

DETEKSI GEN *fimH* PADA ISOLAT KLINIS *Klebsiella pneumoniae* DI RSUP SANGLAH DENPASAR

NMRP Dewi^{1,*}, NMA Tarini², NND Fatmawati²

¹Program Studi Pendidikan Dokter,

²Departemen/SMF Mikrobiologi Klinis RSUP Sanglah
Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

**e-mail*: ratihpurnamadw@gmail.com

ABSTRAK

Klebsiella pneumoniae merupakan salah satu bakteri gram negatif oportunistik penyebab *Healthcare Associated Infection* (HAIs) seperti infeksi saluran kemih, pneumonia dan sepsis. Kemampuan bakteri ini dalam proses adesi pada permukaan hospes merupakan langkah esensial dalam perkembangan infeksi *K. pneumoniae*. Salah satu faktor virulensi yang berperan penting dalam proses tersebut adalah gen *fimH*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui prevalensi *K. pneumoniae* yang memiliki gen *fimH* di RSUP Sanglah Denpasar yang dideteksi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Desain penelitian ini adalah *cross sectional* dengan menggunakan 53 sampel yang diambil dari spesimen urin (30,19%), darah (54,72%), dan sputum (15%). Sebanyak 51 (96, 23%) dari 53 isolat klinis *K. pneumoniae* membawa gen *fimH*. Penelitian ini menunjukkan bahwa gen *fimH* merupakan salah satu faktor virulensi mayor pada infeksi *K. pneumoniae*.

Kata kunci: *Klebsiella pneumoniae*, adhesin, *fimH*, PCR

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is known as an important gram negative opportunistic pathogen related to healthcare associated infections (HAIs) such as urinary tract infections, pneumonia, and septicemia. The ability of this bacteria to adhere to host cell surface is considered as an essential step for development of infection. One of virulence factors that has an important role in bacteria adhesion is *fimH* gene. Aim of this study was to determine the prevalence of *K. pneumoniae* harboring *fimH* gene in RSUP Sanglah Denpasar by polymerase chain reaction (PCR) technique. Design of this study was cross sectional with the total sample of 53 clinical isolates isolated from urine samples (30. 19%), blood samples (54.72%), and wound swabs (15%). A total of 51/53 (96.23%) isolates of *K. pneumoniae* showed the presence of *fimH* gene. This study demonstrated that *fimH* maybe one of major virulence factors in *K. pneumoniae* infections.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, adhesion, *fimH*, PCR

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah kesehatan utama, hampir setiap negara mengalami masalah ini. Dewasa ini, penularan penyakit infeksi yang sedang meningkat di dunia adalah penularan yang berikatan dengan *Health-care Associated Infection* (HAIs), yang dulunya lebih dikenal dengan sebutan infeksi nosokomial.^{1,2} Infeksi HAIs umumnya terjadi di seluruh dunia dengan kejadian terbanyak di negara miskin dan negara yang sedang berkembang.¹ Survei oleh *World Health Organization* (WHO) menginformasikan bahwa angka kejadian HAIs dengan jumlah kasus terbanyak berada di Asia Tenggara sebesar 10,0%.³

Data HAIs di Indonesia sendiri berdasarkan Departemen Kesehatan RI tahun 2004 di 10 Rumah Sakit Umum Pendidikan, diperoleh angka sedikit tinggi yaitu 6% hingga 16% dengan rata-rata 9,8%.⁴ Terjadinya HAIs menyebabkan banyak kerugian diantaranya lama rawat inap bertambah panjang, biaya lebih banyak, menambah beban pasien⁵, juga berdampak pada rumah sakit yakni izin operasional dapat dicabut karena tingginya kejadian HAIs.⁶

Beberapa tahun belakangan, bakteri gram negatif terbanyak yang ditemukan pada HAIs adalah *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*).^{7,8} *K. pneumoniae* termasuk genus *Klebsiella* dalam famili *Enterobacteriaceae*, yang merupakan flora normal pada mulut, kulit, dan saluran pencernaan manusia serta hidup bebas di tanah, air dan tanaman. HAIs yang paling sering disebabkan oleh *K. pneumoniae* adalah pneumonia (infeksi saluran pernapasan), infeksi saluran kemih, dan

sepsis.^{9,10} Kemampuan *K. pneumoniae* dalam menyebabkan penyakit baik pada pasien yang dirawat di rumah sakit maupun individu sehat dipengaruhi oleh patogenitasnya.

Dalam patogenitasnya, bakteri membutuhkan faktor virulensi untuk tetap hidup dalam sel agar berhasil berkolonisasi dan bereplikasi masuk ke jaringan.¹¹ Schembri dkk¹² menyebutkan bahwa protein adhesin merupakan faktor virulensi yang paling berkontribusi dalam patogenitas *K. pneumoniae*. Proses adesi bakteri pada permukaan mukosa hospes merupakan langkah esensial dalam perkembangan infeksi *K. pneumoniae*. Adesi bakteri *K. pneumoniae* dimediasi oleh fimbriae. Hampir seluruh isolat klinis *K. pneumoniae* mampu memproduksi dua organela fimbriae, yakni tipe 1 dan 3.^{12,13} Penelitian oleh Struve¹³ tahun 2008 mengemukakan bahwa fimbriae tipe 1 yang mengkode *fimH* banyak dikaitkan dan berperan penting dalam patogenitas infeksi saluran kemih (ISK), virulensi *fimH* pada infeksi lainnya diperkirakan ada namun, belum diinvestigasi lebih lanjut. Virulensi *fimH* dalam ISK itupun baru banyak dipelajari pada *Escherichia coli*, sedangkan pada *K. pneumoniae* masih sangat terbatas.

Pada penelitian ini diteliti mengenai keberadaan gen *fimH* pada *K. pneumoniae* yang terisolasi dari spesimen klinis di RSUP Sanglah Denpasar dengan teknik PCR. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengetahui faktor virulensi yang berhubungan dengan HAIs oleh *K. pneumoniae*, sehingga mampu memberikan tatalaksana tepat.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan FK Unud / RSUP Sanglah. Desain penelitian ini potong lintang. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler FK Unud dan Laboratorium Mikrobiologi PSPD FK Unud selama bulan Februari hingga November 2015.

Sampel penelitian ini adalah semua isolat *K. pneumoniae* yang memenuhi kriteria inklusi. Teknik pemilihan sampel adalah *convenient purposive sampling*.

Kriteria inklusi meliputi semua isolat *K. pneumoniae* yang terisolasi dari spesimen klinis (urin, darah (termasuk dari potongan kanul arteri sentral), dan sputum) periode 2013 di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah Denpasar yang tersimpan pada freezer -80°C dan berasal dari 1 pasien (*non-duplicative sample*), sedangkan kriteria eksklusi adalah semua stok *K. pneumoniae* yang tumbuh tidak murni pada plat agar darah domba 5% setelah proses penumbuhan kembali.

Bahan dan Prosedur Penelitian

Seluruh proses pengerjaan penumbuhan stok isolat dan isolasi DNA *K. pneumoniae* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi PSPD FK Unud, sedangkan untuk pengerjaan PCR dan elektroforesis dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler FK Unud.

Strain Bakteri yang Digunakan

Stok isolat *K. pneumoniae* diambil dari spesimen klinis (urin, darah, sputum). Isolat tersebut ditumbuhkan kembali pada media agar darah domba. Isolat *Staphylococcus aureus* No.

2593 digunakan sebagai kontrol negatif untuk mengetahui apakah primer spesifik terhadap gen *fimH* atau tidak.

Isolasi DNA

Isolasi DNA *K. pneumoniae* menggunakan Kit Isolasi DNA *High Pure Purification Kit* (Roche). Sebanyak 5-10 koloni *K. pneumoniae* disuspensikan dalam 200 μL PBS dan isolasi DNA dilakukan mengikuti petunjuk dari kit.

Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Elektroforesis Untuk Deteksi Gen *fimH*

Uniplex – PC yang digunakan adalah Kit PCR: Go Taq® Green Master Mix (Promega). Terdapat dua sekuen primer yang digunakan yaitu:¹⁴

- *Forward:* 5'-TGCTGCTGGGCTGGTCGATG-3'
- *Reverse:* 5'-GGGAGGGTGACGGTGACATC-3'

Konsentrasi primer yang digunakan sebesar 0,3 μL dengan panjang basa 550bp. Produk PCR dilarikan pada gel agarosa 1%, running elektroforesis selama 60 menit dalam kekuatan 50 volt, dengan suhu *annealing* 50°C dalam 35 siklus.

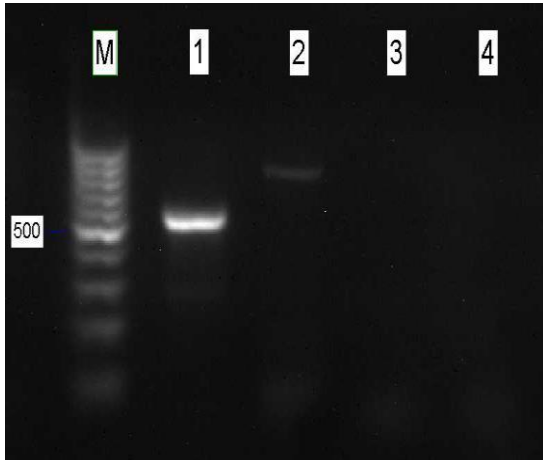
Setelah dilakukan elektroforesis dan interpretasi produk PCR, maka dapat dilakukan analisis hasil *fimH*.

HASIL

1. Gambaran Karakteristik Sampel

Sebanyak 53 isolat klinis *K. pneumoniae* digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini. Sampel diambil dari spesimen klinis yaitu urin (n=16), darah (n=29) dan sputum (n=8). Seluruh

sampel didapatkan dari Instalasi Mikrobiologi Klinik Rumah Sakit Umum Pusat (RSUP) Sanglah tahun 2013.



Gambar 1. Amplifikasi PCR gen *fimH* dengan suhu *annealing* 50°C. Lane M marker 100 bp

DNA ladder (Thermo Scientific GeneRuler); lane 1 gen positif *fimH* (550 bp); lane 2 gen negatif *fimH*; lane 3 kontrol negatif ATCC *S. Aureus* No. 25983; lane 4 kontrol negatif H₂O.

2. Hasil PCR

Semua isolat klinis *K. pneumoniae* diidentifikasi melalui proses PCR. Gen *fimH* diamplifikasi menggunakan primer spesifik dan muncul sebagai pita berukuran 550 bp pada gel agarosa 1% (Gambar 1). Tidak ada pita yang terbentuk pada kontrol negatif.

Hasilnya ditemukan 51 isolat (96,23%) dinyatakan positif memiliki gen *fimH*, sedangkan 2 isolat (3,77%) lainnya dinyatakan negatif setelah dilakukan pengulangan tes sebanyak 3 kali (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil PCR *K. pneumoniae* yang Terisolasi dari Spesimen Klinis di Instalasi Mikrobiologi RSUP Sanglah Tahun 2013

Jenis Sampel	<i>fimH</i> [+] (%)	<i>fimH</i> [-] (%)	Total Sampel (%)
Urin	15 (28,30%)	1 (1,89%)	16 (30,19%)
Darah	28 (52,83%)	1 (1,89%)	29 (54,72%)
Sputum	8 (15%)	0 (0%)	8 (15%)
Total	51 (96,23%)	2 (3,77%)	53 (100%)

PEMBAHASAN

K. pneumoniae sangat sering terlibat dalam infeksi melalui darah, saluran kemih, dan saluran pernapasan. Ketiga *site* ini diperkirakan bertanggung jawab pada mekanisme pertahanan hospes yang berbeda. Pola infeksi pada saluran kemih diperkirakan berbeda dengan bakteri yang diisolasi dari infeksi saluran pernapasan seperti pneumonia. Perbedaan pola infeksi *K. pneumoniae* ini dipengaruhi oleh patogenitas dari faktor virulensi yang dominan pada masing-masing isolat bakteri.⁹

Penelitian ini terfokus untuk mengidentifikasi salah satu faktor virulensi *K. pneumoniae* yaitu

gen *fimH* yang terdapat pada fimbriae tipe 1. Unikunya, penelitian ini menunjukkan bahwa *fimH* merupakan faktor virulensi mayor pada infeksi *K. pneumoniae* (96,23%).

Hal ini terbukti dengan ditemukannya gen *fimH* pada hampir semua spesimen isolat klinis *K. pneumoniae* baik urin, darah, maupun sputum. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan di Denmark yang menyatakan bahwa kebanyakan dari isolat klinis *K. pneumoniae* dapat memproduksi protein adhesin, salah satunya fimbriae tipe 1.⁹ Fimbriae tipe 1 mampu memediasi adesi pada struktur yang mengandung *mannose* pada sel inang dan matriks ekstraseluler, yang banyak terdapat pada spesies

Enterobacteriaceae, tidak hanya pada *K. pneumoniae* saja. Meskipun begitu, terdapat genetik yang signifikan, perbedaan serologikal dan fungsional yang membedakan varian fimbriae tipe 1 pada tiap spesies. Namun hasil temuan ini sedikit berbeda dengan penelitian sebelumnya menyatakan bahwa *fimH* bakteri *K. pneumoniae* lebih banyak menjadi faktor virulensi utama pada infeksi saluran kemih.^{13, 15}

Peran virulensi gen *fimH* ini terletak pada kemampuannya untuk mengenali *mannosylated glycoproteins* dan reseptor integrin $\alpha 1$ dan $\beta 3$ pada permukaan luminal sel urotelial. Bakteri yang berikatan dengan sel inang akan menginduksi kaskade sinyal yang secara langsung akan mengarahkan pada internalisasi bakteri dan formasi dari *biofilm-like intracellular bacterial communities*. Gen *fimH* memiliki dua domain utama, yakni (1) *amino-terminal adhesin domain (AD; receptor binding domain)* dan *carboxy-terminal pilin domain (PD)*. Gen *fimH* mengenali *mannosylated glycoproteins* tersebut melalui AD.^{14,15}

Kemampuan *fimH* dalam menyebabkan infeksi selain saluran kemih dapat disebabkan karena spesies isolat klinis *K. pneumoniae* tersebut memiliki faktor virulensi lain yang mampu berekspresi secara simultan. Penelitian yang dilakukan oleh Tarkkanen dkk. melaporkan bahwa terdapat 29 dari 32 isolat klinis *K. pneumoniae* yang berkapsul juga mampu mengekspresikan fimbriae tipe 1.¹⁶ Kapsul dan fimbriae merupakan komponen struktural yang dominan dari *K. pneumoniae* yang berperan penting dalam patogenitas dan ketahanan hidup. Hal ini mendukung hasil penelitian yang

menunjukkan bahwa sampel yang diambil dari spesimen darah dan sputum juga memiliki *fimH*.

Hal menarik lainnya yang ditemukan pada penelitian ini adalah dua sampel yang dinyatakan negatif terhadap gen *fimH*. Hal yang dapat menjelaskan temuan ini adalah kedua sampel tersebut diperkirakan memiliki faktor virulensi yang dominan selain fimbriae sehingga penelitian lebih lanjut sangat diperlukan untuk mengklarifikasi temuan ini.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, hampir semua isolat klinis *K. pneumoniae* memiliki gen *fimH* sebagai salah satu faktor virulensi mayor yang berperan dalam infeksi *Healthcare Associated Infection (HAIs)*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih banyak kepada semua pihak yang membantu, terutama Laboratorium Mikrobiologi FK Unud, Departemen / SMF Mikrobiologi FK Unud / RSUP Sanglah, serta Instalansi Mikrobiologi Klinis RSUP Sanglah. Peneliti tidak memiliki konflik kepentingan apapun dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Allegranzi, B., Nejad, S. B., dkk. 2011. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 377(9761):228-241.
2. Direktorat Jenderal Bina Upaya Kesehatan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Dirjen BUK RI). 2010. Pencegahan dan pengendalian infeksi (PPI) dan surveilans di rumah sakit. Jakarta.

3. World Health Organization (WHO). 2011. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. Geneva.
4. Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI). 2004. Pedoman Infeksi Nosokomial di Rumah Sakit. Jakarta.
5. Darmadi. 2008. Infeksi nosokomial: problematika dan pengendaliannya. Jakarta: Salemba Medika.
6. Keputusan Menteri Kesehatan RI (Kepmenkes RI). 2008: 129.
7. Susilo, J., Sartono, T. R., Sumarno. 2004. Deteksi bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada sputum dengan metode imunositokimia menggunakan anti outer membrane protein berat molekul 40 kda *Klebsiella pneumoniae* sebagai antibodi. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 20(1):12-18.
8. Noer, T. dkk. 2012. What to use attach to the small intestine. Taiwan. Tersedia di:<http://www.igem.org>.
9. Podschun, R., & Ullmann, U. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(4):589–603.
10. Williams, P., & J. M. Tomas. 1990. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. *Rev. Med. Microbiol.* 1:196–204.
11. Cheminay, C., Mohlenbrink, A., & Hansel, M. 2005. Intracellular *Salmonella* inhibit antigen presentation by dendritic cells. *J. Immunol.* 174:2892-2899.
12. Schembri, M. A., Blom, J., Krogfelt, K. A., & Klemm, P. 2005. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 73(8):4626.
13. Struve, C., Bojer, M & Krogfelt, K.A. 2008. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infection and immunity*, 76(9):4055–4065.
14. Yu, W. L., Ko, W. C., et al. 2006. *Association between rmpA and magA genes and clinical syndromes caused by Klebsiella pneumonia in Taiwan*. *Clinical Infectious Diseases*, 42:1351-1358.
15. Rosen, D.A., Pinkner, J.S., Walker, J dkk. 2008. Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract. *Infect. Immun.* 76(7):3346- 3356.
16. Tarkkanen, A. M., Allen, B. L., dkk. 1992. Fimbriation, capsulation, and iron-scavenging systems of *Klebsiella* strains associated with human urinary tract infection. *Infect. Immun.* 60:1187–1192.