

**IDENTIFIKASI MOLEKULER GEN-GEN HIPERVIRULEN  
PADA ISOLAT SIMPAN *Klebsiella pneumoniae***

Molecular Identification of hypervirulent genes  
of *Klebsiella pneumoniae* isolates



**YANI SODIQAH  
C195192004**

Pembimbing 1:

**dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc, Ph.D., Sp.MK, Subsp. Vir. (K)**

Pembimbing 2:

**Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D., Sp.MK, Subsp. Bakt. (K)**

**PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI FASILITAS  
KESEHATAN PROGRAM STUDI PENDIDIKAN  
DOKTER SPESIALIS-1  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS  
HASANUDDIN**

**2023**

**IDENTIFIKASI GEN HIPERVIRULEN PADA ISOLAT SIMPAN  
*Klebsiella pneumoniae***

**Karya Akhir  
Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Spesialis  
Program Studi Mikrobiologi Klinik**

**Disusun dan diajukan oleh**

**YANI SODIQAH**

**Kepada**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS  
MIKROBIOLOGI KLINIK FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2023**

**KARYA AKHIR**  
**IDENTIFIKASI GEN HIPERVIRULEN PADA ISOLAT SIMPAN *Klebsiella pneumoniae***

**Disusun dan diajukan oleh :**

**YANI SODIQAH**

**Nomor Pokok : C195192004**

**Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis**

**Pada Tanggal 27 Juni 2023**

**Dan dinyatakan telah memenuhi syarat**

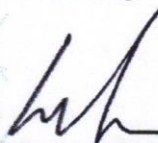
**Menyetujui**  
**Komisi Penasehat**

**Pembimbing Utama**



**dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc, Ph.D., Sp.MK.,  
Subsp.Vir. (K)**

**Pembimbing Anggota**



**Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D., Sp.MK.,  
Subsp.Bakt. (K)**

**Kepala Program Studi  
Mikrobiologi Klinik UNHAS**



**Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D.,  
Sp.MK., Subsp. Bakt. (K)  
NIP. 19570416 198503 1 001**

**Dekan Fakultas Kedokteran UNHAS**



**Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes., Sp.PD-KGH., Sp.GK.  
NIP. 19680530 1996032001**

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : YANI SODIQAH  
Nomor Pokok : C195192004  
Program Studi : Mikrobiologi Klinik

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri dan bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar 23 Agustus 2023



g menyatakan,

YANI SODIQAH

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanawataalla atas segala berkat dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan tesis yang berjudul "Identifikasi Molekuler Gen Hipervirulen Isolat Simpan *Klebsiella pneumoniae*".

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada para pembimbing dan penguji yang banyak membantu dalam penyusunan tesis ini :

1. dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc.,Ph.D., Sp. MK, Subsp. Vir (K) sebagai penasehat utama yang telah membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyusun tesis ini.
2. Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D., Sp.MK, Subsp. Bakt (K) selaku anggota penasehat yang juga telah membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyusun tesis ini.
3. Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D., Sp.MK, Subsp. Bakt (K) selaku tim penilai yang telah meluangkan waktu dan memberikan saran demi perbaikan tesis ini.
4. Dr. dr. Ilhamjaya Patellongi, M.Kes selaku tim penilai yang telah meluangkan waktu dan memberikan saran demi perbaikan tesis ini.
5. dr. Yoeke Dewi Rasita, M.Med.Klin, Sp.MK selaku tim penilai yang telah meluangkan waktu dan memberikan saran demi perbaikan tesis ini.

Penulis persembahkan tesis ini sebagai rasa terima kasih yang tulus kepada keluarga penulis yang telah memberikan semangat selama penyusunan tesis ini. Terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam penyusunan tesis ini. Penulis menyadari bahwa tesis ini tidak luput dari kesalahan, sehingga dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan saran dan kritik dari semua pihak.

Makassar 23 Agustus 2023

Yani Sodiqah

## ABSTRAK

YANI SODIQAH. *Identifikasi Molekuler Gen-Gen Hipervirulen Isolat Klebsiella Pneumoniae* (dibimbing oleh Rizalinda Sjahlil dan Mochammad Hatta).

Dalam beberapa dekade, *hypervirulent Klebsiella Pneumoniae* (hvKP) telah menyebar secara global dan muncul sebagai pathogen global. HvKp bersifat lebih virulen daripada *K. pneumoniae* tipe klasik. *Classical K. pneumoniae* (cKp) menyebabkan berbagai penyakit infeksi komunitas pada individu yang lebih sehat dan muda yang berakibat pada penyakit dengan keparahan yang lebih tinggi di lingkungan perawatan kesehatan atau rumah sakit. Investigasi molekuler dibutuhkan sebagai cara diagnosis yang cepat dan akurat terhadap keberadaan hvKP. Studi ini berfokus pada investigasi molekuler gen-gen hipervirulen hvKP dan menilai kesesuaian antara keberadaan gen hipervirulen sebagai regulator sifat mucoid (*prmpA* dan atau *prmpA2* genes) dan *Klebsiella pneumoniae*. Tes *String* dan PCR *uniplex* dilakukan pada lima puluh satu isolat simpan *Klebsiella pneumoniae* yang tersimpan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik, Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan, Indonesia. Untuk memastikan kemurnian isolate, dilakukan rekultur dan tes biokimia yang diperlukan. Kami mengonfirmasi beberapa hasil positif sampel PCR dengan sekuensing yang mewakili semua primer (Sanger). Pemaparan deskriptif digunakan untuk menjelaskan secara ringkas amplifikasi-amplifikasi (*peg-344*, *iroB*, *iucA*, *prmpA* atau *prmpA2*) dihubungkan dengan kelompok usia. Kesesuaian antara keberadaan gen hipervirulen sebagai regulator sifat mucoid dan *Klebsiella pneumoniae* diukur dengan nilai *Cohen's Kappa coefficient*. *Klebsiella pneumoniae* diisolasi dari individu dengan rentang usia yang luas (<1-75 tahun) dari berbagai spesimen dan terbanyak berasal dari sputum (34%) dan darah (32%). Gen-gen hipervirulen dideteksi dari 26% sampel, gen *peg-344* dan *prmpA* adalah gen yang paling lazim, masing-masing teramplifikasi 100%. Namun, tiga gen hipervirulen lainnya hampir selalu teramplifikasi secara bersamaan (*iroB* dan *prmpA* masing-masing 92.8% dan *iucA* 85.7%). Usia dewasa (19-59 tahun) adalah kelompok usia yang paling sering terinfeksi hvKP (61.5%). Tes *String* mengonfirmasi sifat fenotip hipermukovikous positif sebanyak 90%, sedangkan kehadiran gen *rmpA* atau *rmpA2* yang dikonfirmasi PCR *assay* hanya 26%. Nilai *Cohen's Kappa Coefficient* -0.04 menunjukkan tidak adanya kesesuaian, sehingga dapat dikatakan identifikasi molekuler lebih dapat dipercaya. Identifikasi molekuler hvKP dengan menggunakan gen-gen hipervirulen (*peg-344*, *iroB*, *iucA*, *prmpA*, dan *prmpA2*) adalah tes yang akurat dan cepat untuk mendiagnosis infeksi hvKP.

Kata kunci: hipermukoviskous, tes string, hvKP, *peg-344*, *iroB*, *iucA*, *prmpA*, *prmpA2*



## ABSTRACT

YANI SODIQAH. *Molecular Identification of Hypervirulent Gene of Klebsiella Pneumoniae Isolate* (supervised by Rizalinda Sjahril and Mochammad Hatta).

In several decades, the hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKP) has spread globally and emerged as a major concerning global pathogen. The hvKp is more virulent than the classical *K pneumoniae* (cKp) causing a variety of infections of the healthy and younger individuals in the community settings and leading to more severe diseases in the healthcare settings. The molecular investigation is needed as a rapid and accurate diagnostic tool of the hypervirulent gene of hvKP. The research focuses on the molecular investigation of hvKP hypervirulent gene and finds the compatibility value of the mucoid. A phenotype regulatory gene (*rmpA* and or *rmpA2* gene) hvKP with the phenotypic hypermucoviscous colony of the *Klebsiella pneumoniae*. The string test and uniplex PCR assay were conducted on the cultivable and purity confirmed by biochemical test of 51 *Klebsiella pneumoniae* storage isolates in the Clinical Microbiology Laboratory of Hasanuddin University Teaching Hospital, Makassar, South Sulawesi, Indonesia. Several positive PCR samples were confirmed by the sequencing (sanger). The descriptive statistics was utilized to summarize hvKP genes (*peg-344*, *iroB*, *iucA*, *prmpA* or *prmpA2*) amplification based on the patients' age groups. The compatibility of both phenotypic hypermucoviscous and genotypic of mucoid A phenotype regulatory genes (*prmpA* and or *prmpA2* genes) were measured by Cohen's Kappa coefficient value. *Klebsiella pneumoniae* is isolated from a wide range of ages (<1- 75 years old), with various specimens, the most are sputum (34%) and blood (32%). The hypervirulent gene is identified in 26%, among of them *peg-344* and *prmpA* are the most common virulence genes (100% each). However, the other virulence genes almost always perform alongside together (*iroB* and *prmpA* 92.8% each; *iucA* 85.7%). The adult age (19-59 years old) is the most frequent age of hvKP infection (61.5%). The string test confirms the hypermucoviscous phenotype positive in 90% samples. while the present of *rmpA* or *mpA2* genes are confirmed only by PCR assay. Cohen's Kappa Coefficiency between phenotype and genotype hvKP identification is -0.04. The molecular identification of the hypervirulent genes (*peg-344*, *iroB*, *iucA*, *prmpA* and *prmpA2*) is considered as the accurate and rapid diagnostic tool of hvKP infection.

Key words: hypermucoviscous, string test, huKP, *peg-344*, *iroB*, *iucA*, *prmpA*, *prmpA2*



## DAFTAR ISI

### halaman

HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR ISTILAH, SINGKATAN DAN LAMBANG.....	xiii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	2
1.3. Pertanyaan Penelitian.....	3
1.4. Tujuan Penelitian.....	3
1.4.1. Tujuan Umum Penelitian.....	3
1.4.2. Tujuan Khusus Penelitian.....	3
1.2. Manfaat Penelitian.....	4
1.5.1. Manfaat Akademik.....	4
1.5.2. Manfaat bagi Institusi.....	4
1.5.3. Manfaat bagi Peneliti.....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	5
2.1.1. Tinjauan umum <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	5
2.1.2. Klasifikasi.....	5
2.1.3. Struktur <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	6
2.1.4. Karakteristik Mikrobiologi.....	7
2.1.5. Transmisi.....	7



2.1.6.	Faktor virulensi <i>K.pneumoniae</i> .....	8
2.1.7.	Penyakit dan gejala klinis infeksi <i>K.pneumoniae</i> .....	12
2.2.	Hypervirulent <i>Klebsiella pneumoniae</i> (HvKP) .....	13
2.2.1.	Definisi HvKP .....	13
2.2.2.	Genetik hvKP .....	13
2.2.3.	Faktor virulensi HvKP .....	14
2.2.4.	Epidemiologi penyakit Infeksi HvKP .....	15
2.2.5.	Gejala Klinis infeksi hvKP .....	17
2.2.6.	Diagnosis mikrobiologis hvKP .....	19
2.2.7.	Diagnosis molekuler hvKP .....	20
BAB III KERANGKA KONSEP DAN DEFINISI OPERASIONAL .....		23
3.1.	KERANGKA KONSEP .....	23
3.2.	DEFINISI OPERASIONAL .....	23
3.2.1.	Isolat <i>K.pneumoniae</i> .....	23
3.2.2.	Rekultur <i>K.Pneumoniae</i> .....	23
3.2.3.	Tes biokimia <i>K.Pneumoniae</i> .....	24
3.2.5.	PCR Gen hipervirulen isolat <i>K. pneumoniae</i> .....	25
BAB IV METODE PENELITIAN .....		27
4.1.	Metode dan Rancangan Penelitian .....	27
4.2.	Tempat dan Waktu Penelitian .....	27
4.2.1.	Lokasi Penelitian .....	27
4.2.2.	Waktu Penelitian .....	27
4.3.	Populasi dan Sampel .....	27
4.3.1.	Populasi Penelitian .....	27
4.3.2.	Sampel .....	27
4.4.	Kriteria Sampel Penelitian .....	28
4.4.1.	Kriteria Inklusi .....	28
4.4.2.	Kriteria Eksklusi .....	28
4.5.	Jumlah Sampel .....	28
4.6.	Alur Penelitian .....	29

4.7.	Prosedur Kerja .....	30
4.8.	Alat dan Bahan Penelitian .....	35
4.9	Pengolahan dan Analisa Data.....	36
BAB V HASIL, PEMBAHASAN DAN HAMBATAN PENELITIAN .....		37
5.1.	HASIL .....	37
5.1.1.	Karakteristik sampel penelitian .....	37
5.1.3.	Identifikasi gen-gen hpKv (n=14).....	38
4.1.4.	Kesesuaian antara fenotipik hipermukoid (String test) dengan gen regulasi hiperkapsuler ( <i>prmpA</i> dan <i>prmpA2</i> ).....	39
5.2.	PEMBAHASAN .....	41
5.2.1.	Karakteristik infeksi <i>Klebsiella pneumonia</i> .....	41
5.2.2.	Marker Hipervirulen pada hvKP.....	43
5.2.3.	Fenotip Hipermukoid dan hvKP .....	44
5.3.	HAMBATAN PENELITIAN.....	45
BAB VI PENUTUP.....		46
6.1.	Kesimpulan.....	46
6.2.	Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA .....		47
Lampiran 1. Jadwal Pelaksanaan .....		51
Lampiran 2. Ethical Clearance .....		52
Lampiran 3. Surat Izin Penelitian .....		53

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 1. Fungsi fimbriae tipe 1 dan 3 selama infeksi <i>K. pneumoniae</i> dan pembentukan biofilm. (Paczosa, 2016) .....	10
Gambar 2. Gambaran lokasi gen pengkode hvKP .....	13
Gambar 3. Perbedaan kapsul klasik dan hiperkapsul hvKp. ....	15
Gambar 4. Laporan global konvergensi MDR-hvKp .....	16
Gambar 5. Perbedaan penyakit akibat hvKP dan cKP. ....	18
Gambar 6. Tes String. Tes String positif .....	19
Gambar 7. Kerangka pikir .....	22
Gambar 8. Kerangka Konsep .....	23
Gambar 9. Alur Penelitian .....	29
Gambar 10. Distribusi spesimen sampel penelitian .....	41

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
Tabel 1. Gen target hvKp .....	20
Tabel 2. Distribusi sampel Sample berdasarkan specimen asal isolat, hasil identifikasi fenotip hipermukus dan amplifikasi gen-gen hvKP (n=51).....	37
Tabel 3. Distribusi infeksi hvKP dan cKP berdasarkan kelompok usia (N- 14) ....	38
Tabel 4. Identifikasi gen-gen hvKP .....	38
Tabel 5. Kesesuaian antara fenotipik hipermukoid (String test) dengan gen regulasi hiperkapsuler ( prmpA dan prmpA2) (n=14) .....	40

## DAFTAR ISTILAH, SINGKATAN DAN LAMBANG

Lambang / Singkatan	Arti dan penjelasan
$\mu\text{m}$	mikrometer
CR-Kp	Carbapenemase <i>Klebsiella pneumoniae</i>
CPS	Capsular Plysacharide
cKp	<i>Klebsiella pneumoniae</i> klasik
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EMB	Eosin Methilene Blue
ent	enterobactin
HAIs	(Healthcare Associated Infection)
hvkp	Hypervirulent <i>K. pneumoniae</i>
ICE	Elemen konjugatif terintegrasi
MDR-hvKP	Multi Drug Resistance
hmKp	<i>Hypermucoviscous K. pneumoniae</i>
LPS	Lipopolisakarida
MSHA	mannose-sensitive hemagglutinins
OMPs	Outer Membrane Proteins
TLR4	Toll Like Receptor 4
XDR	Extended Drug Resistance
ybt	yersiniabactin

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

*Klebsiella pneumoniae* termasuk dalam golongan bakteri gram-negatif fakultatif anaerob yang ditemukan melimpah di lingkungan luas, seperti tanah, air, dan permukaan benda, termasuk alat-alat kesehatan, tangan yang terkontaminasi atau seluruh permukaan rumah sakit. Bakteri ini merupakan mikrobiota komensal (flora normal) di nasofaring dan usus, dan dapat menyebabkan infeksi oportunistik di berbagai lokasi yang seringkali sulit diobati. Bakteri ini bertanggung jawab atas sejumlah besar infeksi yang didapat dari komunitas dan di layanan Kesehatan.. Kemampuan untuk menyebar secara metastatik menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang signifikan. Di Amerika Serikat, *Klebsiella spp* teridentifikasi sebagai urutan ke-3 penyebab terbanyak HAIs (Healthcare Associated Infection) setelah *Clostridium difficile* dan *Staphylococcus aureus*. (Bengoechea, 2019; Ashurst 2018; Magill, 2014)

Dibandingkan dengan bakteri gram negatif lain, *K.pneumoniae* lebih sering menjadi patogen karena kemampuannya menghindari dari sistem imun, bertahan dalam lapar, berkompetisi dengan bakteri lain, mengadakan pertukaran materi genetik di dalam Deoxyribonucleic Acid (DNA) dengan mikrobiota lain dan memperoleh elemen genetik bergerak yang mengkode multi resistensi antibiotik, serta peningkatan virulensi. (Martin, 2018; Gonzales, 2021)

Kepemilikan genom aksesori plasmid dan lokus gen kromosom yg cukup besar, menyebabkan terjadinya variasi genom aksesori yang membagi strain *K. Pneumoniae* menjadi kelompok oportunistik, hypervirulent, dan multidrug-resistant. Patotipe *Klebsiella pneumoniae* klasik (cKp), dianggap sebagai patogen oportunistik yang berkolonisasi di permukaan mukosa neonatus, lansia, dan individu dengan gangguan sistem imun. Namun strain Hypervirulent *K. pneumoniae* (hvkp) lebih sering menyebabkan infeksi infasif community-acquired pada kalangan usia muda dan sehat. Mobilitas gen plasmid menyebabkan penambahan dan pertukaran gen dari cKP dan hvKP, membentuk strain Multi Drug Resistance-hvKP (MDR-hvKP), bahkan Extended Drug Resistance XDR-hvKP

"superbugs" baru yang mampu menginfeksi host imunokompeten di komunitas, dengan gejala berat dan sulit diobati (Hao, 2020; Chobby, 2020; Russo, 2018)

Fenotip hipervirulen seringkali dikaitkan dengan factor virulensi tipe kapsuler yang memproduksi kapsul tebal yang *hypermucoviscous* (hmKp), yang mampu menghambat dan menghindari interaksi dengan sel fagosit host, menginduksi maturase sel dendritic, dan menetralisasi aktivitas antibakteri. Secara genotip, gen *rmpA* dan *rmpA2* merupakan gen yang meregulasi ekspresi mucus dan kapsul, mengekspresikan Hipermukoid (HVM) dan termasuk dalam kelompok gen menyusun patotipe *hvKp*. Namun demikian, tidak semua hvKP identic dengan hipermukoid. Gen regulasi kapsul seperti *rmpB* menghasilkan *hvKp* yang tidak hipermukoid, atau *rmpC* yang meregulasi mucus tanpa mengatur ekspresi dari kapsul, menghasilkan HVM, gen *rmpA* dan *rmpA2* dapat sekaligus mendeteksi HVM dan hvKp. ( Hao, 2020, Clegg, 2016).

Selain mengkode fenotip kapsul, gen-gen hipervirulen *K.pneumoniae* juga mengkode faktor virulensi lain. Gen-gen tersebut diproduksi oleh plasmid. Aerobactin adalah sebagai produk siderofor strain HvKP. Gen *iucA*, gen *iuc* operon yang mengkode aerobactin, adalah marker genetik yang membedakan serotipe hvKP dan cKP. Bila ditambahkan dengan identifikasi gen *peg-344* ( transporter metabolik), maka akurasi meningkat hingga 0.98. Selain itu terdapat gen biosintesis siderophore yersiniabactin ICEKp1 dan gen yang mengkode siderophore salmochelin (*iroB*). Gen-gen ini merupakan biomarker penentu hvKP yang akurat. (Russo, 2019)

Studi epidemiologi menunjukkan *K. pneumoniae* hipervirulen (hvKp) banyak dilaporkan di daerah Asia Timur dan Asia Tenggara atau pada individu keturunan Asia Timur. Berdasarkan hal tersebut, peneliti ingin melakukan identifikasi gen-gen hipervirulen yang representatif dan akurat pada isolat simpan *Klebsiella pneumoniae* di laboratorium mikrobiologi Klinik RSPTN Universitas Hasanuddin.

## 1.2. Rumusan Masalah

Hypervirulent Virulensi pneumoniae (hvkp) lebih sering menyebabkan infeksi infasif di komunitas (community-acquired) pada kalangan usia muda dan sehat, dan banyak dilaporkan di daerah Asia. Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah : " Apakah pada isolat simpan *K. pneumoni* di Laboratorium Mikrobiologi

RSPTN Universitas Hasanuddin, terdapat gen hipervirulen yang dapat diidentifikasi secara molekuler? ”

### 1.3. Pertanyaan Penelitian

2. Apakah terdapat gen *IroB* pada isolat *Klebsiella pneumoniae*?
3. Apakah terdapat gen *iucA* pada isolat *Klebsiella pneumoniae*?
4. Apakah terdapat gen *peg 344* pada isolat *Klebsiella pneumoniae*?
5. Apakah terdapat gen *prmpA* pada isolat *Klebsiella pneumoniae* ?
6. Apakah terdapat gen *prmpA2* pada isolat *Klebsiella pneumoniae*?
7. Adakah kesesuaian antara tes fenotipik hipermukoid dengan identifikasi molekuler gen regulasi mukoid hvKp?

### 1.4. Tujuan Penelitian

#### 1.4.1. Tujuan Umum Penelitian

Mengidentifikasi secara molekuler gen hipervirulen pada isolat *Klebsiella pneumoniae* di laboratorium Mikrobiologi RSPTN Unhas

#### 1.4.2. Tujuan Khusus Penelitian

- Mengidentifikasi gen *IroB* pada isolat *Klebsiella pneumoniae*
- Mengidentifikasi gen *iucA* pada isolat *Klebsiella pneumoniae*
- Mengidentifikasi gen *peg 344* pada isolat *Klebsiella pneumoniae*
- Mengidentifikasi gen *prmpA* pada isolat *Klebsiella pneumoniae*
- Mengidentifikasi gen *prmpA2* pada isolat *Klebsiella pneumoniae*
- Menghitung kesesuaian antara tes fenotip hipermukoid dengan keberadaan regulasi kapsuler *prmpA* dan atau *prmpA2* sebagai diagnosis infeksi hvKP.



## **1.5. Manfaat Penelitian**

### **1.5.1. Manfaat Akademik**

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan acuan untuk perkembangan ilmu pengetahuan dan penelitian selanjutnya tentang *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae (HvKP)*.

### **1.5.2. Manfaat bagi Institusi**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan masukan bagi instansi penyedia layanan kesehatan tentang kemungkinan infeksi *hvKp* yang lebih invasif dan bergejala lebih berat.

### **1.5.3. Manfaat bagi Peneliti**

Penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan dan pengalaman meneliti dan menulis bagi peneliti, terutama mengenai *hvKP*.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. *Klebsiella pneumoniae*

##### 2.1.1. Tinjauan umum *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* pertama kali dijelaskan oleh Carl Friedlander pada tahun 1882 dan dinamakan Friedlander's bacillus, yang diisolasi dari paru-paru pasien yang meninggal karena pneumonia. Meskipun ditemukan di dalam mikrobioma komensal host, tetapi dapat menyebabkan berbagai infeksi yang seringkali sulit diobati. Bakteri ini bertanggung jawab atas sejumlah besar infeksi yang didapat dari komunitas di seluruh dunia. Kemampuan untuk menyebar secara metastatik menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang signifikan. (Ashurst, 2018; Bengoechea, 2019 ; Magill ., 2014)

##### 2.1.2. Klasifikasi

Berdasarkan hirarki Taksonomi. *K.pneumoniae* termasuk family *Enterobacteriaceae*, yaitu

Kingdom	:	<i>Bacteria</i>
Subkingdom	:	<i>Negibacteria</i>
Phylum	:	<i>Proteobacteria</i>
Class	:	<i>Gammaproteobacteria</i>
Order	:	<i>Enterobacteriales</i>
Family	:	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	:	<i>Klebsiella</i>
Species	:	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
subspecies	:	<i>Klebsiella pneumoniae ozaenae</i>
	:	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>
	:	<i>Klebsiella pneumoniae rhinoscleromatis</i>

Subspesies yang paling pathogen pada manusia adalah *K. pneumoniae pneumoniae*. (Integrated Taxonomic Information System – Report)

Diketahui terdapat dua patotipe *K pneumoniae* klasik (cKp) dan *K. pneumoniae* hipervirulens (hvKp). Meskipun belum ada konsensus molekuler dan mikrobiologis untuk istilah hipervirulen, tetapi terdapat perbedaan klinis, epidemiologis, dan perbedaan genetik antara dua patotipe utama tersebut. *K. pneumoniae* hipervirulen (hvKp) menyebabkan penyakit fulminan, sedangkan *K. pneumoniae klasik* (cKp) tidak terlalu patogen tetapi dapat dengan mudah memperoleh multiresistensi antibiotik (MDR-Kp), termasuk resistensi karbapenem. (CR-Kp). (Gonzalez 2021).

### **2.1.3. Struktur *Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* memiliki dinding sel yang mengandung peptidoglycan, yang mempertahankan rigiditas sel dan melindunginya dari osmotik lisis. Dinding sel mengandung lipopolisakarida (LPS) pada bagian membran luar, yang dapat menginduksi respon inflamasi host.

#### **a. Kapsul**

Lapisan tebal polisakarida yang meliputi seluruh permukaan dinding sel merupakan factor virulensi penting untuk menghindar dari fagositosis oleh sel imun dari host. Kapsul juga berperan dalam pembentukan biofilm dan perlekatan pada permukaan.

#### **b. Plasma Membran**

Terdapat pada bagian dalam dari dinding sel yang memisahkan sitoplasma dari lingkungan eksternal. Terdiri dari dua lapis lipid (lipid bilayer) yang meregulasi pergerakan keluar masuknya molekul dari dan ke dalam sel.

#### **c. Sitoplasma**

Kandungan sitoplasma *K.pneumoniae* adalah protein, asam nukleat, enzim dan jalur metabolik untuk pertumbuhan dan survival bakteri, Di dalamnya juga terdapat ribosom untuk sintesis protein dan kromosom sirkuler bakterial (plasmid) yang membawa materi genetik.

#### **d. Pili dan Flagella**

Struktur yang menyerupai rambut di sekitar permukaan disebut fimbriae menyebabkan perlekatan dengan permukaan sel host, sementara struktur

serua yang memanjang dan membuat bakteri bisa bergerak disebut flagella.(  
Arhust, 2019 ; Martin ,2019)

#### **2.1.4. Karakteristik Mikrobiologi**

*K. pneumoniae* adalah bakteri gram negatif berbentuk batang (basil) non motil, anaerob fakultatif, berukuran 0,3 – 1,5 µm x 0,6 – 6,0 µm. . Bakteri ini mempunyai struktur kapsul polisakarida yang besar, terdiri dari antigen O yang merupakan liposakarida yang terdiri atas polisakarida berulang namun tidak membentuk spora. Dapat memfermentasi laktosa, membentuk asam dan gas. Bakteri ini biasanya memberikan hasil positif pada tes dekarboksilase lisin dan sitrat, namun hasil tes negatif pada tes indol. *K. pneumoniae* dapat membentuk koloni yang besar dan cenderung bersatu. Sifat biakan atau kultur dari *K. pneumoniae* pada media Eosin Methilene Blue (EMB) dan Mac Conkey membuat koloni tampak berwarna merah muda . dan mukoid setelah diinkubasi kurang lebih 24 jam. Koloni ini mudah dibiakan di media sederhana (bouillon agar) dengan menunjukkan warna koloni putih keabuan dan permukaan mengkilap. (Mahon et al, 2015).

#### **2.1.5. Transmisi**

*K. pneumoniae* ditemukan di mana-mana di alam, termasuk pada tumbuhan, hewan, dan manusia. Lingkungan adalah reservoir untuk infeksi pada manusia, baik sebagai kolonisasi atau infeksi. *K. pneumoniae* sering ditemukan di air, limbah, tanah, dan permukaan tanaman. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa *K. pneumoniae* di lingkungan sangat mirip dengan rekan klinis mereka dalam pola biokimia, virulensi dan patogenisitas, dan pola kerentanan bakteri ,meskipun representasi tipe kapsul berbeda antara sumber klinis/fekal dan lingkungan . (Martin, 2018).

Manusia berfungsi sebagai reservoir utama untuk *K. pneumoniae*. Di komunitas umum, 5% hingga 38% individu membawa organisme tersebut dalam tinja mereka dan 1% hingga 6% di nasofaring. Reservoir utama infeksi adalah saluran pencernaan pasien dan tangan petugas rumah sakit. Hal ini dapat menyebabkan wabah nosokomial. Namun, tingkat kolonisasi yang lebih tinggi telah dilaporkan pada etnis Tionghoa dan mereka yang mengalami alkoholisme kronis. Pada pasien rawat inap, *K. Pneumoniae* tertransmisi jauh lebih tinggi daripada yang

ditemukan di masyarakat. Dalam satu penelitian, tingkat karier setinggi 77% dapat dilihat pada tinja mereka yang dirawat di rumah sakit dan terkait dengan jumlah antibiotik yang diberikan. Salah satu sumber penularan adalah kontak orang ke orang antara petugas kesehatan dan pasien, dengan tangan petugas kesehatan menjadi sumber yang signifikan. Permukaan dan instrumentasi yang terkontaminasi juga telah diidentifikasi sebagai sumber penularan (Gonzalez, 2021)

#### **2.1.6. Faktor virulensi *K.pneumoniae***

##### **a. Kapsul**

Kapsul polisakarida (CPS) adalah salah satu faktor virulensi yang paling penting dari *K. pneumoniae*. Merupakan struktur yang terletak di bagian luar sel bakteri yang menempel pada membran luar. Ini terdiri dari subunit berulang dari empat hingga enam gula, serta asam uronat. Ini terutama digunakan untuk membantu menghindari sistem kekebalan selama infeksi, dengan cara: melindungi bakteri dari opsonofagositosis oleh granulosit polimorfonuklear dan desikasi oleh faktor-faktor bacterial serum. ( Arhust, 2019)

##### **b. LPS ( Lipopolisakarida)**

LPS dikenal sebagai endotoksin, yang merupakan komponen utama dan penting dari lembar luar membran sel semua bakteri Gram-negatif Baik cKp maupun hvKp, dapat memodifikasi LPS ke tingkat yang tidak dikenali oleh sel host dan yang lain menggunakan kapsul untuk sebagian melindungi LPS mereka dari deteksi oleh TLR4. Meskipun ada variasi yang cukup besar dalam struktur LPS di antara spesies bakteri, molekul LPS biasanya terdiri dari antigen O, oligosakarida inti, dan lipid A. Bagian lipid dari LPS bakteri, lipid A, dikenal sebagai ligan kuat TLR4, reseptor pengenalan pola. Stimulasi TLR4 mengarah pada produksi sitokin dan kemokin yang membantu merekrut dan mengaktifkan respons seluler, termasuk neutrofil dan makrofag, yang membersihkan infeksi *K. pneumoniae* dan mengontrol penyebaran ke jaringan lain. Strain yang mengandung antigen O Panjang atau "LPS halus," resisten terhadap pembunuhan yang dimediasi komplemen, sementara strain yang memiliki rantai O terpotong atau tidak ada, atau "LPS kasar," virulensinya mengalami

penurunan, sehingga rentan terhadap pembunuhan yang dimediasi komplemen, bahkan dengan adanya kapsul. Pada hvKp hiperkapsul meredam pensinyalan TLR4. Variasi LPS juga dapat berperan dalam melindungi bakteri dari peptida antimikroba, termasuk antibiotik polimiksin . (Martin, 2018; Paczosa, 2016 ; Opoku-Temeng, 2019)

### **c. Adhesin / Fimbriae Type 1 and 3**

Fimbriae membantu patogenitas dengan memediasi adhesi pathogen ke lapisan mukosa.

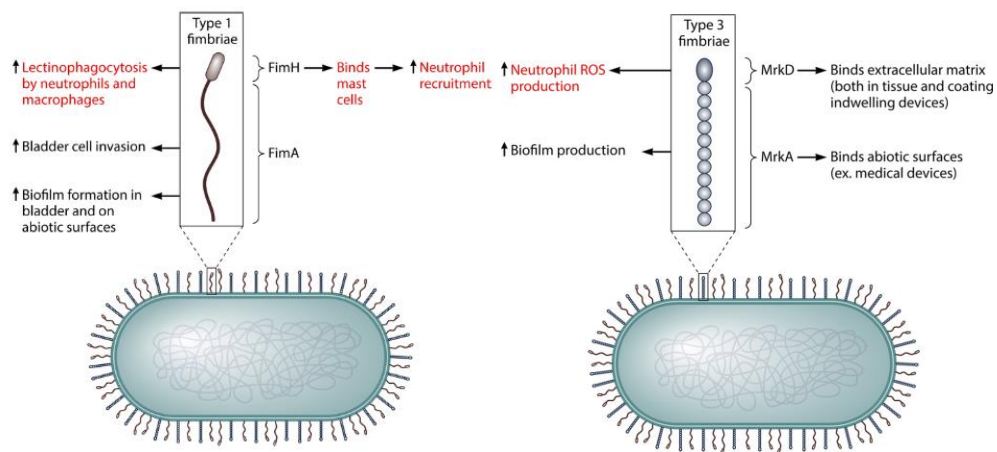
#### **1. Fimbriae Tipe 1**

Merupakan mannose-sensitive hemagglutinins (MSHA). Berfilamen, terikat membran, struktur perekat terutama terdiri dari subunit FimA, dengan subunit FimH di ujungnya. Terletak pada fimbrial shaft dan mampu berikatan dengan mannose yang mengandung trisakarida pada glikoprotein hospes secara spesifik. Struktur trisakarida diperkirakan mengandung rantai pendek oligomannose via N-glycosidic linkages pada glikoprotein. Fimbriae tipe 1 mampu memicu aktivitas leukosit opsonin-independent yang dikenal sebagai lectinophagocytosis. Repulsi yang memisahkan bakteri dengan leukosit akan dilemahkan oleh karakteristik hidrofilik fimbriae, yang memungkinkan protein adhesin terikat pada reseptor spesifik yang mengandung mannose pada permukaan leukosit. Pengikatan adhesin memicu stimulasi leukosit yang nantinya mengarahkan pada proses fagositosis dan edesikasi intraseluler bakteri. Tipe 1 memediasi perlekatan dan mengkolonisasi traktus urinarius bagian bawah dan traktus respiratorius.

#### **2. Fimbriae Tipe 3**

Fimbriae tipe 3 atau Klebsiella-like hemagglutinin (MR/K-HA), membantu perlekatan di kapsula Bowman's capsule, pembuluh darah renal dan membrane basal tubular pada ginjal manusia. Struktur perekat seperti heliks, terikat-membran, pada permukaan *K. pneumoniae*. Mereka terutama terdiri dari subunit MrkA, dengan subunit MrkD di ujungnya. Fimbria tipe 3 diperlukan untuk produksi biofilm *K. pneumoniae* dan mengikat alat kesehatan. MrkD secara khusus telah ditemukan untuk mengikat matriks ekstraseluler, seperti yang terpapar pada jaringan yang rusak dan melapisi perangkat yang tinggal

di dalam, sementara MrkA mengikat permukaan abiotik, seperti perangkat medis baik sebelum dimasukkan ke dalam pasien maupun setelah dimasukkan saat dilapisi dengan matriks host. Fimbria tipe 3 telah terbukti memiliki peran yang mungkin merugikan, karena kehadirannya pada *K. pneumoniae* meningkatkan produksi spesies oksigen reaktif (ROS) oleh neutrofil. (Mukherjee, 2021). Lenchenko, 2020))



Gambar 1. Fungsi fimbriae tipe 1 dan 3 selama infeksi *K. pneumoniae* dan pembentukan biofilm. (Paczosa, 2016)

#### d. Siderofor

*K. pneumoniae* memiliki untuk mencuri besi dari inangnya, juga dari lingkungan yang miskin besi selama infeksi, yang sangat penting untuk pertumbuhan dan replikasinya. Oleh karena itu, bakteri *K. pneumoniae* mensekresi satu atau lebih protein dengan afinitas tinggi untuk besi, yang disebut siderophores. Yaitu : enterobactin, salmochelin, yersiniabactin, dan aerobactin. Enterobactin adalah siderophore utama yang digunakan oleh *K. pneumoniae*, meskipun dihambat oleh molekul lipocalin-2 host. Salmochelin adalah bentuk c-glukosilasi enterobactin Yersiniabactin dan aerobactin secara structural berbeda dari enterobacterin dan salmochelin. Tidak ada siderofor yang dapat dihambat oleh lipocalin-2, tetapi fungsi yersiniabactin berkurang dengan adanya molekul transferin host. Produksi sejumlah siderofor yang berbeda memungkinkan *K. pneumoniae* berkoloni dan menyebar ke sejumlah tempat berbeda di dalam host, dengan peran khusus untuk setiap siderofor. FepA, IroN, YbtQ, dan lutA, masing-masing berfungsi sebagai transporter khusus untuk siderofor enterobaktin, salmochelin, yersiniabactin, dan aerobactin. . (Paczosa, 2016)

#### **e. Biofilm**

*K. pneumoniae* mampu membentuk biofilm, yaitu, agregat di mana sel-sel yang tertanam dalam matriks yang diproduksi sendiri dari zat polimer ekstraseluler melekat satu sama lain dan/atau ke permukaan. Substansi polimer ekstraseluler adalah struktur kompleks yang terdiri dari polisakarida, protein dan DNA. Biofilm *K. pneumoniae* yang paling signifikan secara klinis adalah yang terbentuk pada permukaan bagian dalam dari kateter dan alat-alat lainnya. Biofilm *K. pneumoniae* juga dapat berkontribusi pada kolonisasi saluran pencernaan, pernapasan dan saluran kemih dan perkembangan infeksi invasif terutama pada pasien dengan gangguan sistem imun. Pengembangan *K. pneumoniae* pada permukaan padat dimulai dari perlekatan sel, hingga pembentukan mikrokoloni, pematangan dan akhirnya penyebaran sel-sel yang hidup bebas. Struktur permukaan yang paling penting yang terlibat dalam proses pembentukan adalah tipe 3 fimbriae dan CP. Fimbriae memediasi perlekatan yang stabil, sedangkan CP pada akhirnya mempengaruhi komunikasi sel ke sel dan arsitektur bio film. Mengingat proses dinamis produksi biofilm dan variabilitas rangsangan lingkungan, sel yang tertanam harus mampu melakukan perubahan ekspresi gen yang cepat dan ekstensif. Regulasi transkripsi dikendalikan oleh penginderaan kuorum (quorum sensing) yaitu sistem sinyal dan respons yang mengoordinasikan ekspresi gen dalam komunitas mikroorganisme. (Piperaki, 2017, Lenchenko, 2017)

*K. pneumoniae* dalam biofilm sebagian dilindungi dari pertahanan imun. Matriks memblokir akses antibodi dan peptida antibakteri dan mengurangi efisiensi komplemen dan fagositosis. Mekanisme yang secara aktif mengubah kekebalan terhadap penurunan respon inflamasi memungkinkan pembentukan infeksi kronis. Biofilm menyebabkan resistensi tingkat tinggi terhadap antibiotik. Faktor terpenting yang menentukan resistensi adalah status pertumbuhan bakteri. Di dalam "inti dalam" biofilm, bakteri beradaptasi dengan kelaparan dan oksigen rendah yang mengakibatkan terhentinya pertumbuhan yang, pada gilirannya, mengurangi efisiensi antibiotik yang menargetkan sel-sel yang aktif secara metabolik dan membelah. (Piperaki, 2017)



Faktor virulensi seperti Outer Membrane Proteins (OMPs), porins, pompa penghabisan, sistem transportasi besi, dan gen yang terlibat dalam metabolisme allantoin juga berperan sebagai faktor virulensi, tetapi belum sepenuhnya dikarakterisasi dan masih banyak yang harus dipelajari lebih lanjut. ( Bengoechea,2019; Choby, 2020).

#### **2.1.7. Penyakit dan gejala klinis infeksi *K.pneumoniae***

*K.pneumoniae* dapat menginfeksi berbagai sisi, termasuk paru-paru, saluran kemih, aliran darah dan otak. Infeksi ini biasanya terjadi pada menurunnya mukosa tubuh, namun dapat menjadi infeksi oportunistik ketika imunitas menurun. Infeksi primer yang disebabkan oleh strain klasik *K. pneumoniae* biasanya pneumonia atau ISK. Strain *K. pneumoniae* klasik cKP juga menyebabkan infeksi yang sangat serius seperti bakteremia, dapat berupa bakteremia primer atau bakteremia sekunder yang timbul dari penyebaran sekunder dari infeksi primer di paru-paru atau kandung kemih. (Paczosa, 2022)

Untuk membedakan kolonisasi dan infeksi, beberapa hal berikut perlu dipertimbangkan:

1. Deteksi *Klebsiella* dalam aliran darah menunjukkan infeksi aktif, karena dalam keadaan normal darah berada dalam kondisi steril, bukan seperti saluran napas yang merupakan daerah kolonisasi *K.pneumoniae*
2. Gejala pasien, tanda klinis, pemeriksaan laboratorium, dan data pencitraan harus digunakan untuk membedakan kolonisasi dari infeksi. Misalnya infeksi pernapasan dengan *Klebsiella* didiagnosis jika pasien mengalami demam, batuk, produksi sputum, leukosit tinggi, dan bukti pencitraan pneumonia di paru-paru.
3. Ketika pasien memiliki penyakit yang mendasari seperti COPD, diabetes, penyakit jantung, transplantasi organ, atau baru-baru ini riwayat penggunaan steroid atau obat antimikroba, infeksi *Klebsiella* harus dipertimbangkan saat kultur positif diperoleh. Singkatnya, infeksi oleh *K. pneumoniae* sering terjadi berasal dari bakteri yang berkolonisasi di dalam inang, dan faktor klinis dan bakteriologis harus dipertimbangkan untuk membedakan infeksi aktif dari kolonisasi. (Chang, 2021)

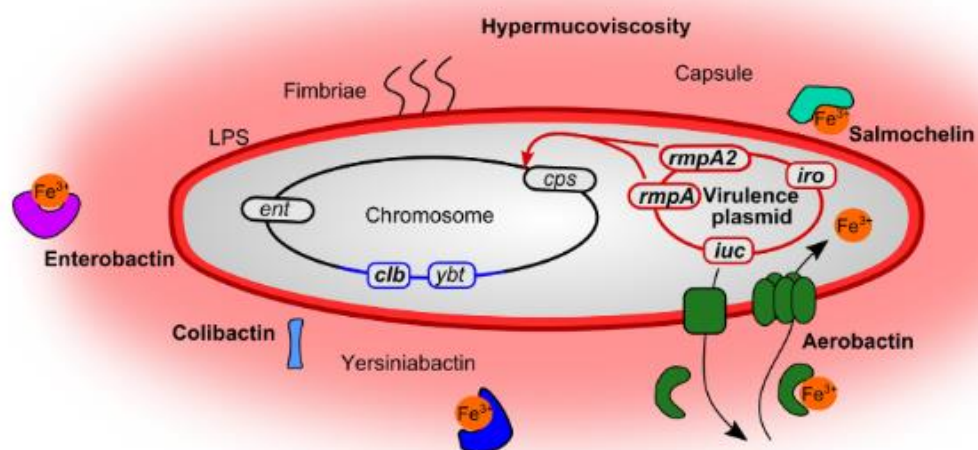
## 2.2. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (HvKP)

### 2.2.1. Definisi HvKP

*Klebsiella pneumoniae* hipervirulen adalah patotipe *K.pneumoniae* yang memiliki gen pengkode daya virulensi yang lebih tinggi dari tipe klasik (cKP), lebih sering menyebabkan infeksi komunitas, pada individu yang lebih sehat, dengan gejala yang lebih berat, namun tidak memiliki gen resistensi multi antibiotik seperti cKP. (russo,2018, choby, 2020)

### 2.2.2. Genetik hvKP

Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKP) ditandai dengan adanya faktor genetik tertentu yang memberikan fenotipe hipervirulennya. Gen terkait hipervirulen termasuk gen plasmid *rmpA*, *rmpA2*, *iroB* -CDN, *iutA*, *iucA*-BCD dan *ybt*. Gen-gen ini biasanya dikode pada plasmid virulensi besar yang terjaga kelestariannya seperti pLVPK. Namun pada beberapa strain, hipervirulen terkait dengan gen yang dikode oleh kromosom sebagai badian dari elemen konjugatif integratif (ICE). (Walker, 2020)



Gambar 2. Gambaran lokasi gen pengkode hvKP.

Gambaran lokasi gen pengkode hvKP. Fenotip yang ditebalkan adalah fitur yang menghasilkan peningkatan virulensi hvKp. Yang tidak ditebalkan, adalah faktor tambahan yang berkontribusi pada patogenesis semua *K. Pneumoniae*, yaitu

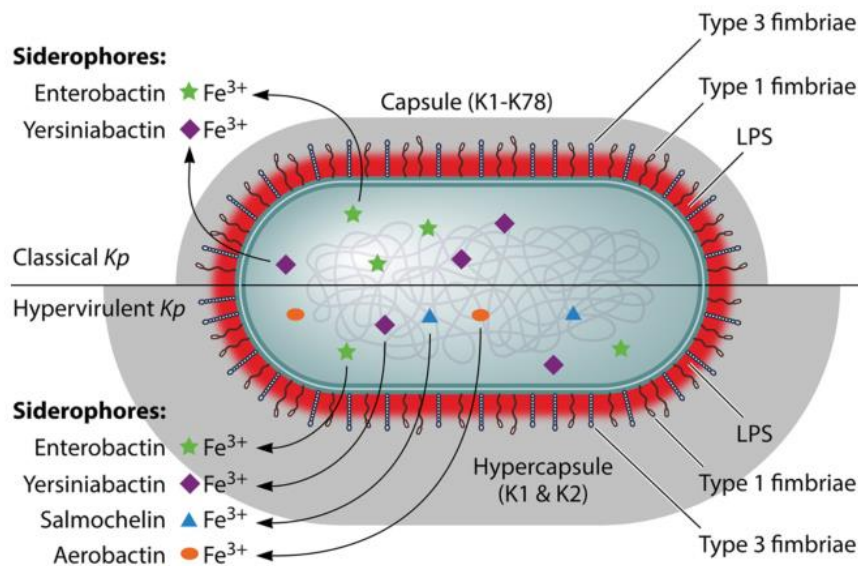
sistem siderophore enterobactin (ent) dan yersiniabactin (ybt), serta fimbriae dan LPS di permukaan. elemen konjugasi dalam kromosom, ditunjukkan dengan warna biru. Regulator transkripsi yang dikodekan plasmid *rmpA/rmpA2* (pengatur fenotipe mukoid) mengatur lokus kapsul kromosom (*cps*) yang menyebabkan hiperkapsul terkait dengan fenotipe hypermucoviscous dari hvKp. Strain hvKp sering dari jenis kapsul K1 dan K2. Dikodekan pada virulensi plasmid juga merupakan sistem siderophore salmochelin (*iro*) dan aerobactin (*iuc*). (choby, 2020 )

### 2.2.3. Faktor virulensi HvKP

#### a. Hypermukoviskositas

*K. pneumoniae* memproduksi kapsul asam polisakarida yang kompleks, besar, berlendir yang melindungi diri dari agen bakterisidal, memungkinkan bakteri ini untuk berkoloni pada saluran pernapasan dan saluran kemih manusia. Beberapa strain . menghasilkan hiperkapsul, juga dikenal sebagai hipermukoviskos. Lapisan kapsul tebal terdiri dari lapisan bakteri eksopolisakarida mukoviskos yang lebih kuat dari kapsul biasa, lebih virulen dan secara klinis lebih terlihat. Tingginya tingkat virulensi galur hvKp, setidaknya sebagian, disebabkan oleh produksi bahan kapsuler yang berlebihan (fenotipe hiper mukoviskos). Meskipun fenotipe hipermuskoviskus berasosiasi dengan sindrom yang invasif, namun tidak semua strain hvKp bersifat hipermuskoviskus. Sebaliknya, ada non-hvKp yang secara fenotip hipermuskoviskus. ( Lan, P., 2021, Paczosa, 2016)

Berdasarkan pengujian serologis tradisional, terdapat 79 jenis kapsul dengan strain spesifik yang disebut antigen K (K1-K79) . Serotipe K1,K2,K5, K20, K54 dan K57 iberkaitan dengan virulensi. K1 dan K2 dikaitkan dengan peningkatan patogenisitas seperti pada hvKp.. K1 lebih banyak menyebabkan abses hepar, sementara K2 pada umumnya diisolasi dari pasien ISK, bakteremia dan pneumoniae dapatan komunitas. (Lan, 2021 ; Martin, 2018; Piperaki, 2017, Paczosa, 2016).



Gambar 3. Perbedaan kapsul klasik dan hiperkapsul hvKp.

#### b. Siderofor

Siderofor adalah molekul kecil yang disintesis dari dalam tubuh bakteri lalu disekresikan bakteri ke cairan ekstraseluler untuk mengikat molekul Fe bebas dan mentransportnya kembali ke dalam bakteri melalui mesin impor tertentu. Fe adalah zat yang sangat dibutuhkan untuk metabolisme bakteri. HvKP memproduksi siderofor 6-10 kali lebih banyak dari cKP, sehingga meningkatkan efisiensi pertumbuhan bakteri. Sementara konten dan ekspresi siderofore bervariasi antara garis keturunan genetik *K. pneumoniae* yang berbeda. Kemampuan untuk menyerap zat besi berkontribusi terhadap potensi patogen organisme ini.

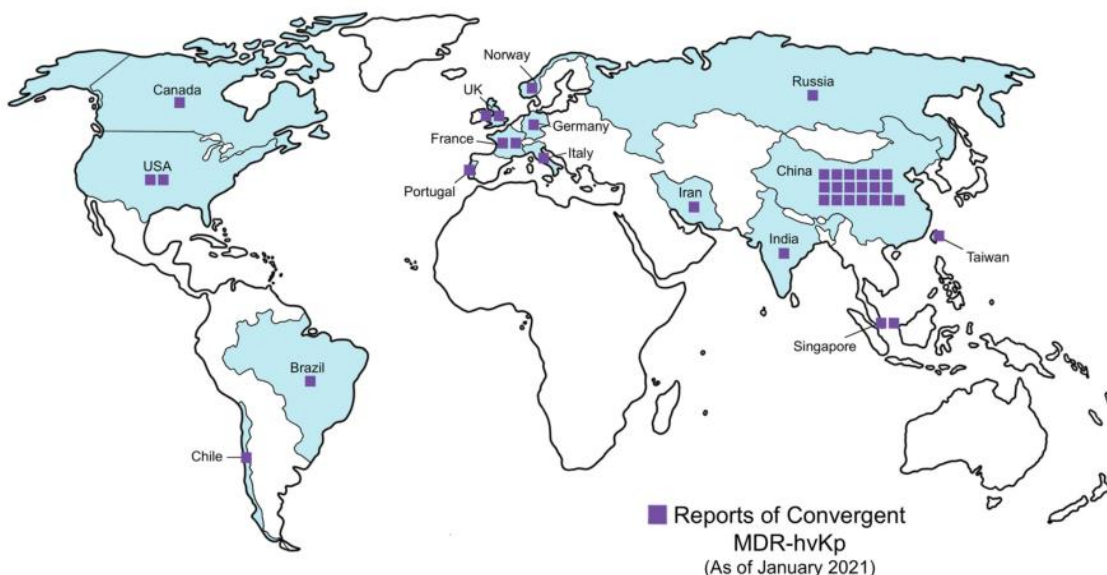
Enterobactin dibuat oleh hampir semua strain, dan yersiniabactin dibuat oleh sekitar setengah dari cKP dan hampir semua hvKP. Salmochelin dan aerobactin jarang diproduksi oleh strain klasik tetapi biasanya disekresikan oleh strain hvKP, dengan aerobactin menjadi yang paling tinggi dinyatakan dari siderofor. Aerobactin dan yersiniabactin lebih banyak ditemukan pada hvKp daripada cKp. (Gonzalez, 2021; Zu, 2021)

#### 2.2.4. Epidemiologi penyakit Infeksi HvKP

HvKp, pertama kali ditemukan di Asia Timur, tepatnya di Taiwan pada akhir 1980-an. (gambar 1). Selanjutnya menonjol di area Asia pasifik, lalu dilaporkan

semakin meningkat di benua lain. K1 adalah serotipe yang paling dominan yg diisolasi dari pasien abses hepar pada sebuah studi di China timur (68.9%) diikuti oleh K2 (20%). Hal serupa terjadi di Asia, Jerman dan Taiwan. K1 dan K2 juga dilaporkan dari Amerika utara, Eropa, Australia Afrika dan Timur tengah. Pada tahun 2016, Jepang melaporkan kasus abses hepar oleh K2 dua kali lebih banyak dari K1. Tahun 2018, Remya et al mendapatkan presentasi K2 yang jauh lebih tinggi dari K1 pada hiperviskus *K. pneumoniae*. ( Liu, Gonzalez-Ferrer, 2021, Remya, 2018).)

Sebuah studi dari 2009 sampai awal 2020 sebelumnya telah meninjau secara menyeluruh laporan isolate konvergensi MDR-hvKp, termasuk faktor genetik yang diidentifikasi dalam isolat konvergen. Temuan yang paling mengkhawatirkan adalah plasmid mosaik yang mengandung baik gen resistensi antibiotik dan virulensi pada isolat yang diperoleh dari pasien di Norwegia, Inggris, Cina, dan Jerman karena plasmid mosaik ini dapat bertindak sebagai “toko serba ada” untuk transmisi simultan dari hipervirulensi dan fenotipe resistensi antimikroba menjadi galur cKp. Mortality rate hvKp berkisar 3-55%. Di Taiwan, lebih dari 3000 kasus baru abses hati piogenik terjadi setiap tahun. Prevalensi konvergensi carbapenemase dan hvKp (CR-hvKp) telah mencapai 7.4–15% di daerah endemic hvKp. Semua angka ini menjadi tantangan klinis yang serius, terutama di Asia. (Mike, L. A, 2021, Gonzalez-Ferrer, 2021, Gu, 2018)



Gambar 4. Laporan global konvergensi MDR-hvKp

MDR-hvKp resistan terhadap banyak obat dan hipervirulen. Negara di mana infeksi MDR hvKp konvergen telah dilaporkan diarsir biru, dan jumlah

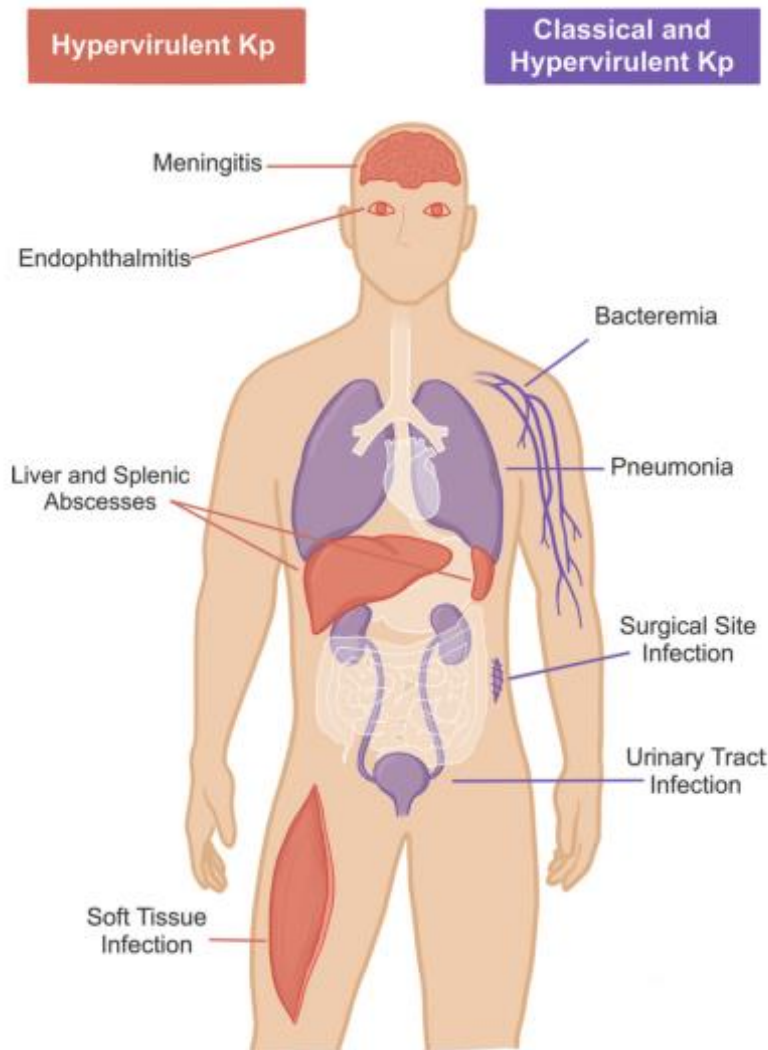
laporan dari masing-masing negara ditunjukkan dengan kotak ungu.  
(Gonzales)

### **2.2.5. Gejala Klinis infeksi hvKP**

Infeksi hvKP lebih sering terjadi di luar rumah sakit atau komunitas. Faktor virulensi yang tinggi dapat menyebabkan gejala berat yang progresif, meski pada orang tanpa gangguan imunitas sekalipun. Berbeda dengan hvKP, infeksi cKP lebih sering terjadi di rumah sakit dan melibatkan pasien immunocompromised. Lokasi infeksi cKP juga terjadi pada infeksi hvKP. Penyakit yang paling sering terjadi baik oleh infeksi hvKP maupun cKP adalah pneumonia, bakteremia, infeksi daerah operasi dan infeksi saluran kemih. Namun, gejala dan perjalanan penyakit oleh hvKP lebih berat dan lebih cepat mengalami perburukan. HvKP juga dapat mencapai daerah terisolir seperti susunan saraf pusat (meningitis) dan mata (endophtalmitis), organ pencernaan seperti abses hepar dan abses limpa serta infeksi jaringan lunak.

*K.pneumonia* sendiri, sudah memberikan gejala yang relatif lebih berat dari bakteri lainnya, karena menyebabkan peradangan dan nekrosis pada jaringan sekitarnya. Pneumonia misalnya, yang disebabkan oleh *K. pneumoniae* mirip dengan yang terlihat pada pneumonia yang didapat dari komunitas. Pasien mungkin mengalami batuk, demam, nyeri dada pleuritik, dan sesak napas. Namun sputum yang dihasilkan oleh mereka yang terinfeksi oleh *K. pneumoniae* digambarkan sebagai "currant jelly." Menunjukkan adanya peradangan dan nekrosis yang signifikan pada jaringan di sekitarnya. Infeksi hvKP adalah

ekskalasi dari (Ashurst,2018)



Gambar 5. Perbedaan penyakit akibat hvKP dan cKP.

Warna ungu menunjukkan penyakit yang disebabkan oleh kedua strain (hvKP dan cKP). Warna merah disebabkan oleh hvKP (Gonzales, 2021)

### 2.2.6. Diagnosis mikrobiologis hvKP

Pemeriksaan kultur bakteri yang dilanjutkan dengan uji biokimia merupakan gold standard dalam identifikasi *K.pneumoniae*. Namun, dengan pemeriksaan ini belum dapat dibedakan patotipe baik hvKP, cKP maupun MDR-hvKP. Tes manual yang sudah lama digunakan adalah sebuah prediksi hvKP dengan mengukur tingkat hipermuskoviskositas koloni secara sederhana yang dikenal sebagai String test.(Rafat 2018)



Gambar 6. Tes String. Tes String positif

Yang menggunakan loop inokulasi untuk menghasilkan string kental dari koloni bakteri, digunakan untuk mengevaluasi fenotipe hypermucoviscous. Tes positif, didefinisikan sebagai panjang tali > 5 mm di atas pelat agar belum terputus (Eissenmenger, 2021)

Berpuluh tahun tes klasik tetapi sederhana, cepat, dianggap sebagai metode skrining untuk fenotip Hmv *K. pneumoniae*, namun sering diasosiasikan sebagai hvKP. Penggunaannya bersinergi dengan metode lain, untuk memperkuat diagnostik. Penggabungan tes string ke dalam praktik sehari-hari di ICU pada surveilans mikrobiologis dapat mencegah infeksi. Contohnya, nilai ratio dari uji pembunuhan *G. mellonella* dikombinasikan dengan tes string meningkat menjadi 95,56%, 94,83%, 93,48%, 96,49%, 95,15, 18,47, dan 0,05, masing-masing.



Sementara uji tanpa tes string hanya 97.78%, 31.03%, 52.38%, 94.73%, 60.19%, 1.42, and 0.07 . Semua nilai yang gabungan uji pembunuhan *G. mellonella* dan uji string lebih baik daripada salah satu metode saja Setelah organisme itu ditemukan, penularan patogen dapat dicegah dengan memperkuat tindakan pencegahan infeksi seperti tangan dan lain-lain. Tes String tidak secara langsung dan definitive mengidentifikasi hvKp, namun dapat menjadi salah satu pertimbangan untuk memprediksi hvKp melalui hyperpermucoviscous akibat produksi CPS secara berlebih. (Choby, 2020, Eissenmenger, 2021)

### 2.2.7. Diagnosis molekuler hvKP

Diagnosis molekuler hvKP sering dapat memastikan identifikasi dibandingkan dengan pemeriksaan fenotip koloni yang bersifat hipermukoid. Hipermukoid diasosiasikan sebagai bentuk fenotip dari hvKP. Namun hvKP lebih ditentukan oleh produksi kapsuler. Meskipun Gen *rmpA* dan *rmpA2* ini meregulasi ekspresi mucus dan kapsul.( Hao, Chobby).

Selain mengkode fenotip kapsul, gen2 hipervirulen *K.pneumoniae* juga mengkode faktor virulensi lain. Gen-gen tersebut diproduksi oleh plasmid. Aerobactin adalah sebagai produk siderofor strain HvKP. Gen *iucA* adalah gen *iuc* operon yang mengkode aerobactin, adalah marker genetik yang membedakan serotipe hvKP dan cKP. Bila ditambahkan dengan identifikasi gen *peg-344* ( transporter metabolik), maka akurasi meningkat hingga 0.98. Selain itu terdapat gen biosintesis siderophore yersiniabactin ICEKp1 dan gen yang mengkode siderophore salmochelin (*iroB*). Gen-gen ini merupakan biomarker penentu hvKP yang akurat. (Russo,2018)

Tabel 1. Gen target hvKp

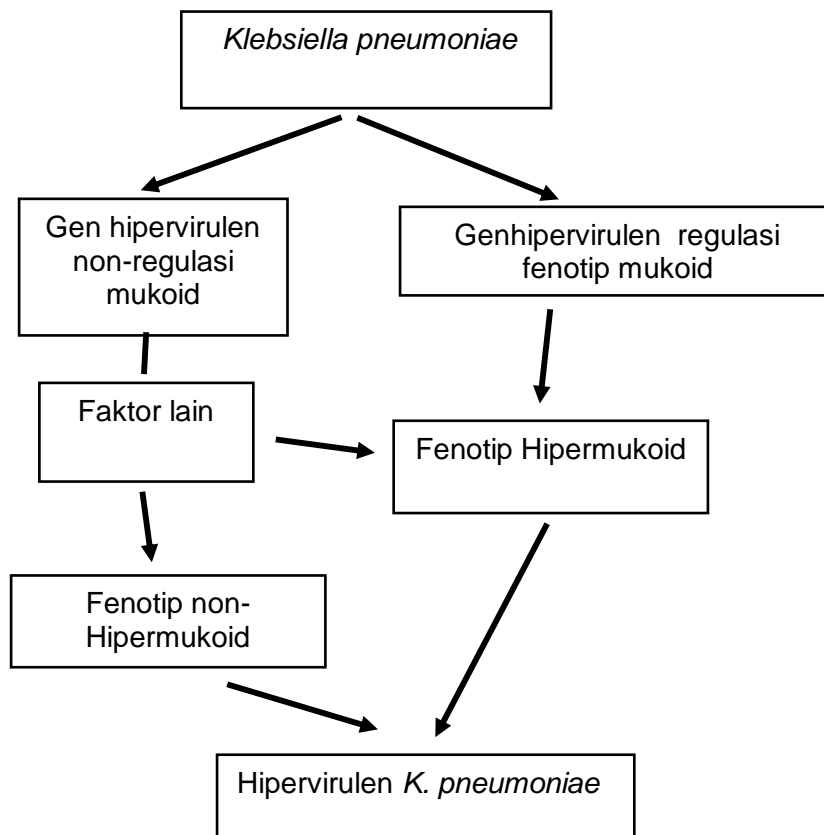
Gen	Primer	Sequence (5'-3')	Ukuran(bp)
<i>rmpA</i>	Forward	GAGTAGTTAATAAATCAATAGCAAT	332 bp
	Reverse	CAGTAGGCATTGCAGCA	
<i>rmpA2</i>	Forward	GTGCAATAAGGATGTTACATTA	430 bp
	Reverse	GGATGCCCTCCTCCTG	
<i>iucA</i>	Forward	AATCAATGGCTATTCCCGCTG	239 bp
	Reverse	CGCTTCACTTCTTTCCTGACAGG	
<i>peg-344</i>	Forward	ATCTCATCATCTACCTCCGCTC GGTTCGCCGTCGTTTTCAA	508 bp

---

	Reverse		
<i>iroB</i>	Forward	CTTGAAACTATCCCTCCAGTC,	235 bp
	Reverse	CCAGCGAAAGAATAACCCC	

---

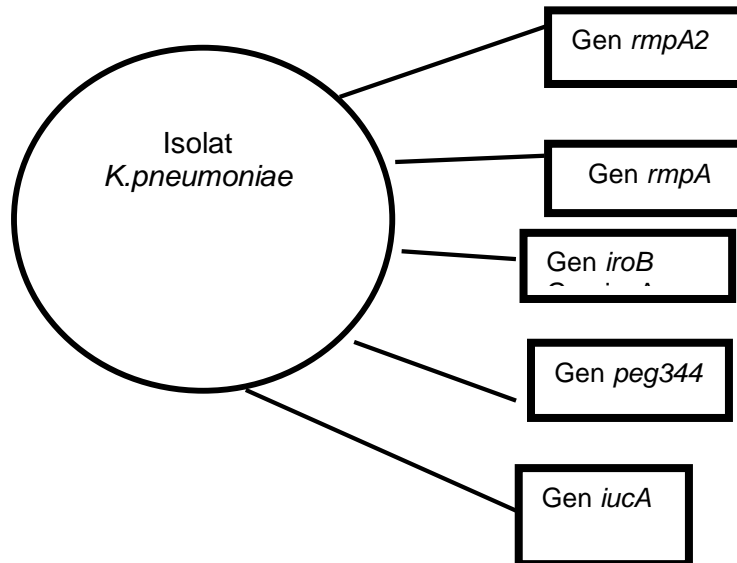
(Caneiras, Russo 2018, Teban-Man 2021)



Gambar 7. Kerangka pikir

**BAB III**  
**KERANGKA KONSEP DAN DEFINISI OPERASIONAL**

**3.1. KERANGKA KONSEP**



Gambar 8. Kerangka Konsep

**3.2. DEFINISI OPERASIONAL**

**3.2.1. Isolat *K.pneumoniae***

Isolat Koloni *K.pneumoniae* bakteri adalah *K.pneumoniae* yang tersimpan di dalam medium di dalam freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**3.2.2. Rekultur *K.Pneumoniae***

Rekultur bakteri *K.pneumoniae* adalah proses penanaman kembali pada medium Mac Conkey, dengan koloni bundar, tepi rata, mukoid, memfermentasikan laktosa (pink)

### 3.2.3. Tes biokimia *K.Pneumoniae*

#### a. Uji TSIA

Mengandung tiga macam gula-gula (Triple Sugar) yaitu laktosa, sukrosa, dan glukosa, indikator asam-basa merah fenol, dan natrium tiosulfat serta ferosulfat. Adanya pembentukan asam akan merubah warna agar yang semula berwarna jingga kemerahan menjadi kuning, sedangkan jika basa yang terbentuk, maka agar akan berubah warna menjadi merah.

Kriteria objektif : Agar miring bagian atas (slant) berwarna kuning , bagian bawah (but) berwarna kuning. , ada gas dan tidak ada H<sub>2</sub>S

#### b. Indol (SIM = Sulfur Indole Motility)

Tryptophan merupakan asam amino esensial yang dapat mengalami oksidasi dengan cara kegiatan enzimatik beberapa bakteri. Konversi triptofan menjadi produk metabolik dimediasi oleh enzim tryptophanase. Media ini biasanya digunakan dalam identifikasi yang cepat. Uji indol digunakan untuk melihat kemampuan bakteri mendegradasi asam amino triptofan secara enzimatik.

Kriteria objectif : positif bila Hasil uji indol yang diperoleh negatif, yaitu Setelah penambahan larutan kovaks, tidak terbentuk lapisan (cincin) berwarna merah muda pada permukaan (Hadioetomo RS, 1993)

Kriteria objectif ; positif bila H<sub>2</sub>S (-) Indol (-), motility (+)

#### c. Tes MR-VP (Methyl Red, Voges-Proskauer)

Uji MR digunakan untuk mendeteksi bakteri yang memiliki kemampuan untuk mengoksidasi glukosa menghasilkan produk asam berkonsentrasi tinggi yang stabil. Indikator pH methyl red (pdimethylaminoaeobenzene-O-carboxylic acid) untuk mengukur konsentrasi ion hidrogen antara pH 4.4 (merah) dan 6.0 (kuning). Media kultur yang berubah menjadi merah setelah penambahan methyl red menandakan pH ≤ 4.4 dari fermentasi glukosa menandakan hasil positif. Uji VP melihat dihasilkan asam tidak stabil dari pemecahan glukosa sehingga mudah terurai menghasilkan produk akhir non-asam atau netral seperti acetylmethylcarbinol. Uji VP dengan hasil positif terbentuk warna merah pada medium setelah ditambahkan α-naphthol dan KOH, artinya hasil akhir fermentasi bakteri ini acetylmethylcarbinol (asetolin) atau terbentuk cincin merah diantara lapisan α-naphthol dan KOH. (Mcdevitt S, 2009)

Kriteria objectif : bila hasil tes MR (+) dan VP (-)

d. Tes Citrate

Uji ini digunakan untuk melihat kemampuan organisme enteric berdasarkan kemampuan memfermentasi sitrat sebagai sumber karbon. Ammonium Dihidrogen Phosphate dan Sodium Citrate sebagai sumber nitrogen dan karbon akan tumbuh pada media ini dan menghasilkan perubahan pH. Bromtimol blue adalah indikator pH pada uji ini.

Kriteria objektif : positif bila yang akan menghasilkan perubahan warna menjadi biru. , negatif tetap hijau (Volk WA, 1991)

### 3.2.4. Tes String

String test dilakukan dengan merentangkan mukus koloni di atas medium pertumbuhan differential Mac Conkey agar, ke arah vertikal, lalu mengukur rentang mucus dari koloni tersebut. Rentang > 5mm dinyatakan positif (Eisenmenger, 2021)

### 3.2.5. PCR Gen hipervirulen isolat *K. pneumoniae*

Gen hipervirulen hvKP adalah gen yang diidentifikasi dengan metode multipleks PCR dari isolat simpan *K.pneumoniae* di RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar.

Kriteria obyektif :

- a. Gen *rmpA* adalah pita yang terbentuk pada agarosa 332 bp dengan primer:GAGTAGTTAATAAATCAATAGCAAT,(Forward),CAGTAGGCATTG CAGCA (reverse) dari isolat simpan *K.pneumoniae* di Laboratorium Mikrobiologi Klinik, RSPTN Universitas Hasanuddin
- b. Gen *rmpA2* adalah pita yang terbentuk pada agarosa 430 bp dengan primer:GTGCAATAAGGATGTTACATTA,(Forward)GATGCCCTCCTCCTG( Reverse) dari isolat simpan *K.pneumoniae* di Laboratorium Mikrobiologi Klinik, RSPTN Universitas Hasanuddin

- c. Gen . *peg-344* adalah pita yang terbentuk pada agarosa 508 bp dengan primer:CTTGAAACTATCCCTCCAGTC,(Forward),CAGCGAAAGAATAACCC (Reverse) dari isolat simpan *K.pneumoniae* di Laboratorium Mikrobiologi Klinik, RSPTN Universitas Hasanuddin
  
- d. Gen . *iroB* adalah pita yang terbentuk pada agarosa 235 bp dengan primer ATTCATCATCTACCCTCCGCTC(Forward),danGGTTCGCCGTCGTTTTCAA (Reverse) dari isolat simpan *K.pneumoniae* di Laboratorium Mikrobiologi Klinik, RSPTN Universitas Hasanuddin
  
- e. Gen . *iucA* adalah pita yang terbentuk pada agarosa 239 bp dengan primer AATCAATGGCTATTCCCGCTG(Forward),danCGCTTCACTTCTTTCACTGACAGG (Reverse) dari isolat simpan *K.pneumoniae* di Laboratorium Mikrobiologi Klinik, RSPTN Universitas Hasanuddin (Russo, 2018, Teban-Man, 2021)