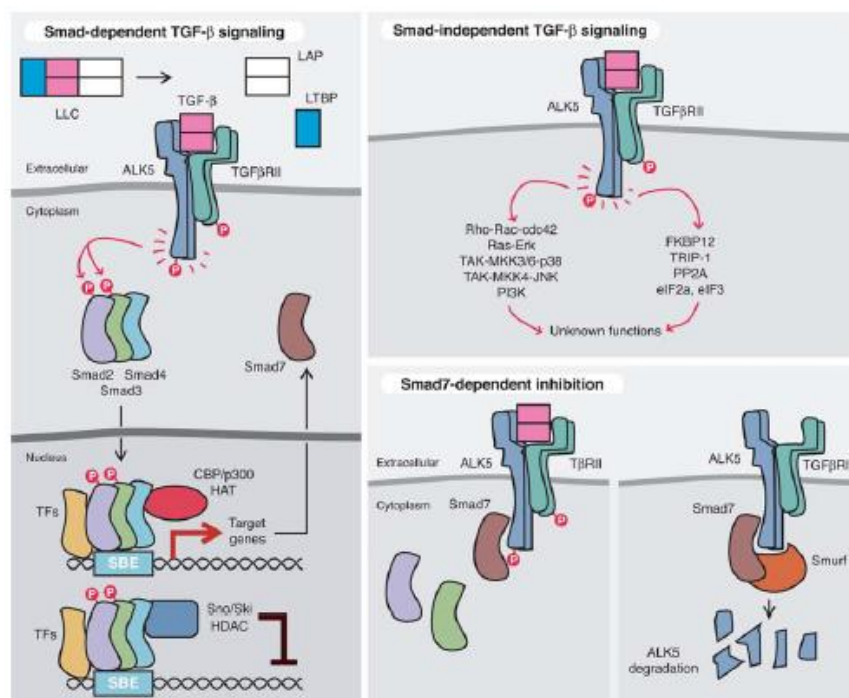
Monocyte chemoattractant protein (MCP) -1, juga dikenal sebagai chemokine C – C motif ligand-2, diproduksi oleh berbagai sel, seperti monosit, makrofag, limfosit, dan sel epitel jalan napas sebagai respons terhadap inflamasi. (Standiford et al., 1991) MCP-1 telah dibuktikan sebagai kemoatraktan monosit dan makrofag, neutrofil, dan sel T yang kuat untuk melawan infeksi bakteri paru; efek ini disebabkan MCP-1 mengikat reseptor tunggal chemokine C – C motif reseptor 2 (CCR2). Mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi bakteri paru bergantung pada perekrutan neutrofil, monosit, dan makrofag yang efektif di tempat infeksi. (Murphy, 2000)

II.5 Transforming Growth Factor - β (TGF- β)

Transforming Growth Factor - β (TGF- β) adalah sitokin regulator poten dengan berbagai efek pada sel hematopoiesis. Fungsi TGF- β pada sistem imun adalah untuk menjaga toleransi melalui regulasi proliferasi limfosit, diferensiasi, dan survival. Selain itu, TGF- β juga mengatur inisiasi dan resolusi dari respons inflamasi melalui regulasi kemotaksis, aktivasi dan survival limfosit, sel natural killer, sel dendritik, makrofag, sel mast, dan granulosit dan terlibat dalam berbagai proses biologis termasuk perkembangan, karsinogenesis, fibrosis, penyembuhan luka, dan respons imun. TGF- β juga menghambat perkembangan imunopatologi terhadap diri sendiri atau terhadap antigen tidak berbahaya tanpa mengganggu imun terhadap patogen (Li MO et al, 2006).

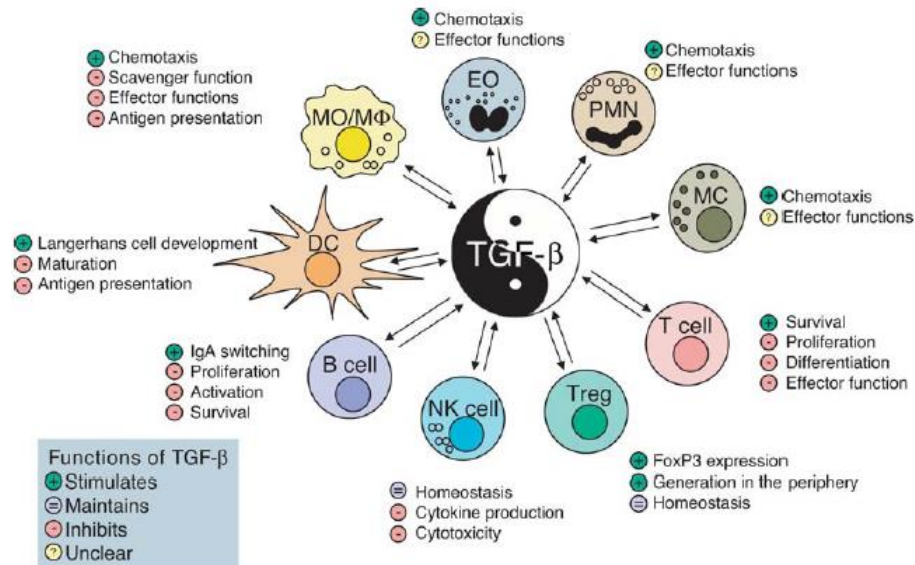
TGF- β disintesis sebagai prekursor prepro-TGF- β . pre region memiliki peptida signal dan pro-TGF- β diproses di Golgi oleh furin-like peptidase dimana N-terminus dari protein imatur, propeptida dibuang hingga menjadi *latency associated protein* (LAP). Selanjutnya, LAP berikatan secara nonkovalen dengan homodimer matur TGF- β dan disebut TGF- β laten atau *small latent complex* (SLC). SLC juga dapat disekresikan dengan hubungan ke *latent-TGF- β -binding protein* (LTBP) sebagai *large latent complex* (LLC). TGF- β tidak dapat berikatan dengan reseptornya dalam bentuk laten sehingga harus dipisahkan dari LAP dan LTBP yang bisa tercapai dengan menggunakan pH atau panas ekstrim, atau beberapa protease. TGF- β mendapat fungsi melalui ALK5 dan TGF- β reseptor II (TGF- β RII). TGF- β mentransduksi sinyal melalui jalur smad-dependent dan smad-independent. ALK yang teraktivasi akan memfosforilasi smad2 dan smad3 yang akan bertranslokasi ke dalam nukleus di kompleks dengan smad4. Kompleks smad

berikatan dengan promoter target yang berikatan dengan faktor transkripsi (TFs) dan mengatur ekspresi gen melalui rekrutmen HAT atau HDAC. Salah satu target TGF- β adalah *smad7* yang akan menurunkan regulasi TGF- β dengan berkompetisi dengan *smad2* dan *smad3* untuk ikatan ALK5, dan dengan mendegradasi ALK5 melalui rekrutmen *smurf*-containing E3 ubiquitin ligase complexes. PI3K dan berbagai MAPK juga teraktivasi oleh TGF- β dan setelah reseptor TGF- β teraktivasi fungsi dari FKBP12, TRIP-1, PP2A, eIFs dengan berikatan langsung (Li MO et al, 2006).



Gambar 2.8. Transduksi sinyal TGF- β melalui jalur smad-dependent dan independent

Dikutip dari (Li MO et al, 2006)



Gambar 2.9. Efek TGF- β pada leukosit

Dikutip dari (Li MO et al, 2006)

TGF- β 1 adalah sitokin multifungsi yang memainkan peran penting dalam patogenesis beberapa penyakit infeksi yang kronis. (Tsunawaki, 1988) Secara khusus, kemampuan TGF untuk mengganggu aktivasi dan mekanisme oksidatif makrofag telah terlibat dalam mempromosikan infeksi persisten dengan memberikan keuntungan kelangsungan hidup bagi patogen. Dalam hal ini, kemampuan patogen untuk mendapatkan ekspresi TGF telah dihipotesiskan sebagai sifat virulensi potensial (Gantt et al., 2003) Sedikit yang diketahui tentang peran TGF dalam infeksi kriptokokus, meskipun Kawakami et al. menunjukkan peningkatan pesan TGF selama tahap selanjutnya dari infeksi paru eksperimental pada tikus. Karena penurunan inflamasi dan penurunan fungsi makrofag adalah karakteristik kriptokokosis paru persisten pada tikus yang menentukan peran TGF dalam sistem ini. Dari penelitian tersebut diketahui peran baru TGF dimana sitokin ini ditemukan menurunkan produksi kemokin oleh makrofag namun meningkatkan

aktivitas antijamurnya dengan meningkatkan sekresi lisozim. (Kawakami et al, 1996)

II.6 Ekspresi genetik sebagai Penanda Awal Penyakit

Tubuh manusia hidup dengan dipengaruhi oleh aktivitas rangkaian gen yang berada dalam kondisi diam atau teraktivasi dan diekspresikan berdasarkan kebutuhan tubuh. Peralihan antara keduanya diatur oleh faktor transkripsi yang membentuk *transcription initiation complex* (TIC). Faktor transkripsi ini terkait dengan berbagai efek biologis berbagai gen yang terlibat. Dengan demikian, gen yang akan diaktivasi harus bisa berikatan dengan segmen DNA yang disebut elemen respons yang berada di antara berbagai gen tersebut. Elemen respons ini bersama dengan faktor transkripsi akan membentuk TICs yang spesifik untuk masing-masing gen. Berbagai studi telah dilakukan di berbagai laboratorium untuk mengetahui gen yang teraktivasi pada kondisi-kondisi tertentu dengan metode pendekatan komparatif (diferensial) dimana suatu sampel uji (target) yang memiliki gen aktif akan dibandingkan dengan sampel kontrol dimana gen yang ada belum teraktivasi. Dengan demikian, gen yang aktif akan terpisah dari banyak gen yang inaktif. Selain memberikan hasil gen yang di-up-regulasi, hasil yang muncul dapat menunjukkan aktivasi yang berlawanan, yaitu pada gen yang di-downregulasi. Aktivitas gen ditandai dengan transkripsi gen tersebut menjadi mRNAs sebagai langkah awal proses sintesis protein spesifik. Pada metode pemeriksaan gen, mRNAs yang disiapkan dari jaringan uji dan kontrol masing-masing sudah ditranskripsi terbalik menjadi *deoxyribonucleic acid* komplementer yang sesuai (cDNA) agar memungkinkan peningkatan substansi bahan untuk analisis dengan

polymerase chain reaction (PCR). Kebanyakan metode tidak menggunakan transkripsi mRNA penuh tetapi dengan sekuens atau urutan yang lebih pendek sehingga alokasi sekuens untuk gen yang diketahui atau tidak harus ditemukan dengan program komputer lanjut atau database gen (Cekan SZ 2004).

Analisis ekspresi RNA memiliki 3 kegunaan penting. Kegunaan pertama adalah untuk subklasifikasi penyakit dimana dengan menganalisis pola ekspresi gen dalam skala besar, peneliti dapat melihat persamaan antara populasi pasien misalnya pada pasien kanker serta pada studi untuk melihat respons kerentanan terhadap kemoterapinya. Kegunaan kedua adalah untuk identifikasi gen kunci pada proses biologis. Langkah yang dilakukan yaitu dengan melihat gen-gen yang diinduksi atau direpresi dan kemudian akan diambil gen utama untuk diteliti lebih lanjut untuk mendapat informasi terkait gen yang telah diketahui dan untuk menjelaskan peranan baru dari gen tersebut. Fungsi yang ketiga adalah untuk penentuan jaras biologis dimana ekspresi gen dapat memberikan pemahaman terkait kompleksitas dari gen-gen yang saling berinteraksi dalam jaringan yang luas serta protein yang dikodekan. Berbagai teknologi telah tersedia untuk menganalisis ekspresi mRNA atau untuk melihat perbedaan ekspresi mRNA diantaranya dengan menggunakan Northern blot, RT-PCR, *macroarray*, *microarrays*, *differential-display* RT-PCR, *serial analysis of gene expression* (SAGE), *comparative expressed sequence tag* (EST), atau *massively parallel signature sequencing* (MPSS) dimana masing-masing teknologi tersebut memiliki keuntungan dan kerugian masing-masing (Tabel 2.8) (Fryer RM et al 2002). Terdapat 2 pendekatan yang dapat dilakukan. Pendekatan pertama yaitu dengan *individual identificational* dan yang kedua adalah dengan identifikasi dari profil ekspresi setelah hibridisasi

dengan set fragmen gen yang telah diketahui (probes) yang terpasang pada chips di microarray. Metode *single-gen* dapat digunakan untuk menemukan dan mengidentifikasi gen baru yang belum diketahui sedangkan microarrays dapat melihat gen yang sudah diketahui dalam jumlah besar untuk melihat profil ekspresinya (Cekan SZ 2004). Pada Tabel 2.8 dapat dilihat keuntungan dan kerugian metode analisis ekspresi gen.

Tabel 2.8. Keuntungan dan kerugian metode analisis ekspresi gen

	Micro-arrays	Macro-arrays	MPSS	Northern blot	SAGE	RT-PCR	Differential-display RT-PCR	Comparative EST
Technical difficulty	••	•	•••	•	•••	•	•	••
Setup expense	•••	•	•••	•	••	••	••	•••
Cost of analysis	••	••	•••	•	•••	•	••	•••
Bioinformatics needs	•••	••	•••	•	•••	•	••	•••
Number of genes	•••	••	•••	•	•••	•	••	•••
Number of samples	••	••	•	•	•	•••	••	•
Flexibility	••	•••	••	•••	••	••	•••	••
Gene specificity	••	••	•••	•••	•••	••	••	•••

• = Low; •• = medium; ••• = high.

Dikutip dari (Fryer RM et al 2002)

Individual identification adalah ketika gen diidentifikasi masing-masing. Beberapa metode dapat digunakan diantaranya *differential display* yang merupakan metode paling sederhana dimana tampilan dari preparat uji dan kontrol akan dibandingkan sisi demi sisi dengan elektroforesis, hibridisasi subtraktif dengan pemisahan hidroksilapatite, hibridisasi subtraktif supresi dengan PCR, *expressed sequence tags* (EST), dan *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE). Metode SAGE memungkinkan analisis serial ekspresi gen (ribuan transkripsi). Pemeriksaan ini berdasarkan asumsi bahwa sekuens nukleotida pendek dengan 10 base pairs (bp) sudah memiliki informasi yang cukup untuk dapat mengidentifikasi transkripsi. SAGE lebih bermanfaat untuk studi ekspresi gen dibandingkan metode

yang menggunakan hibridisasi, dan lebih superior dibandingkan pendekatan EST karena memiliki efisiensi yang tinggi untuk mendeteksi gen yang diekspresikan dalam kadar rendah dan yang mewakili mayoritas gen di genome manusia (Cekan SZ 2004).

Analisis microarray DNA digunakan untuk identifikasi profil ekspresi gen pada jaringan yang yang diberikan. Ribuan sekuens cDNA atau oligonukleotida yang sudah diketahui dicetak pada chip (misalnya slide mikroskop atau membran nilon) menggunakan aplikasi. Biasanya, spot individu berukuran 100-300 mikrometer dan berjarak terpisah hampir sama. Lebih dari 30.000 sekuens dapat dipasang di permukaan sebuah chip yang berfungsi sebagai probe. Probe dapat disintesis secara *in situ* (60-mers). Sekuens target dengan hibridisasi (cDNAs atau cRNAs) terikat pada probe. Selanjutnya, pendekatan dasar adalah dengan membandingkan tingkat hibridisasi pada preparat kontrol dan uji. Terdapat 2 teknik dasar untuk mendeteksi hibridisasi yaitu dengan meletakkan preparat kontrol dan uji pada chip tunggal atau terpisah di dua chips. Pada teknik *single chip*, mRNA dari sel/ jaringan kontrol dan uji ditranskripsi terbalik secara terpisah dan dua pewarna fluoresen berbeda (misal Cy3-green, Cy5-red) akan tergabung dalam cDNA kontrol dan uji. Molekul yang telah diberi label kemudian dicampur dan dihibridisasi ke susunan cDNA. Masing-masing probe pada chip antara mRNA kontrol dan uji akan berkompetisi dimana cDNA uji secara selektif akan berikatan dengan beberapa probe, sedangkan cDNA kontrol berikatan dengan probe lain. Dengan menggunakan scanning fluoresen dapat dibedakan antara hibrida dengan sekuens kontrol (misal fluoresensi hijau) dan antara hibrida dengan sekuens uji (misal fluoresensi merah). Cara lain yaitu pewarna dapat dibalik serta cDNA

kontrol dan uji dapat diberi label dengan pewarna merah dan hijau masing-masing. Hibrida yang muncul ketika cDNA kontrol dan tes muncul dalam jumlah yang sama dapat terlihat fluoresensi kuning. Spot hitam menandakan tidak ada hibridisasi (Gambar 2.9). Pada teknik dua chip, mRNA dari jaringan atau sel uji dan kontrol ditranskripsi terbalik menjadi *double-stranded* cDNA dari cRNA yang telah disiapkan. cRNA kontrol dan uji dihibridisasi secara terpisah menjadi chips yang serupa kemudian ikatan dideteksi dengan memberikan warna dengan pewarna fluoresen ditambah dengan streptavidin. Intensitas sinyal digunakan untuk mengukur jumlah cRNA relatif untuk gen yang diwakili dan selanjutnya harus digunakan program komputer lanjutan untuk membandingkan intensitas dari kedua chips. Kombinasi dari metode 1 chip dan 2 chips dapat digunakan dalam studi dimana 2 chips digunakan bersama 2 pewarna fluoresen. sistem komersial telah tersedia dari berbagai sumber misalnya affymetrix (GeneChip) menghasilkan chips dengan metode fotolitografik dimana ribuan probe oligonukleida berbeda disintesis secara in situ pada chips (Cekan SZ 2004).

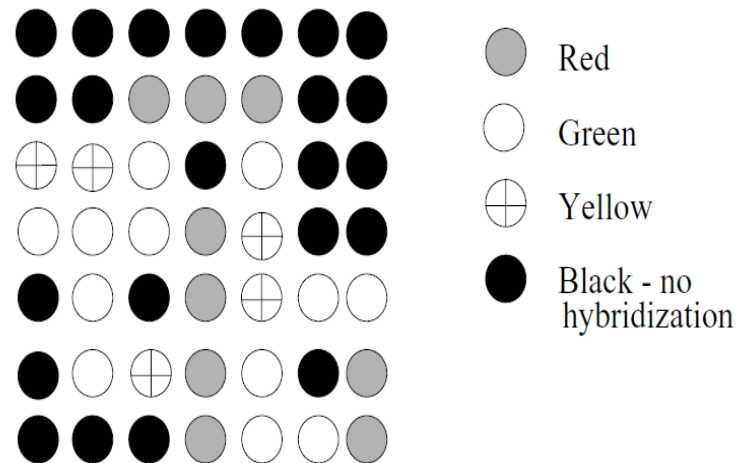


Figure 5

Model of a microarray. In a single-chip technique reverse transcription from mRNAs to cDNAs is separately carried out for the test and control cell preparations. During the transcription one of the fluorescent dyes (e.g., Cy3 – green and Cy5 – red) are incorporated into the cDNAs of each preparation. A mixture of these two preparations is then hybridised to the corresponding gene-representing sequences on a chip. The activated genes of the control sample exhibit green color, those of the test sample provide red spots, equally bound cDNAs can be visualized by yellow spots, no hybridization remains black.

Gambar 2.10. Model analisis ekspresi gen dengan microarray

Dikutip dari (Cekan SZ 2004)

Ketika lebih dari satu gen diaktivasi, spektrum gen dapat ditemukan baik terjadi secara sporadis atau dalam kelompok. Misalnya, ketika jaringan yang sakit dibandingkan dengan jaringan sehat, profil ekspresi yang merupakan ciri khas penyakit tersebut dapat diidentifikasi. Setelah diidentifikasi profil genetik yang ada, seringkali identifikasi gen akan dikonfirmasi dengan metode lain seperti analisis Northern blot atau real-time PCR. Microarray dapat mendeteksi aktivasi dari banyak gen menjadi profil gen yang berbeda dengan profil kontrol sehingga dapat memiliki nilai diagnostik dan atau prognostik. Namun, teknik ini memerlukan chips yang komersial serta peralatan khusus dan canggih serpat fasilitas komputasi (Cekan SZ 2004).

Kemajuan terbaru telah menunjukkan mekanisme yang bertanggung jawab untuk pengenalan dan bakteri *clearance* oleh sistem kekebalan bawaan.

Dimulai dengan penemuan bahwa protein pengikat CD14 dan lipopolysaccharide (LPS) bertanggung jawab untuk pengenalan LPS (Wright et al., 1990). Selanjutnya bahwa Toll-like receptors (TLRs) bertanggung jawab atas pengenalan dan pensinyalan bakteri, dan merupakan mekanisme yang memberikan kekhususan pada sistem kekebalan bawaan (Beutler et al., 2003). TLR2 mengenali peptidoglikan dan asam lipo-teikoat pada bakteri Gram-positif serta lipoprotein pada bakteri Gram-negatif, sedangkan TLR4 mengenali LPS pada bakteri Gram-negatif. MD2 memberikan responsivitas pada TLR4, menunjukkan bahwa pengenalan LPS oleh sistem imun bawaan membutuhkan kompleks CD14 / TLR4 / MD2 (da silva Correia et al., 2001).

II.7 Propolis

Propolis (*bee glue*) adalah substansi resin (getah) dengan berbagai konsistensi dan warna bergantung dari sumber tumbuhan yang diambil, mulai dari coklat gelap hingga coklat kemerahan dengan unsur kehijauan, yang diambil dan diakumulasi oleh lebah *Apis mellifera* dari beberapa sumber tumbuhan seperti kecambah, kuncup bunga, pohon dan eksudat resin dari jaringan tumbuhan lain (Ramos AFN et al 2007). Propolis berasal dari bahasa Greek, yaitu pro yang berarti "pertahanan" dan polis "kota atau komunitas" atau dengan kata lain adalah pertahanan sarang lebah. Propolis digunakan oleh lebah untuk melindunginya dari serangga dan mikroorganisme, sebagai semen untuk menutupi celah atau ruang terbuka di dalam sarangnya, mensterilisasi tempat lebah betina (dinding sel mengeras), dan memufikasi serangga yang masuk untuk mencegah predator masuk (Ramos AFN et al 2007), serta untuk menjaga suhu internal sarang 35°C, menghaluskan permukaan dalam sarang (Paspuleti VR et al 2017).

Propolis yang diambil dari sarang lebah (rude propolis), terdiri dari sekitar 50% balsam resin, 30% wax, 10% essential and aromatic oils, 5% pollen, dan 5% substansi lain termasuk *wood fragments*. Komposisi dari propolis ditentukan oleh karakter geografis di sekitar sarang lebah. Beberapa kontaminan yang dekat dengan sarang lebah dapat ikut terambil seperti bubuk aspal, pestisida, kelebihan zat besi, tembaga, magnesium dan bahkan timah. Secara umum, ethanol merupakan pelarut terbaik untuk sediaan propolis. Pelarut lain seperti ethyl ether, air, methanol, dan chloroform juga dapat digunakan. Gliserin, propilen glikol, dan larutan lain digunakan dalam sediaan farmasi dan kosmetik (Ramos AFN et al 2007).

Terdapat lebih dari 300 senyawa berbeda yang telah diidentifikasi dari propolis diantaranya asam alifatik, ester, asam aromatik (fenol), flavonoid, asam lemak, karbohidrat, aldehida, asam amino, alkohol (keton), chalcones, dihydrochalcones, terpenoid, beta steroid, vitamin (B1, B2, B6, C, dan E), dan substansi inorganik atau mineral (magnesium, kalsium, kalium, natrium, tembaga, zinc, mangan, dan zat besi) juga beberapa enzim (succinic dehydrogenase, G6P, adenosine triphosphatase, dan asam fosfatase). Flavonoid adalah substansi yang paling sering diteliti memberikan efek terapeutik. Terdapat 12 jenis flavonoid berbeda yang terdapat pada propolis, yaitu pinocembrin, acacetin, chrysin, rutin, luteolin, kaempferol, apigenin, myracetin, catechin, naringenin, galangin, dan quercetin; 2 asam fenolik yaitu caffeic acid dan cinnamic acid, serta senyawa turunan stilbene yaitu resveratrol (Ramos AFN et al 2007).

II.7.1 Manfaat Propolis

Propolis memiliki berbagai manfaat salah satunya adalah efek terapeutik. Bersamaan dengan produk lebah madu lainnya (madu, royal jelly, polen). Propolis memiliki efek terapeutik diantaranya aktivitas anti inflamasi, antioksidan, antikarsinogenik, antibakteri, antifungal, antiprotozoa, antivirus, antidiabetik (Paspuleti VR et al 2017), antiulkus, penyembuhan luka, anestesi, serta imunomodulator (Ramos AFN et al 2007). Propolis telah digunakan sejak lebih dari 90 tahun lalu, salah satunya di Afrika Selatan saat terjadi perang Anglo-boer, dimana propolis dicampur dengan vaseline untuk menjadi sediaan salep penyembuh luka dan hal ini bermanfaat karena antibiotik belum ditemukan (Ramos AFN et al 2007). Aktivitas farmakologis dari propolis terjadi karena beberapa mekanisme, yaitu kecenderungan propolis untuk berikatan dengan polimer biologis, berikatan dengan ion logam berat, mengakselerasi transpor elektron, dan kemampuannya untuk membuang radikal bebas (Yangi B et al 2018). Aktivitas farmakologis tersebut lebih banyak didapat pada negara tropis dibanding negara beriklim dimana tumbuhan yang menjadi sumber propolis lebih beragam (Ramos AFN et al 2007).

Propolis bermanfaat bagi kesehatan manusia di berbagai sistem organ tubuh. Pada saluran pencernaan, ekstrak propolis ethanol dapat menghambat pertumbuhan dan perlekatan dari trofozoit *Giardia duodenalis* serta dapat melepaskan parasit tersebut (studi in vitro). Studi lain juga menunjukkan propolis memiliki efek antihistamin, antiinflamasi, anti keasamaan, dan anti aktivitas *H. pylori* sehingga dapat dimanfaatkan dalam pengobatan ulkus gaster. Pada sistem ginekologi, aplikasi solusio dari propolis akuos menunjukkan perbaikan kesehatan vagina pada penyakit vaginitis. Selain efek antibiotik dan antifungalnya, propolis juga membuat

gejala vaginitis lebih cepat berkurang karena efek anastesinya serta dapat menjadi antibiofilm. Propolis juga bermanfaat pada kebersihan oral dimana berdasarkan studi yang ada, propolis dapat menghambat pertumbuhan plak bakteri dan *periodontitis-causing pathogens* serta efek sitotoksiknya terhadap fibroblas gusi lebih rendah dibandingkan dengan *chlorhexidine*. Propolis juga sering digunakan sebagai krim dan salep untuk produk perawatan kulit karena efek antialergi, antiinflamasi, antimikroba, dan dapat memicu sintesis kolagen. Pada studi yang membandingkan propolis dengan obat konvensional silver sulfadiazine didapatkan penurunan aktivitas radikal bebas pada *wound beds* yang mendukung proses perbaikan jaringan (Paspuleti VR et al 2017).

Pada studi lain, propolis juga dapat menjadi pengobatan potensial untuk kanker payudara karena efek antikarsinogeniknya yang bisa memicu apoptosis dari sel kanker payudara manusia. Selain itu, propolis juga bersifat lebih selektif dengan toksisitas yang rendah hingga tidak bersifat toksik terhadap sel normal. Pada penelitian dengan turkish propolis, didapatkan juga efek sitotoksik pada sel kanker paru manusia dengan menginduksi *endoplasmic reticulum stress*, apoptosis, dan aktivitas caspase serta dengan menurunkan potensial membran mitokondria sehingga dapat meminimalisasi proliferasi sel kanker (Paspuleti VR et al 2017). Manfaat lain dari propolis adalah untuk regenerasi kartilago, tulang, dan pulpa gigi, manfaat imunologis, pertahanan dari hepar dan aktivitas antitoksik, serta antioksidan (Ramos AFN et al 2007). Pada Tabel 2.9 dapat dilihat senyawa bioaktif penting dari propolis.

Tabel 2.9. Senyawa bioaktif penting dari propolis (Paspuleti VR et al 2017)

No	Senyawa bioaktif	Aktivitas biologis
1	Senyawa fenolik: 2,2-dimethyl-8-prenylchromene	Antimikroba
2	Senyawa fenolik: 4-hydroxy-3, 5-diprenyl cinnamic acid (artepillin C)	Antimikroba, antiinflamasi, antikanker
3	Senyawa fenolik: 3-prenyl cinnamic acid allyl ester	Antimikroba
4	Senyawa fenolik: kaempferide	Antitumor, antikanker
5	Senyawa fenolik: propolis benzofuran	Antifungal
6	Terpenoid: isocupressic acid, a labdane diterpenoid	Antifungal
7	Terpenoid: 13C-symphoretic acid, a clerodane diterpenoid	Antitumor
8	Terpenoid: esters of long-chain fatty acids, (3-hydroxystearic acid procrim a; 3-hydroxystearic acid, procrim b dan pentacyclic triterpenoid (lupeol)	Antioksidan, antimikroba, antitumor
9	Terpenoid: farnesol, sesquiterpenoid	Antifungal
10	Flavonoid: apigenin	Antibakteri, anti inflamasi
11	Flavonoid: Acacetin	Antialergi, antikanker
12	Flavonoid: Quercetin	Antikanker, antialergi, antibakteri, anti inflamasi
13	Flavonoid: Galangin	Antikanker, antioksidan
14	Flavonoid: Pinocembrin	Antimikroba, antikanker
15	Flavonoid: chrysin	Antibakteri, antiinflamasi, antikanker
16	Flavonoid: fisetin	Antibakteri, antialergi, antikanker
17	Flavonoid: caffeic acid phenetyl ester	Antitumor, antikanker
18	10-hydroxyl-2-decenoic acid	Antibiotik, antitumor

II.7.2 Propolis sebagai anti inflamasi dan stress oksidatif

Propolis adalah agen potensial anti inflamasi baik untuk inflamasi tahap akut dan kronik. Inflamasi sendiri dapat mengakibatkan dampak toksik terhadap organisme sehingga harus dikendalikan agar tidak terjadi kerusakan yang diinduksi oleh produksi radikal bebas oleh makrofag dan neutrofil yang aktif sehingga terjadi degradasi dari asam lemak membran plasma, disrupsi protein membran, dan induksi mutasi DNA. Propolis seringkali digunakan untuk otot dan sendi, serta berbagai penyakit inflamasi, infeksi, rheumatism, dan torsio. Studi pada tikus dan kelinci, menunjukkan solusio hidroalkoholik dari propolis memiliki aktivitas antiinflamasi baik dengan pemberian secara topikal, injeksi, ataupun oral (Ramos AFN et al 2007).

Substansi antiinflamasi dari propolis berdasarkan penelitian diantaranya caffeic acid, quercetin, naringenin, dan caffeic acid phenethyl ester (CAPE) dapat mensupresi sintesis prostaglandin dan leukotrien oleh makrofag serta menghambat aktivitas myeloperoxidase, NADPH-oxidase, ornithine decarboxylase, dan tyrosine-protein-kinase. Penelitian lain aktivitas anti inflamasi propolis akibat senyawa lain yaitu asam salisilat, apigenin, asam ferulat, dan galangin. Inhibisi dari produksi NO oleh makrofag dapat memberikan efek antiinflamasi. Pada studi ethanol dan water extracts (WSD), didapat keduanya dapat menghambat peningkatan PGE2 dan juga memiliki efek inhibisi signifikan terhadap NO dimana NO dapat mengakselerasi reaksi inflamasi dengan vasodilatasi dan menyebabkan edema. Akan tetapi, pada beberapa studi lain didapat makrofag meningkatkan produksi NO (Ramos AFN et al 2007).

Propolis yang memiliki polifenol juga bermanfaat untuk mengeluarkan kelebihan radikal bebas dari organisme yang dapat berkontribusi terhadap kerusakan jaringan. CAPE diidentifikasi sebagai salah satu bahan aktif utama yang memiliki efek anti inflamasi dan anti oksidan. Pada studi pemberian propolis untuk mencegah kerusakan oksidatif *Escherichia coli*-induced pyelonephritis di tikus dan didapatkan bahwa dengan pemberian CAPE, malondialdehyde berkurang dimana substansi tersebut adalah indikator pembentukan radikal bebas yang akan meningkat pada tahap akhir lipid peroksidase. Pada studi lain dikatakan juga bahwa CAPE dapat menghambat ekspresi iNOS dan produksi NO di makrofag yang merupakan substansi yang memicu kerusakan sel dan menyebabkan perubahan fisiologis jangka panjang. CAPE juga secara signifikan meningkatkan enzim antioksidan SOD dan GSH-Px pada ginjal dari tikus yang terinfeksi (Ramos AFN et al 2007).

Pada studi lain yang serupa secara *in vivo* dilihat potensi anti inflamasi, antioksidan, dan antiapoptosis dari ekstrak propolis terhadap *lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation* di tikus. LPS diadministrasikan secara intraperitoneal kemudian kelompok tikus dibagi menjadi tikus dengan inflamasi, tikus inflamasi ditambah pemberian propolis 30mg/kg, dan tikus dengan inflamasi ditambah propolis 90mg/kg yang diberikan secara oral 24 jam setelah injeksi LPS. Kemudian dinilai inflamasi jaringan paru dan hati dengan FDG-PET dan ditentukan kadar malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), katalase (CAT), NO, dan fragmen DNA. SOD, CAT, GPX adalah antioksidan endogen, sedangkan produksi NO menggambarkan peran patogenesis kerusakan jaringan akibat endotoksin. MDA ditemukan dalam kadar yang lebih rendah sedangkan Inhibisi SOD% lebih

tinggi pada kelompok dengan propolis 90mg/kg dibanding kelompok inflamasi. Di sisi lain, aktivitas katalase pada kelompok yang diberi propolis baik 30 mg/kg maupun 90mg/kg didapatkan lebih tinggi dibanding kelompok inflamasi. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa propolis dapat bermanfaat untuk mengobati penyakit-penyakit inflamasi melalui efek yang bisa menurunkan produksi radikal bebas (Yangi B et al 2018).

II.7.3 Manfaat Propolis pada Infeksi

Hasil penelitian menunjukkan bahwa propolis memiliki sifat antimikroba, anti uniseluler, anti virus dan anti jamur (Fernandes 2007). Sifat antimikroba dari propolis dapat terjadi melalui aksi langsung pada mikroorganisme atau aksi tidak langsung dengan stimulasi sistem imun yang mengakibatkan membunuh lebih banyak mikroorganisme. Metode in vivo dan in vitro membuktikan bahwa propolis dapat mengaktifkan makrofag, meningkatkan aktivitas antimikroba dan juga merangsang produksi antibodi (Shahin et al., 2012). Studi yang dilakukan oleh Tosi et al. menunjukkan bahwa pelarut yang digunakan untuk ekstraksi propolis dapat mempengaruhi potensi aktivitas antimikroba. Sediaan propolis menunjukkan aktivitas anti-mikroba in vitro terutama melawan bakteri Gram-positif (*Staphylococci* dan *Streptococci spp.*) Dan Gram-negatif (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* dan *P. aeruginosa*), *Helicobacter pylori*, protozoa (*T. cruzi*), jamur (*Candida albicans*) dan virus (HIV, virus Herpes atau virus influenza). Faktanya, sediaan minyak memiliki berbagai macam aktivitas anti-mikroba; larutan gliserin menunjukkan sedikit penghambatan bakteri Gram-positif, sedangkan larutan etanol dan propilen glikol menunjukkan aktivitas yang baik melawan ragi. Studi juga menunjukkan efek sinergis yang ditandai dari propolis pada aktivitas anti bakteri

streptomisin dan cloxacillin, dan efek sinergis moderat pada aktivitas anti-bakteri kloramfenikol, cefradine dan polymyxin B dalam media kultur yang mengandung sejumlah tetap strain standar *Staphylococcus aureus*. Studi juga telah dilakukan pada 15 strain bakteri yang memiliki relevansi klinis dalam kedokteran gigi: ekstrak propolis menunjukkan aktivitas anti bakteri in vitro, penghambatan kepatuhan sel dan penghambatan pembentukan glukosa yang tidak larut dalam air. (Shahin, et al., 2012)

Penelitian yang dilakukan oleh V.Dimov dkk 1991 mengenai sifat dari salah satu bentuk propolis, bernama *water-soluble derivative* (WSD), yang terkait dengan perlindungan antibakteri dan antijamur, dan mekanisme aksi seluler. Studi yang dilakukan untuk melihat fungsi imunomodulator dari turunan yang larut dalam air (WSD) dari propolis alami. Pemberian oral dan parenteral dari WSD meningkatkan tingkat kelangsungan hidup dan waktu kelangsungan hidup rata-rata pada infeksi bakteri eksperimental (*Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*) dan jamur (*Candida albicans*) pada mencit. Peningkatan resistensi diamati juga pada infeksi *Klebsiella pneumoniae* yang diinduksi setelah pengobatan siklofosfamid. WSD merangsang makrofag peritoneal untuk menghasilkan interleukin-1 in vitro, yang berhubungan dengan peningkatan sekresi protein totalnya. Selain itu, WSD gagal memicu proliferasi limfosit seperti yang ditentukan oleh uji kelenjar getah bening popliteal. WSD disarankan untuk meningkatkan pertahanan host non-spesifik melalui aktivasi makrofag. (V.dimov et al., 1991)

II.8 Model Hewan yang diinduksi *Klebsiella pneumoniae*

Infeksi paru yang disebabkan oleh bakteri dapat menyebabkan berbagai

spectrum respons imun, yang sebagian ditentukan oleh tingkat paparan dan derajat respons host. Respons host melibatkan *pattern recognition receptors* (PRRs) yang mengenal patogen dan merusak pola molekuler terkait. Oleh karena itu, model peradangan paru akut diperlukan untuk lebih memahami peran sistem imun bawaan selama infeksi bakteri pada manusia. Mencit adalah organisme model yang banyak digunakan untuk mempelajari aspek penting dari patogenesis paru manusia, termasuk penyakit inflamasi akut dan kronis. *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri gram negatif yang sering dikaitkan dengan infeksi saluran pernapasan, terutama di rumah sakit. Protokol penelitian yang dilakukan oleh Dylan et al, untuk melihat model inflamasi paru yang dimediasi oleh bakteri menggunakan *K. pneumoniae*. Setelah pemberian *K. pneumoniae* intratrakeal tunggal, mencit menunjukkan kuatnya aktivasi kekebalan yang dimediasi Th1 di paru-paru. Model yang dijelaskan di sini, meskipun dioptimalkan untuk *K. pneumoniae*, dapat dilakukan dengan menggunakan bakteri, jamur, dan virus lain juga. (Mc Daniel, Allen, 2019)

Beberapa penelitian pada model hewan percobaan telah menggunakan *Klebsiella* untuk menginduksi pneumonia. Model pada mencit dengan menggunakan pemberian *Klebsiella* melalui intranasal dan langsung pada trakea. Intranasal lebih sulit, dengan hasil yg tidak konsisten dan membutuhkan lebih banyak bakteri namun dosis tiap hewan tidak terkontrol. Pemberian langsung kedalam trakea melalui cannulasi atau menggunakan needle dapat mengontrol dosis, namun trakea mencit sangat kecil dan harus terlihat. Hal ini membutuhkan insisi pada leher menggunakan anestesi. Prosedur ini membutuhkan teknik dan operator yang terlatih. Kemungkinan terjadi aspirasi pada mencit dan poorly reproduced.

Glen dkk melakukan penelitian pneumonia pada model mencit yang *reproducibile* dengan injeksi intraperitoneal. Tidak ditemukan kejadian peritonitis pada mencit ini, tapi semua mencit secara klinis menjadi pneumonia pada autopsi. Sebaliknya injeksi *Klebsiella* intravena tidak menimbulkan pneumonia. Injeksi intraperitoneal *klebsiella* reliable dan reproducibile dan tidak membutuhkan insisi bedah atau anestesi dan mudah dilakukan. Pemberian 10^3 CFU *klebsiella*, semua mencit mati pada hari ke 5, dengan 50% survival pada hari ke 3. Pada model IP kematian terjadi antara hari ke 4 dan 5 dengan dosis yang sama. (Franklin *et al.*, 2003)