

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Klebsiella Pneumoniae*

##### 2.1.1 Definisi

*Klebsiella pneumoniae* merupakan salah satu bakteri gram negatif, fakultatif anaerob dan tidak tertutup oleh selubung, serta memiliki simpai polisakarida berukuran besar sehingga member hasil positif pada tes dekarboksilase lisin dan sitrat. Bakteri ini merupakan bakteri yang normal ditemukan di rongga, mulut, kulit dan usus (Lowman dkk, 2013). *Klebsiella pneumoniae* terdapat dalam saluran napas dan feses pada sekitar 5% individu normal. Organisme ini menyebabkan sebagian kecil (sekitar 1%) pneumonia bakteri. *Klebsiella pneumoniae* dapat menimbulkan konsolidasi luas yang disertai nekrosis hemoragik pada paru. Organisme ini kadang-kadang menyebabkan infeksi saluran kemih (Jawetz dkk, 2001).

Bakteri ini tumbuh pada rentang suhu 12-43° C dengan suhu optimum 37° C. Bakteri ini memiliki kapsul polisakarida yang menonjol, kapsul ini membungkus seluruh permukaan sel yang kaya dengan asam glucouronic dan asam piruvat. Ketebalan kapsul yang besar membuat koloni *Klebsiella* berkilau dan terlihat mukoid pada agar. Bakteri ini non-haemolytic pada agar darah (gammahaemolysis) (Al-Obaidi, 2014).

Bakteri *Klebsiella* pertama kali diteliti dan diberi nama oleh bakteriologist Jerman yang bernama Edwin Klebs (1834 – 1913). *Klebsiella* merupakan bakteri gram negatif dari famili *Enterobacteriaceae* yang dapat ditemukan di traktus

gastrointestinal dan traktus respiratori. Beberapa species *Klebsiella sp.* antara lain *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae* dan *Klebsiella rhinoscleromatis*. Pada manusia, *K. pneumoniae* hidup secara saprofit dalam sistem pernafasan dan tinja manusia normal sebesar 5%, dengan 1% dapat menyebabkan radang paru – paru. Berdasarkan kebutuhannya akan oksigen, *Klebsiella sp.* merupakan bakteri fakultatif anaerob (Jawetz dkk, 2001).

Secara historis *Klebsiella* disebut Fried Landers Bacili oleh Fried Landers. *Klebsiella pneumonia* bersifat non-motil. Beberapa strain *Klebsiella* menghasilkan bacteriocin yang disebut (klebcin). Bakteri ini dapat memfermentasi laktosa, oksidase negative, urease positif, dan katalase positif (Al-Obadi, 2014).

### 2.1.2 Klasifikasi

Klasifikasi secara ilmiah :

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacter

Class : Gammaproteobacteria

Ordo : Enterobacteriales

Family : Enterobacteriaceae

Genus : *Klebsiella*

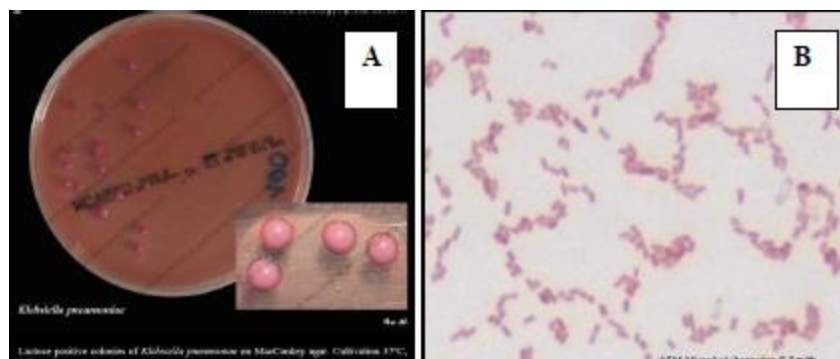
Species : *Klebsiella pneumonia* (Bergey dkk, 2005)

### 2.1.3 Morfologi dan Identifikasi

*Klebsiella* merupakan kuman berbentuk batang pendek, tidak memiliki spora, dan tidak memiliki flagela. *Klebsiella* menguraikan laktosa dan membentuk kapsul baik invivo atau invitro dan koloninya berlendir. Kapsul *Klebsiella* terdiri dari antigen O yang merupakan liposakarida yang terdiri atas

unit polisakarida yang berulang. Polisakarida O-spesifik mengandung gula yang unik. Antigen O tahan terhadap panas dan alcohol dan bisa dideteksi dengan aglutinasi bakteri. Antibodi terhadap antigen O terutama adalah IgM. Antigen kedua adalah antigen K. Antigen K ini berada di luar antigen O dan merupakan suatu capsular polysacharida. Antigen K dapat mengganggu aglutinasi melalui antiserum O dan berhubungan dengan virulensi. Kedua antigen ini meningkatkan patogenitas *Klebsiella* (Syarurachman, 1993).

*Klebsiella pneumonia* mampu tumbuh baik dengan oksigen bebas atau tanpa oksigen bebas. Organisme ini juga dikelilingi kapsul, yang meningkatkan virulensinya dengan bertindak sebagai penghalang fisik untuk menghindari respons imun inang (Thistle QA, 2015). Pada gambar 2.1 terlihat bentuk *Klebsiella pneumoniae* dibawah mikroskop pada pengeatan gram negatif.



**Gambar 2.1** Morfologi *Klebsiella pneumonia*. (A) Koloni *Klebsiella pneumonia* pada media Mac-Conkey (Thistle QA, 2015) (B) *Klebsiella pneumonia* pada pengecatan Gram negatif dengan perbesaran 1000x (Levan, 2010).

Prinsip identifikasi *Klebsiella* dengan melihat gambaran mikroskop, isolasi primer pada media, melihat penampakan koloni pada media dan melakukan tes – tes biokimiawi (Butel, 2005).

## 1. Agar Darah

Media ini digunakan untuk isolasi, menumbuhkan berbagai macam bakteri patogen dan menetapkan bentuk hemolisa dari bakteri tersebut. Media kultur ini kaya nutrisi yang menyediakan kondisi pertumbuhan bakteri yang optimal. pH media ini sekitar 6,8 untuk menstabilkan sel darah merah dan menghasilkan media hemolisa yang jelas. Kandungan yang didapat pada agar darah seperti nutrisi substrat (ekstrak hati dan pepton), NaCl, agar – agar, darah domba (Koneman, 1992).

Media Agar Darah merupakan media differensial yang berfungsi membedakan bakteri berdasar kemampuan bakteri melisis sel darah merah. Ekspresi dari hemolisis bakteri dapat diketahui ada atau tidaknya zona bening disekeliling koloni bakteri. Terdapat 3 tipe sifat hemolisis yaitu alpha, beta, dan gamma. Bakteri yang memiliki tipe hemolisis alpha adalah *S. Pneumoniae*. Hemolisis alpha terjadi penurunan hemoglobin sel darah merah di sekitar koloni sehingga sekeliling bakteri akan tampak warna hijau atau coklat dalam medium. Hemolisis beta didefinisikan lisis lengkap dengan tampilan warna transparan disekeliling bakteri pada medium. Bakteri yang termasuk beta hemolisis adalah *Streptococcus hemolitik*, *Streptococcus pyogenes*. Tipe hemolisis gamma menunjukkan kurangnya tanda hemolisis. Bakteri yang memiliki sifat ini adalah *Klebsiella sp.*, *Enterococcus faecalis* (Jawetz, 2001).

Gambaran pertumbuhan *Klebsiella sp.* pada media agar darah ditunjukkan pada Gambar 2.2



**Gambar 2.2.** Koloni *K. pneumoniae* pada agar darah (Gamma-hemolisis) (Kusuma, 2013).

## 2. Mac Conkey Agar

Media Mac Conkey agar termasuk salah satu media isolasi primer. Mac Conkey merupakan medium selektif differensial yang mengandung zat warna khusus dan karbohidrat untuk membedakan koloni yang memfermentasikan laktosa (bewarna merah jambu) dengan yang tidak memfermentasikan laktosa (tidak bewarna), ukuran dan bentuk koloni bervariasi tergantung species. Kelompok lactosa fermenter seperti *Klebsiella sp.* menghasilkan koloni bewarna merah jambu pada media isolasi primer.22 Koloni *Klebsiella sp.* membentuk koloni yang mukoid, kapsul polisakarida yang besar, kurang motil dan menunjukkan positif untuk lisin dekarboksilase dan sitrat. Media Mac Conkey memungkinkan identifikasi persumptif secara cepat pada bakteri enterik (Gupte , 1990).

## 3. Pewarnaan kapsul

Pewarnaan kapsul dengan menggunakan teknik gins – burri memiliki tujuan untuk mengetahui ada tidaknya kapsul pada bakteri. Kapsul bakteri mudah ditembus zat warna namun sukar dalam mengikat zat wana. Pada pewarnaan ini bakteri bewarna terang jernih dengan latar belakang yang gelap (Indonesia, 2004).

#### 4. Biokimia

##### 1. Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

TSIA merupakan media yang dapat mengidentifikasi bakteri sesuai dengan karakter spesifik yang ditunjukkan oleh bakteri. Media TSIA mengandung 0,1% glukosa, 1% sukrosa, 1% laktosa, ferosulfat (untuk mendeteksi produksi H<sub>2</sub>S), ekstrak jaringan (substrat pertumbuhan protein), dan indikator pH (fenol merah). Zat tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi sehingga menghasilkan agar miring dengan bagian pangkal yang dalam dan diinokulasi dengan menusukkan pertumbuhan bakteri ke dalam bagian pangkal. Jika memfermentasikan glukosa bagian miring dan pangkal akan berubah warna kuning akibat sejumlah kecil asam yang dihasilkan. Apabila produk fermentasi kemudian dioksidasi menjadi CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O dan dilepaskan dari agar miring serta dekarbosisasi oksidatif protein masih berlanjut dengan pembentukan amino ,bagian miring berubah menjadi alkalin (merah). Reaksi oleh *Klebsiella sp.* pada TSIA yaitu asam/asam bewarna kuning pada bagian pangkal dan miring, dapat terdeteksi gas, tidak dihasilkan H<sub>2</sub>S (Jawetz, 2001).

##### 2. Tes motilitas pada agar semisolid

Uji ini digunakan untuk mengetahui pergerakan bakteri. Bakteri diinokulasikan dengan menggunakan suatu kawat lurus melalui pusat medium. Organisme- organisme non-motil seperti *Klebsiella sp.* hanya tumbuh pada garis inokulum. Sedangkan organisme yang motil tumbuh keluar dari medium, yang menjadi keruh (Hart,1997).

### 3. Tes Indol

Uji indol untuk menilai pembentukan indol oleh bakteri dari triptopan sebagai sumber karbon. Bila positif menghasilkan warna merah sedangkan apabila negatif menghasilkan warna kuning. *Klebsiella sp.* merupakan bakteri dengan indol negatif (Hart, 1997).

### 4. Tes metil merah dan Voges – Prokauer (VP)

Tes metil merah digunakan untuk mendeteksi produksi asam kuat selama proses fermentasi glukosa. Pembentukan asam pada fermentasi glukosa memberikan warna merah dengan indikator metil merah. Voges – Prokauer merupakan uji untuk menentukan organisme yang memproduksi dan mengelola asam dan fermentasi glukosa, memperlihatkan kemampuan sistem buffer dan menentukan bakteri yang menghasilkan produk netral (asetil metal karbinol atau aseton) dari hasil fermentasi glukosa. *Klebsiella sp* menghasilkan warna merah yang memberikan hasil positif terhadap reaksi VP (Hart, 1997).

### 5. Tes sitrat

Biakan diinokulasi pada media simmon sitrat agar dengan inokulum yang tipis kemudian diinkubasi pada suhu 350 selama 48 jam. Jika hasil positif terjadi perubahan warna indikator dari hijau menjadi biru yang bermakna pertumbuhan bakteri pada medium sitrat menghasilkan keadaan alkalis dan bakteri telah menggunakan sitrat. *Klebsiella sp.* memberikan reaksi positif terhadap penggunaan sitrat (Koneman, 1992).

#### 6. Tes urease

Uji hidrolisis urea menunjukkan bakteri menghasilkan enzim urease. Dilakukan dengan cara menggoreskan pembiakan 1 ose pada permukaan agar miring. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Tes dinilai positif apabila menghasilkan warna merah muda dan negatif apabila warna tidak berubah. Bakteri *Klebsiella sp.* menghasilkan nilai positif pada pemeriksaan ini (Jawetz, 2001).

#### 2.1.4 Virulensi dan Struktur Antigen

Faktor yang dapat bertindak sebagai virulensi *Klebsiella* yaitu reseptor dinding sel, kapsul polisakarida, dan endotoksin. Adanya reseptor dinding sel memungkinkan *Klebsiella* melekat pada sel host, mengubah permukaan bakteri sehingga fagositosis oleh leukosit polimorfonuklear dan makrofag terganggu, dan invasi sel inang non fagositik dapat terjadi. Invasi pada sel inang ini juga difasilitasi oleh kapsul polisakarida yang mengelilingi sel bakteri, dan setelah itu *Klebsiella* memproduksi endotoksin. Virulensi infeksi *Klebsiella pneumoniae* ditentukan oleh hasil interaksi host-bakteri. Banyak faktor yang mempengaruhi patogenitas *Klebsiella pneumoniae*. Faktor-faktor lain yang mempengaruhinya yaitu kemampuan untuk melampirkan atau bereaksi terhadap sel melalui reseptor, kemampuan untuk melindungi bakteri dari fagositosis dan untuk mengubah respon imun melalui kapsul polisakarida dan kemampuan untuk secara langsung dan tidak langsung memodifikasi sistem kekebalan seluler untuk meningkatkan patogenitas (Higsmith and Jarvis, 1985).



Kapsul polisakarida pada *Klebsiella* membungkus seluruh permukaan sel dan dapat memberikan perlawanan terhadap mekanisme pertahanan inang. Genus *Klebsiella* biasanya mengekspresikan 2 jenis antigen pada permukaan sel, yaitu lipopolisakarida (antigen O) dan polisakarida capsular (antigen K). Kedua antigen tersebut berkontribusi terhadap patogenitas. *Klebsiella sp.* memiliki sekitar 77 antigen K dan 9 antigen O. Variasi antigen ini menjadi dasar klasifikasi berbagai serotype. Kapsul polisakarida tersebut memainkan peranan penting dalam proses virulensi (Sikarwar dan Batra, 2011). Bahan kapsul membentuk bundle tebal struktur fibrillous yang menutupi permukaan bakteri dan melindungi bakteri dari fagositosis oleh polymorponuclear granulosit dan mencegah terbunuhnya bakteri oleh faktor serum bakterisida. Virulensi yang dimiliki pada kapsul *Klebsiella sp.* memiliki perbedaan yang besar pada jenis kapsular yang berbeda (Podschun and Ullman, 1998)

### **2.1.5 Patogenesis**

*Klebsiella pneumoniae* termasuk genus *Klebsiella* dalam famili *Enterobacteriaceae* yang merupakan penghuni normal traktur digestivus. Kuman ini dapat diisolasi dari tinja anusia atau hewan. Pada manusia, genus *Klebsiella* merupakan kuman penyebab pneumonia, disamping infeksi lain diluar sistem pernapasan misalnya infeksi saluran kemih dan infeksi nosokomial (Susilo dll, 2004). Patogenesis *Klebsiella pneumoniae* di saluran kemih ditentukan dari faktor bakteri yang berkontribusi terhadap pertumbuhan dan pembentukan biofilm. Beberapa faktor virulensi yang dapat menurunkan efektivitas *Klebsiella pneumoniae* adalah produksi kapsul, lipopolisakaridam dan aktivitas siderofora (Clegg dkk, 2016). *Klebsiella pneumoniae* sering mengakibatkan infeksi pada

saluran kemih. *Klebsiella pneumoniae* adalah bakteri kedua setelah *Escherichia coli* sebagai agen penyebab penyakit ISK. (R. Podschun, 2017).

*Klebsiella sp.* merupakan bakteri enterik yang kadang - kadang ditemukan dalam jumlah kecil sebagai flora normal saluran napas atas. Bakteri enterik biasanya tidak menyebabkan penyakit dan mungkin di dalam usus berperan terhadap fungsi dan nutrisi normal. Bakteri menjadi patogen apabila bakteri berada dalam jaringan diluar jaringan usus yang normal atau di tempat yang jarang terdapat flora normal. Bakteri enterik juga dapat menyebabkan infeksi yang didapat dari rumah sakit (nosokomial) dan terkadang menyebabkan infeksi yang didapat dari komunitas (Jawetz dkk, 2001).

*Klebsiella sp.* memiliki kapsul besar yang terdiri dari polisakarida K yang menutupi antigen somatik dan dapat diidentifikasi menggunakan tes quellung dengan antiserum khusus. Struktur kapsul tersebut berfungsi melindungi bakteri dari fagositosis oleh granulosit polimorfonuklear, dan mencegah kematian bakteri oleh serum bakterisidal. Adanya antigen pada kapsul yang dimiliki *Klebsiella sp.* meningkatkan patogenitas bakteri. Infeksi sistem pernafasan oleh *Klebsiella sp.* umumnya disebabkan oleh kapsular antigen tipe 1 dan 2 (Syarurachman, 1993).

*Klebsiella sp.* menyebabkan berbagai infeksi pada manusia seperti pneumonia, infeksi saluran kemih, bakterimia. *Klebsiella sp.* berperan dalam penyebab pneumonia pada komunitas masyarakat atau yang disebut Community Acquired Pneumonia (CAP), juga mengakibatkan infeksi nosokomial yang dikenal dengan Hospital Acquired Pneumonia (HAP). Infeksi nosokomial adalah infeksi yang terjadi di rumah sakit dan menyerang pasien yang sedang dalam proses perawatan.

Terjadi transmisi bakteri patogen bersumber dari lingkungan rumah sakit dan peralatan rumah sakit. Infeksi nosokomial terjadi setelah pasien dalam proses rawat lebih dari 42 jam. Contoh infeksi nosokomial adalah kasus infeksi pada pemakaian pipa nasogastrik, pipa nasotrokeal yang lama sehingga terganggunya aliran sekret yang telah terkontaminasi dengan bakteri patogen (Jawetz, 2001).

*K. pneumoniae* menimbulkan konsolidasi luas yang disertai nekrosis hemoragik pada paru. Organisme ini terkadang menyebabkan infeksi saluran kemih dan bakteremia yang disertai dengan infeksi fokal pada pasien yang sangat lemah. *K. pneumoniae* dan *Klebsiella oxytoca* menyebabkan infeksi nosokomial. *Klebsiella ozaenae* yang pernah diisolasi dari mukosa nasal ozena menyebabkan atrofi membran mukosa dan berbau busuk. *Klebsiella rhinoscleromatis* menyebabkan granuloma destruktif pada hidung dan faring (Jawetz, 2001).

## **2.2 Antibiotik**

Antibiotik adalah zat-zat kimia yang dihasilkan oleh fungi dan bakteri, yang memiliki khasiat mematikan atau menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan toksisitasnya terhadap manusia dan relatif kecil. Turunan zat-zat ini dibuat secara semisintesis dan secara sintesis dengan khasiat antibakteri. Antibiotic adalah obat yang digunakan untuk membasmi mikroba penyebab infeksi pada manusia yang ditentukan harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin. Artinya, obat tersebut haruslah bersifat sangat toksik untuk mikroba, tetapi relatif tidak toksik untuk hospes (Yuliana, 2015).

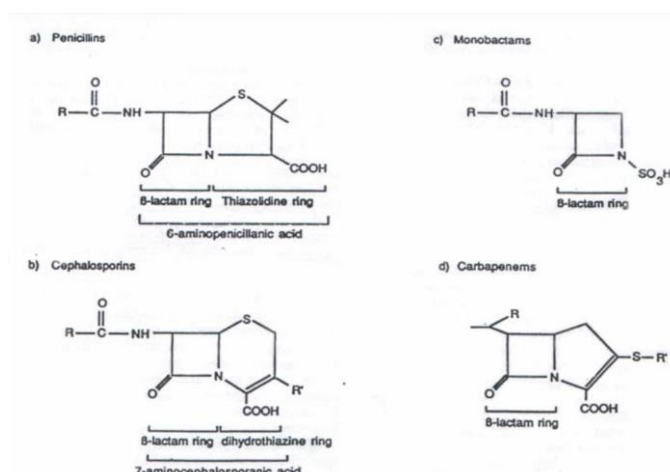
### 2.2.1 Antibiotik $\beta$ Laktam

Pencarian antibiotik dimulai pada akhir tahun 1800-an ketika teori tentang asal-usul penyakit yang menyebutkan bahwa bakteri dan mikroorganisme lain sebagai penyebab penyakit diterima oleh masyarakat luas. Penemuan antibiotik pertama kali dilakukan oleh Alexander Fleming yang secara tidak sengaja menemukan koloni bakteri *Staphylococcus* yang ditumbuhkan pada agar cawan Petri dengan metode gores silang mengalami lisis di sekitar pertumbuhan koloni kapang kontaminan (*Penicillium* sp.). Sebelum dinamakan antibiotik, pada awalnya istilah yang digunakan adalah antibiosis yang berarti substansi yang dapat menghambat pertumbuhan organisme hidup lain, dan berasal dari mikroorganisme. Namun pada perkembangannya, antibiosis ini disebut sebagai antibiotik dan istilah ini tidak hanya terbatas untuk substansi yang berasal dari mikroorganisme, melainkan semua substansi yang diketahui memiliki kemampuan untuk menghalangi pertumbuhan organisme lain, khususnya mikroorganisme. Antibiotik  $\beta$ -laktam merupakan antibiotik yang bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel, dimana lapisan peptidoglikan yang menyusun dinding sel bakteri Gram positif maupun Gram negatif akan dirusak oleh antibiotik golongan ini (Pratiwi, 2008).

### 2.2.2 Struktur Antibiotik $\beta$ -laktam

Antibiotik  $\beta$ -laktam merupakan antibiotik yang memiliki banyak variasi dan paling sering digunakan dibandingkan grup antibiotik yang lain. Famili dari antibiotik ini memiliki ciri khusus yaitu adanya cincin  $\beta$ -laktam. Antibiotik ini dibedakan dalam enam grup yang berbeda yaitu penisillin, sefalosporin, klavams

(atau oxapenams), sefamisin, monobaktam dan karbapenem (Gambar 2.1). Antibiotik  $\beta$ -laktam mengandung cincin heteroamik dengan tiga atom karbon dan satu atom nitrogen (Martel dkk., 2008). Cincin  $\beta$ -laktam pada penisilin baik yang dibuat secara alami maupun semi sintetik, dipisahkan dengan adanya cincin thiazolidine. Pada sefalosporin, cincin ini bergabung dengan cincin dihydrothiazine sedangkan pada karbapenem berkombinasi dengan rantai samping hydroxyethyl, tanpa adanya atom oksigen atau sulfur pada kedua siklus nukleusnya. Berbeda dengan antibiotik, asam klavulanat yang merupakan inhibitor enzim  $\beta$ -laktamase, mengandung cincin  $\beta$ -laktam yang terpisah dengan cincin oxazolidine dan tidak memiliki fungsi amide (Amyes, 2010).



**Gambar 2.3** Struktur kimia antibiotik  $\beta$ -laktam (Martel dkk , 2008)

### 2.2.3 Mekanisme Kerja Antibiotik $\beta$ -laktam

Mekanisme kerja dari antibiotik golongan ini yaitu dengan mencegah ikatan silang peptidoglikan pada tahap akhir sintesis dinding sel, yaitu dengan cara menghambat protein pengikat penisilin (*penicillin binding protein*). Protein ini merupakan enzim dalam membran plasma sel bakteri yang secara normal

terlibat dalam penambahan asam amino yang berikatan silang dengan peptidoglikan dinding sel bakteri, dan mengeblok aktivitas enzim transpeptidase yang membungkus ikatan silang polimer-polimer gula panjang yang membentuk dinding sel bakteri sehingga dinding sel menjadi rapuh dan mudah lisis (Pratiwi, 2008).

Dinding sel pada *Enterobacteriaceae* termasuk *Klebsiella pneumoniae* terdiri dari membran dalam sitoplasmik dan membran luar yang mengandung lipopolisakarida (LPS) & lipoprotein. LPS terdiri dari lipid A, polisakarida dan antigen O. Periplasmik merupakan celah antara membran sitoplasmik dalam dan membran luar lipid. Celah ini mengandung rantai peptidoglikan yang ditemukan pada bakteri Gram positif, sedangkan pada Gram negatif lebih sedikit mengandung peptidoglikan (Lovering dkk., 2005).

Peptidoglikan merupakan komponen essensial untuk dinding sel bakteri. Komponen ini memproteksi organisme dari tekanan osmotik, menentukan bentuk sel dan berintegrasi dengan pertumbuhan sel. Peptidoglikan (disebut juga murein) merupakan polimer (molekul besar) yang terdiri atas perulangan disakarida yang tersusun atas monosakarida N-acetylglucosamine (NAG) dan N-acetylmuramic acid (NAM). NAG dan NAM melekat pada suatu peptida yang terdiri dari 4 atau 5 asam amino yaitu L-alanin, D-alanin, asam D-glutamat, L-lisin atau asam diaminopimelat, dan membentuk selubung mengelilingi sel. Pada struktur dinding sel bakteri ini ditemukan konfigurasi D-asam amino yang berbeda dengan konfigurasi asam amino di alam yang umumnya dalam bentuk L. NAM dan NAG saling berikatan dalam ikatan  $\beta$ -1-4-glukosida, dan membentuk rantai yang disebut tetrapeptida (Pratiwi, 2008).

Antibiotik  $\beta$ -laktam merupakan analog dari residu terminal asam amino (D-alanyl-D-alanine) dari prekursor subunit peptida NAM/NAG pada lapisan peptidoglikan. Pada antibiotik  $\beta$ -laktam, transpeptidase dan karboksipeptidase bereaksi dengan *acyl-D-alanyl-D-alanine* ke bentuk letal berupa kompleks enzim serin-ester- berikatan dengan *acyl (penicilloyl, cephalosporyl)*. Kompleks enzim  $\beta$ -laktamase ini sangat stabil dan memblokir reaksi normal transpeptidase. Hasil ini memisahkan sintesis dinding sel dan membuat pertumbuhan bakteri meningkat dan tidak mengalami lisis sel dan kematian (Lovering dkk, 2005).

#### **2.2.4 Resistensi Antibiotik**

Resistensi antibiotik merupakan kekebalan bakteri terhadap antibiotik yang dapat digunakan untuk mengobati penyakit infeksi. Bakteri yang resisten dapat mempertahankan dirinya dari antibiotik sehingga menyebabkan terapi standar menjadi inefektif dan infeksi menjadi persisten (WHO, 2014).

Setiap bakteri memiliki mekanisme yang berbeda dalam menimbulkan resistensi terhadap antibiotik. Transfer gen resisten antibiotik, terutama melalui plasmid, merupakan salah satu mekanisme yang penting dalam penyebaran resistensi antibiotik pada bakteri (Apriliani, 2017).

*Klebsiella pneumoniae* telah ditemukan mampu melawan banyak antibiotik terutama sefalosporin generasi ketiga seperti Cefotaxim, Ceftriaxone dan Ceftazidime (Yeh dkk, 2007). Pengobatan antibiotik biasa untuk infeksi *Klebsiella pneumoniae* meliputi betalaktam seperti sefalosporin dan karbapenem, aminoglikosida seperti Gentamisin, dan Kuinolon. Namun perawatan ini tidak efektif melawan strain *Klebsiella pneumoniae* yang memiliki mekanisme

resistensi yang efektif. *Klebsiella pneumoniae* memiliki dua mekanisme resistensi utama yaitu produksi enzim dan pembentukan biofilm. Mekanisme resistensi lainnya telah diamati, namun belum diteliti secara seksama (Qureshi, 2015).

Perlawanan bakteri ini terhadap antibiotik betalaktam seperti, Karbapanem, Fluoroquinoles, Aminoglikosida, Trimetoprim, dan Sulfametoxazol telah banyak diamati. Namun, tidak semua strain *Klebsiella pneumoniae* mengekspresikan resistensi. Strain JH1 menunjukkan kerentanan yang tinggi terhadap antibiotik yang digunakan secara klinis, sementara strain 112281 menunjukkan resistensi *multidrug* yang luas (Kumar dkk, 2011).

*Klebsiella pneumoniae* menghasilkan berbagai enzim yang menargetkan bagian obat tertentu dan menonaktifkannya. Enzim yang diproduksi biasanya menargetkan jenis betalaktam. Namun beberapa juga menargetkan golongan obat lainnya. Enzim ini mencakup *extended spectrum beta-laktamase*, metallo-betalactamases, oxacilinases, carbapanemases *Klebsiella pneumoniae*, dan masih banyak lainnya (Cain, 2015).

### **2.2.5 Faktor Resistensi**

Faktor - faktor yang diduga mempengaruhi resistensi *Klebsiella sp* seperti status gizi, riwayat penggunaan antibiotik, dan lokasi tempat tinggal balita (Almatsier, 2004).

Status gizi yang baik akan meningkatkan resistensi tubuh terhadap penyakit, namun status gizi yang buruk akan mengakibatkan tubuh rentan terhadap penyakit. Gizi buruk menjadikan sistem imun seseorang berkurang sehingga mudah terserang infeksi (Syarif , 2007).



Riwayat penggunaan antibiotik yang tidak sesuai, misalkan pemakaian antibiotik yang terlalu sering, irasional, dosis tinggi dan intensitas yang berlebihan dalam jangka waktu lama dapat memudahkan berkembangnya resistensi di klinik (Syarif, 2007).

Lokasi tempat tinggal balita diduga mempengaruhi resistensi antibiotik. Penelitian yang dilakukan Klugman (2007) menyebutkan bahwa anak yang tinggal di perkotaan dan mudah mendapatkan pelayanan kesehatan cenderung lebih resisten terhadap antibiotik dibandingkan dengan anak yang tinggal di pedesaan dan sulit mendapatkan pelayanan kesehatan.

Terjadinya resistensi bakteri terhadap antimikroba dapat melalui tiga mekanisme yaitu obat tidak dapat mencapai tempat kerjanya di dalam sel mikroba, inaktivasi obat, mikroba mengubah binding site antimikroba. Obat tidak dapat mencapai di dalam sel mikroba dapat terjadi pada Bakteri Gram Negatif. Molekul antimikroba yang kecil dan polar dapat masuk menembus dinding luar dan masuk ke dalam sel bakteri melalui porin. Bila porin menghilang atau mengalami mutasi maka akan menghambat kerja antimikroba. Mekanisme lain Gram negatif dengan melakukan pengurangan transpor aktif dan memasukkan antimikroba ke dalam sel. Adanya mekanisme mikroba ini mengaktifkan pompa efluks untuk membuang antimikroba yang ada dalam sel (Setiabudy, 2009).

### **2.3 ESBL (*Extended Spectrum Beta Lactamase*)**

*Klebsiella sp.* mampu memproduksi *Extended Spectrum Beta Lactamase* (ESBL) yang dapat melumpuhkan kerja berbagai jenis antibiotik. Infeksi akibat bakteri penghasil ESBL dapat ditemukan di beberapa negara maju dan

berkembang seperti di Amerika Serikat sebesar 0,25%, sedangkan di Eropa kecuali Belanda didapatkan kurang dari 1% (Stobberingh, 1999). Negara bagian Asia didapatkan kejadian ESBL yang diproduksi oleh *Escherichia coli* dan *K. pneumoniae* sebesar 4,8% di Korea, 8,5% di Taiwan, dan 12% di Hongkong (Tsang, 2000).

Penelitian Antimicrobial Resistance in Indonesia (AMRIN Study) menemukan kejadian ESBL di Indonesia cukup tinggi yakni 29% pada *E. coli* dan 36% pada *K. pneumonia* (Kutaman, 2005).

*Extended Spectrum Beta Lactamase* (ESBLs) dinamakan demikian karena memiliki kemampuan untuk menghidrolisis antibiotic betalaktam spectrum luas. Bakteri menyebabkan resistensi dengan cara menghidrolisis cincin betalaktam dalam antibiotik betalaktam . plasmid yang mengkodean variabel Termoniera (TEM) dan Sulfhydryl (SHV) adalah yang paling umum ditemukan pada isolat *Klebsiella pneumoniae*, yang mana aktif melawan sefalosporin. Plasmid yang menyandi gen ESBL juga telah ditemukan membawa gen yang engekspresikan resistensi terhadap antibiotic lain selain betalaktam, seperti aminoglikosida (Vuotto dkk, 2014). Karena karbapanem tidak terdegradasi oleh ESBL, antibiotik golongan ini digunakan untuk pengobatan ketika isolat *Klebsiella pneumonia* dari sampel pasien yang memproduksi ESBL (Cain, 2015).

*Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) memediasi resistensi *broad-spectrum* sefalosporin (seperti seftazidim, seftriakson, dan sefotaksim) dan aztreonam. Gen yang bertanggung jawab terhadap produksi enzim ESBL berpusat pada plasmid dan berkembang menjadi titik mutasi, sehingga terjadi perubahan konfigurasi

bagian aktif dari gen yang asli dan dikenal sebagai  $\beta$ -laktamase (Umadevi *et al.* 2011). Sebuah penelitian di India Utara memberikan informasi bahwa uropatogen seperti *K. pneumonia*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Proteus*, dan *Citrobacter* spp. Merupakan bakteri-bakteri penghasil ESBL Formasi Biofilm, pembentukan biofilm telah berkorelasi dengan peningkatan resistensi terhadap pengobatan dengan antibiotik (Masruroh, 2016)

*Klebsiella pneumonia* telah ditemukan dapat membentuk suatu biofilm, terutama di rumah sakit dan khususnya pada kateter. Biofilm melindungi *Klebsiella pneumonia* dari pengobatan antibiotik. Proteksi ini semula dianggap sebagai hasil penetrasi molekul antibiotik namun ternyata merupakan hasil dari pertumbuhan sel yang lambat pada biofilm (Vuotto dkk, 2014).

$\beta$ -laktamase adalah enzim yang dihasilkan beberapa bakteri untuk melawan antibiotik golongan  $\beta$ -lactam.  $\beta$ -lactam merupakan antibiotik yang berasal dari penicillin dan cephalosporin, cephamycin, carbapenem. Tipe  $\beta$ -laktamase yang diperkirakan sulit ditangani Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL), AmpC yang keduanya menghidrolisis cephalosporin generasi tiga. AmpC mengnonaktifkan cephamycin dan tidak dihambat oleh inhibitor  $\beta$ -laktamase seperti clavulanic acid. Mekanisme kerja  $\beta$ -laktamase dengan menyerang ikatan cincin  $\beta$ -lactam penicillin dan cephalosporin serta menghasilkan penicillinic acid dan chepalosporic acid sehingga senyawa antibakteri tidak aktif. ESBL terjadi substitusi asam amino dan mengakibatkan perubahan konfigurasi enzim (Setiabudy, 2009).

Aktifitas antimikroba sefalosporin dengan menghambat sintesis dinding sel mikroba. Hambatan sefalosporin terjadi disaat reaksi transpeptidase tahap ketiga dalam rangkaian reaksi pembentukan dinding sel. Sefalosporin berdasarkan aktivitas mikrobanya dibagi mejadi 4 generasi. Sefalosporin generasi ketiga kinerjanya lebih aktif terhadap *Enterobacteriaceae* daripada Bakteri Gram Positif. Sefalosporin generasi keempat memiliki spektrum aktivitas yang lebih luas dari generasi ketiga, lebih stabil terhadap hidrolisis oleh betalaktamase dan berguna untuk mengatasi infeksi kuman yang resisten terhadap generasi ketiga (Syarif, 2007).

#### **2.4 CTX-M $\beta$ -Lactamases**

Enzim ini diberi nama demikian karena tingginya kemampuan aktivitas hidrofilik melawan sefotaksim dibandingkan terhadap substrat *oxymino-beta-lactam* lainnya, seperti seftazidim, seftriakson atau sefepim (Canton dkk, 2012). Enzim ini pertama kali teridentifikasi pada isolat *E.coli* yang diambil dari seekor anjing di Jepang tahun 1986 yang resisten terhadap sefotaksim tetapi menunjukkan kepekaan terhadap seftazidim. Hasil *sequencing* menunjukkan bahwa isolat ini identik dengan CTX-M-3  $\beta$ -laktamase. Isolat klinik pertama yang teridentifikasi membawa properti sefotaksim yaitu pada isolat *E.coli* yang diambil dari telinga seorang anak berumur empat bulan di Munich, Jerman tahun 1989. Gen tersebut kemudian dinamakan CTX-M-1 (CTX untuk sefotaksim dan M untuk Munich). Pada tahun yang sama juga ditemukan gen MEN-1 (berasal dari nama seorang pasien Italia yang berobat di Perancis) yang resisten terhadap sefotaksim dan hasilnya menunjukkan gen ini identik sama dengan CTX-M-1. Pada tahun 1989 juga dilakukan observasi pada *S. typhimurium* yang diambil

dari pasien yang menderita meningitis, septikemia dan enteritis di Argentina. Enzim ini berbeda titik isoelektriknya dengan CTX-M-1. Hasil sekuensing menunjukkan hanya 84% asam amino yang homolog dengan CTX-M-1 dan kemudian diberi nama CTX-M-2. Tahun 1999 ditemukan CTX-M 15 di India yang berasal dari fecal seorang pasien. Berbeda dengan CTX-M-3 dimana hanya ada satu asam amino yang berubah yaitu pada posisi 240 (Asp Gly) dengan aktivitas melawan seftazidim yang tinggi (Rao, 2012).

CTX-M  $\beta$  -lactamases selain ditemukan paling banyak pada isolat *E.coli* dan *K. pneumoniae* tetapi juga ditemukan pada kelompok *Enterobacteriaceae* yang lain seperti *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *S.marcescens*, *M. Morganii*, *Proteus* sp., *Salmonella* sp. dan *Shigella* sp. Enzim ini juga terdeteksi pada isolat non-fermentasi laktosa seperti *Pseudomonas* sp. dan *Acinetobacter* sp. CTX-M  $\beta$  -lactamases termasuk ke dalam kelompok Bush 2be dan Ambler's kelas A. Setidaknya ada 128 tipe CTX-M yang sudah teridentifikasi sejauh ini. Teknik *sequencing* asam amino dan pohon filogenetik menghasilkan kluster enzim yang terbagi dalam lima kelas, dimana setiap grup menurut Rao (2012) mempunyai kesamaan asam amino >94% dan antar grup memiliki perbedaan  $\leq$  90%.

Gen *bla*CTX-M mengkode enzim dengan 291 asam amino. Perubahan pada satu asam amino menghasilkan tipe CTX-M yang baru. Banyak dari CTX-M  $\beta$ -laktamase resisten terhadap seftaksim dan seftriakson namun hanya beberapa saja yang peka terhadap seftazidim. Bagian aktif dari enzim ini tidak cukup luas dalam mengakomodasi obat karena hanya ada satu substitusi yang spesifik berinteraksi dan bertanggung jawab melawan seftazidim dan seftaksim. Rantai C7 beta amino thiazol-oxymino-amide dari seftazidim mampu melindungi dari

efek perlawanan enzim CTX-M  $\beta$ -lactamases. Mutasi pada Asp240Gly mempunyai aktivitas menghidrolisis seftazidim (Rao, 2012).

Tidak seperti TEM dan SHV, enzim CTX-M berasal dari enzim pada *Kluyvera* sp. yang mengalami mutasi pada gen *bla*. Gen ini dibantu dengan adanya mobilisasi dalam plasmid. Spesies *Kluyvera* merupakan bakteri yang berasal dari lingkungan dan dapat diisolasi dari air, tanah, air selokan dan produk makanan. Mereka juga ditemukan dalam jumlah sedikit dengan bakteri komensal di saluran pencernaan manusia dan hewan. Mereka bertanggung jawab terhadap infeksi oportunistik dan biasanya diisolasi dari urin dan jaringan yang terinfeksi. Cluster CTX-M-1 dipercaya berasal dari gen *bla* (*KluC*) dari *Kluyvera cyrocresens*. Cluster CTX-M-2 berasal dari gen *bla* (*KluA*) dari *K. oxytoca*. Sedangkan kluster CTX-M-8, -9, dan -25 berasal dari *K. georgiana KluG*, *kluY* dan *blaCTX-M-78* (Rao, 2012).

Gen yang mengkode *blaCTX-M* biasanya ada pada plasmid yang besar yang membawa gen resisten tetapi pada kenyataannya ditemukan besarnya antara 7-430 kb. Gen ini berasosiasi dengan grup plasmid FII, dimana plasmid ini memiliki penjamu yang sempit dengan karakteristik *low copy numbers* ( Rao, 2012).

Pada dekade 2000 penyebaran dan angka kejadian yang disebabkan oleh CTX-M  $\beta$  -lactamases mulai meluas. Enzim ini diobservasi pada isolat klinik *E.coli* yang berasal dari infeksi komunitas UTIs baik di ICU maupun non ICU. Prevalensi kluster CTX-M-1 dilaporkan telah menyebar di Eropa termasuk CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-32, dan CTX-M-15. Grup pada CTX-M-9 paling banyak berada di Eropa barat daya termasuk Spanyol, Portugal dan Inggris. CTX-M-9 dan

CTX-M-14 mendominasi di Eropa utara. CTX-M-40 dan CTX-M-26 memiliki prevalensi yang tinggi di Inggris. CTX-M-14 dan -3 dominan di Cina sedangkan di Jepang yang mendominasi yaitu CTX-M-2 dan -14 (Rao, 2012).

Deteksi fenotipik untuk produksi CTX-M  $\beta$ -laktamases pada isolat *Enterobacteriaceae* sangat sulit dan tidak ada tes yang spesifik. CTX-M ESBLs mempunyai titik isoelektrik dengan perbedaan jarak yang jauh antara 7.4-9, karena itu identifikasi dengan *isoelectric focusing* tidak digunakan untuk mengidentifikasi enzim ini. Isolat yang resisten terhadap sefotaksim tapi rentan dengan seftazidim dapat diindikasikan membawa gen CTX-M, namun banyak juga gen ini yang dapat menghidrolisis sefotaksim dan seftazidim. Amplifikasi PCR dan *sequencing* merupakan cara yang dapat digunakan untuk mengkarakterisasi organisme penghasil CTX-M  $\beta$ -laktamases (Rao, 2012).

## **2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1985. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Dengan diketemukannya teknik PCR di samping juga teknik-teknik lain seperti sekuensing DNA, telah merevolusi bidang sains dan teknologi khususnya di bidang diagnosa penyakit genetik, kedokteran forensik dan evolusi molecular (Newton, 1994).

### 2.5.1 Prinsip PCR

Komponen- komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah templat DNA; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates); buffer PCR; magnesium klorida ( $MgCl_2$ ) dan enzim polimerase DNA. Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: (1) pra-denaturasi DNA templat; (2) denaturasi DNA templat; (3) penempelan primer pada templat (*annealing*); (4) pemanjangan primer (*extension*) dan (5) pemantapan (*postextension*). Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), di mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA (Handoyo, 2000).

PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (*unamplified DNA*) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (*extend primers*) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20 – 40 siklus. Target DNA yang diinginkan (*short "target" product*) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (*long product*) akan meningkat secara linier seperti tampak pada bagan di atas (Newton, 1994).



### 2.5.2 Tahapan Dalam PCR

#### 1. Proses denaturasi

Suhu denaturasi DNA template berkisar antara 93-95°C, ini semua tergantung pada panjang DNA template yang digunakan dan juga pada panjang fragmen DNA target (Watson dkk, 1992). Umumnya suhu denaturasi yang digunakan adalah 94 °C. Double stranded DNA akan membua menjadi single stranded DNA. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusya ikatan hydrogen diantara basa-basa yang komplemen. Pada tahap ini, seluruh reaksi enzim tidak berjalan. Misalnya reaksi polymerase pada siklus yang sebelumnya (Gaffar, 2007).

#### 2. Proses annealing

Suhu annealing DNA template berkisar antara 50-60°C, umumnya suhu yang digunakan adalah 52 °C. untai ganda DNA template (unamplified DNA) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu dari target DNA (Newton, 1994). Pada proses annealing ini, ikatan hydrogen akan terbentuk. Selanjutnya, DNA polymerase akan berikatan sehingga ikatan hydrogen tersebut menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerasi selanjutnya (Gaffar, 2007).

#### 3. Reaksi polimerasi (ekstensi)

Umumnya reaksi polimerisasi atau pemanjangan rantai ini terjadi pada suhu 72°C. Polimerisasi DNA digunakan untuk memperpanjang primer (extend primer) dengan adanya dNTPs (dATP,dCTP,dGTP dan

dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20-40 siklus (Newton, 1994). Pada proses pemanjangan (extention) di akhir siklus kedua akan terbentuk 4 framen untai ganda yang mengandung asam nukleat target. Oleh karena itu, dalam setiap siklus lengkap PCR terjadi penggandaan atau peningkatan logaritmik asam nukleat target dan setelah 30 hingga 40 siklus akan dihasilkan  $10^7$  hingga  $10^8$  salinan asam nukleat target (Tille, 2014).

### 2.5.3 Komponen PCR

1. Template DNA berfungsi sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. Template DNA ini dapat berupa DNA kromosom, DNA plasmid ataupun Fragmen DNA apapun asal didalam DNA template tersebut mengandung fragmen DNA target yang dituju (Innis, 1991).
2. Sepanjang primer yaitu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA template. Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen. DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses enstensi DNA (Innis, 1991).
3. dNTPs (Deoynucleotide triphosphates) merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (deoksitidin trifosfat) dan dTTP (deoksiguanosin trifosfat). Pada proses PCR, dNTPs bertindak sebagai building block DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTP akan menempel pada gugus -OH pada ujung 3' dari primer

membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA template.

4. Buffer PCR dan magnesium klorida ( $MgCl_2$ ). Fungsi buffer disini adalah untuk menjamin pH medium. Selain buffer PCR diperlukan juga adanya ion  $Mg^{2+}$ , ion tersebut dari berasal  $MgCl_2$ .  $MgCl_2$  bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polymerase. Adanya  $MgCl_2$  ini akan meningkatkan interaksi primer dengan template yang membentuk kompleks larut dengan dNTP (senyawa antara)
5. Enzim polymerase DNA berfungsi sebagai katalisis untuk reaksi polimerisasi DNA. Pada proses PCR enzim ini diperlukan untuk tahap ekstensi DNA.

#### **2.5.4 Elektroforesis**

Elektroforesis merupakan suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul protein bermuatan di dalam medan listrik (titik isoelektrik). Pergerakan molekul di dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan dan sifat kimia dari molekul (Pratiwi, 2001). Elektroforesis digunakan dengan tujuan untuk mengetahui ukuran dan bentuk suatu partikel baik DNA, RNA dan protein. Selain itu, elektroforesis juga digunakan untuk mengisolasi masing-masing komponen dari campurannya, mempelajari fitogenetika, kekerabatan dan mempelajari penyakit yang diturunkan (Klug dkk, 1994).

Setelah siklus PCR sudah tercapai sesuai dengan yang diinginkan, selanjutnya adalah dilakukan pembacaan hasil amplikasi DNA. Produk PCR

spesifik yang mengandung asam nukleat target disebut ampikon. Ampikon yang terbentuk dari proses amplikasi dapat dilihat menggunakan elektroforesis gel (Tille, 2014). Hal ini dilakukan dengan metode *Agarose Gel Electrophoresis (AGE)*. konsentersasi agarose ditentukan oleh besarnya nukleotida dari DNA yang diamplifikasi. Untuk memperoleh gambaran yang lebih baik, semakin besar jumlah nukleotidanya maka semakin kecil konsentersasi agarosanya. Dalam agarose ditambahkan *Ethidium Bromid* , selanjutnya dibaca dengan iluminasi ultraviolet (Nidom, 2007).