

DETEKSI BAKTERI *Klebsiella pneumoniae* PADA SPUTUM DENGAN METODE IMUNOSITOKIMIA MENGGUNAKAN ANTI OUTER MEMBRANE PROTEIN BERAT MOLEKUL 40 KDA *Klebsiella pneumoniae* SEBAGAI ANTIBODI

Joko Susilo*, Teguh R. Sartono**, Sumarno***

* PPDS Paru FK Unibraw

**Laboratorium Paru FK Unibraw

***Laboratorium Mikrobiologi FK Unibraw

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) is a normal flora in human Gastro Intestinal Tract. This strain of *K. pneumoniae* are implicated the gram negative bacteria that can cause pneumonia beside urinary tract infection and nosocomial infection. Until now, to identify this bacteria there are several methods had been used included staining and culture, Elisa, histologic and serologic that need a long time. The goal of this research is to detect *K. pneumoniae* with immunocytochemistry method using antibody of *K. pneumoniae* and OMP *K. pneumoniae* as specific antigen. The design of this research was explorative descriptive. The method content of *K. pneumoniae* isolation, specific antigen of OMP *K. pneumoniae* isolation, producing antibody anti OMP *K. pneumoniae*, and detection this bacteria on sputum with immunocytochemistry method respectively. For diagnostic test sensitivity and specificity. Analysis has been used. The result showed that molecular weight of OMP *K. pneumoniae* was 40 kDa, antibody of OMP *K. pneumoniae* could identify the OMP *K. pneumoniae* as antigen and could detect *K. pneumoniae* on sputum by using Western Blotting and immunocytochemistry. Sensitivity and specificity of this diagnostic test was 90 %, 95 % consequently.

Key words : *Klebsiella pneumoniae*, Outer Membrane Protein, Immunocytochemistry

PENDAHULUAN

Klebsiella pneumoniae termasuk genus *Klebsiella* dalam famili Enterobacteriaceae yang merupakan penghuni normal traktus digestivus. Kuman ini dapat diisolasi dari tinja manusia atau hewan. Pada manusia, genus *Klebsiella* dapat merupakan kuman penyebab pneumonia, disamping infeksi lain diluar sistem pernapasan misalnya: infeksi saluran kemih, infeksi nosokomial (1).

Pneumonia atau infeksi saluran napas bawah masih merupakan masalah utama dalam bidang kesehatan, baik di negara sedang berkembang maupun yang sudah maju. Di RSUP Persahabatan Jakarta tahun 2000, infeksi saluran napas bawah juga merupakan penyakit utama, sedangkan di Malang pneumonia merupakan salah satu penyebab dari rawat inap utama (2,3).

Beberapa survei yang dilakukan di Jakarta dan Malang ternyata dapat diketahui bahwa penyebab pneumonia utama yang diambil dari bahan sputum adalah kuman *K. pneumoniae*. Soepadi P (1997) menemukan 42,85 % kasus pneumonia di Jakarta disebabkan oleh *K. pneumoniae*, sedangkan Jabang M (1998) menemukan 36,36% pada kasus pneumonia; Hadiarto M (1997) menemukan 44,4 % pada kasus pneumonia di Jakarta dan Sartono dan Sumarno di Malang (2002) menemukan 19,4%. (2,3)

Untuk mengetahui penyebab pneumonia memerlukan waktu beberapa hari sehingga pada pemberian pengobatan awal pneumonia maka diberikan antibiotika secara empiris.

Untuk mengidentifikasi kuman penyebab pneumonia dapat digunakan metode-metode: pengecatan dan kultur, Elisa,

histologi dan serologi yang semua ini memerlukan waktu yang cukup lama. Pada penelitian ini kami mencoba mendeteksi kuman *K. pneumoniae* dengan menggunakan imunositokimia dengan dasar deteksi adanya antigen spesifik kuman *K. pneumoniae*, yang selanjutnya dilakukan tes sensitifitas dan spesifitasnya.

METODE PENELITIAN

Rancangan

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kuman *K. pneumoniae* yang ada dalam sputum penderita yang dicurigai menderita pneumonia yang disebabkan oleh kuman tersebut. Metode yang digunakan adalah rancangan penelitian yang berupa penelitian deskriptif yang dilanjutkan dengan uji diagnostik. Sampel adalah sputum yang dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu sputum dengan reaksi imunositokimia positif dan negatif yang kemudian dilakukan uji silang dengan kultur sputum sebagai baku emas.

Tempat Penelitian

Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Bangsal dan Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar Malang.

Waktu Penelitian

Jadwal penelitian mulai Mei 2002 s/d Oktober 2002 atau sampai jumlah sampel tercukupi.

Sampel uji diagnostik

Sampel diambil dari sputum penderita yang dicurigai terinfeksi kuman *K. pneumoniae* yang menjalani rawat inap di bangsal Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar Malang. Pengambilan sampel dilakukan dengan metode pengambilan sputum yang benar yaitu :

1. Berkumur dengan air hangat

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XX, No. 1, April 2004.
Korespondensi: Sumarno; FK Unibraw; Jl. Veteran Malang-65145;
telp. (0341)580993,567192 fax (0341)564755

2. Kebutuhan air cukup baik dari minum maupun lewat infus.
3. Bila diperlukan ditambahkan Gliceril guaiacolate.
4. Gerakan badan ringan.
5. Tepukan dada.
6. Cara batuk yang benar :
 - posisi duduk
 - inspirasi dalam
 - batuk dikeluarkan.

Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi meliputi sputum dari penderita yang dicurigai menderita pneumonia bakteriil yang belum mendapatkan terapi antibiotika dan sputum diambil dengan cara pengambilan yang benar. Sedangkan kriteria eksklusi adalah sputum dari penderita yang dicurigai menderita pneumonia bakteriil yang sudah mendapatkan terapi antibiotika sebelumnya dan pengambilan sputum yang salah.

Jumlah Sampel

Besar sampel diperkirakan dengan memperkirakan sensitifitas dan spesifisitas yang akan diperoleh, penyimpangan sensitifitas dan spesifitas yang masih diterima. Jumlah sampel dihitung menggunakan rumus besar sampel untuk proporsi tunggal yaitu perkiraan sensitifitas uji diagnostik 80 % dan spesifitas 85 %; penyimpangan untuk sensitifitas dan spesifisitas masing-masing adalah 10 % dan interval kepercayaan yang dikehendaki 95 % ($=0,05$); maka : (4)

$$n_1 = z^2 (0,80 \times 0,20) / 0,10^2 = 1,96^2 \times 0,80 \times 0,20 / 0,01 = 61$$

$$n_2 = z^2 (0,85 \times 0,15) / 0,10^2 = 1,96^2 \times 0,85 \times 0,15 / 0,01 = 49$$

Jadi jumlah total sampel = $61 + 49 = 110$

Baku Emas

Baku emas yang kita pakai adalah hasil pemeriksaan kultur sputum. Baku emas ini dipilih karena memang merupakan modalitas diagnostik terbaik untuk kelainan yang diteliti, dan selama ini dipakai sebagai alat diagnostik (4).

Cara kerja

Penelitian Eksploratif

Metode Mendapatkan Kuman *Klebsiella pneumoniae* (5)

Kuman yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari penderita pneumonia yang disebabkan oleh kuman *K. pneumoniae* yang diisolasi laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar Malang dengan menggunakan kit Microbact yang mempunyai ketepatan 99 %. Hasil isolasi kuman *K. pneumoniae* dilakukan perbenihan dengan Biphasic Media (MH) Sampai terbentuk koloni kuman kira-kira 50 botol yang masing-masing mempunyai volume 250 ml.

Metode Isolasi Protein dari Outer Membrane Protein *Klebsiella pneumoniae* (5)

Koloni kuman *K. pneumoniae* yang telah didapatkan dari perbenihan dilakukan sentrifugasi 6000 rpm selama $\frac{1}{2}$ jam, supernatannya dibuang dan diambil pelletnya.

Pellet disuspensikan dengan PBS dan ditambahkan *n-Octyl-B-D-glucopyranoside* (NOG) 0,5 % dan selanjutnya disentrifugasi 12.000 rpm dan diambil supernatannya. Supernatan dilakukan dialisa dan disimpan untuk penelitian selanjutnya yaitu untuk menentukan spesifikasi kuman *K. pneumoniae* dan untuk membuat antibodi.

SDS-PAGE K. *Pneumonia* dan kuman lain (5)

Metode ini dilakukan untuk menentukan spesifitas kuman *K. pneumoniae* dengan membandingkan hasil SDS-PAGE dari kuman *K. pneumoniae* dan kuman lain yaitu *E.coli*, *Proteus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Pseudomonas* dan *Vibrio cholera* sehingga dapat diperoleh kesimpulan bahwa protein tersebut hanya miliknya *K. pneumoniae*.

Elektroelusi (5)

Elektroelusi ini bertujuan untuk mendapatkan protein sampel yang murni dengan memotong secara horizontal gel protein yang dimaksud. Hasil potongan tersebut dipotong lagi secara vertikal sehingga setiap potongan mengandung 3 pita protein yang sama. Potongan protein dimasukkan kedalam membran dialisis yang berisi cairan *running buffer* elektroforesis. Perlakuan elektroelusi protein tersebut dikerjakan secara horizontal menggunakan aliran listrik 125 mV selama 20 menit.

Hasil elusi didialisis selama 48 jam dengan cairan yang mengandung H_2O pada 24 jam pertama. Sedang PBS pH 7,4 dipakai pada 24 jam kedua, masing-masing pada suhu 4 °C.

Metode Isolasi Antibodi dari Kuning Telur Ayam (5)

Isolasi antibodi dari kuning telur ayam menggunakan petunjuk dari Chung (1985). Dua butir telur pertama diambil untuk isolasi antibodi preimun, kemudian pada bawah sayap ayam yang sudah bertelur tersebut disuntikkan 30 ug antigen hasil elektroelusi melalui subkutan. Suntikan yang pertama dicampur dengan *complete Freud's adjuvan*. Suntikan kedua dan selanjutnya dicampur dengan *incomplete Freud's adjuvan* dengan selang waktu 1 minggu. Telur dipanen pada hari ke 5 sampai hari ke 17 setelah pemberian suntikan *booster* ke 2. Isolasi antibodi IgY diambil dari kuning telur dengan cara memisahkan bagian putih telur dan kulit kuning telur. Kuning telur disuspensikan dengan cairan buffer A yang mengandung 10 mM kalium fosfat dan 100 mM NaCl pH 7 sampai volume mencapai 30 ml. Kemudian dicampur dengan larutan *prophylene ethylene glycol* (PEG) 6.000 30 ml 7%. Suspensi disentrifugasi 14.000 selama 10 menit suhu 4°C. Supernatan diambil dan disaring dengan kasa steril. Ditambahkan PEG padat sampai konsentrasi 12% dan diaduk sampai PEG larut. Larutan disentrifugasi 14.000 g selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet yang mengandung imunoglobulin G *Yolk sac* (IgG Y) disuspensi dengan buffer A dan dicampur dengan volume yang sama PEG 24 % dalam buffer A. Suspensi disentrifugasi 14.000 g selama 10 menit suhu 4°C. Pelet dilarutkan dengan buffer A 10 ml kemudian dilakukan dialisa dalam bufer A semalam. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi 12.000 g selama 10 menit suhu 4°C untuk menghilangkan kotoran. Supernatan disimpan pada suhu -20 °C disiapkan untuk penelitian selanjutnya.

Metode Western Blotting

Metode ini bertujuan untuk menguji apakah antibodi yang kita dapatkan dari telur ayam merupakan antibodi terhadap OMP dari *Klebsiella pneumoniae*. Gel elektroforesis tanpa pewarnaan direndam dalam *transfer buffer* selama 40 menit. Membran nitroselulosa direndam dalam *transfer buffer* selama 40 menit. Filter tebal (2 buah) ditambah Kasa biasa (2 buah) direndam dalam *transfer buffer* selama 5 menit.

Susun Sandwich terdiri dari filter tebal 2 buah, kertas saring 2 buah, Nitrocellulose membrane, gel, kertas saring 2 buah dan filter tebal 2 buah.

Transfer pada 0,3 A, 20 Volt selama 2 jam. Cuci membrane nitroselulosa dengan *aquadest* untuk menghilangkan gel yang melekat. Rendam dengan *Ponceau* 2 % selama 3 menit. Cuci dengan *aquadest* sampai warna hilang. *Blocking* dengan TBS pH 7,4 dan BSA 3 % selama 2 jam menggunakan *shaker* pada suhu ruangan. Tambahkan antibodi primer perbandingan 1: 100 overnight pada suhu 4°C. Inkubasikan pada suhu ruangan pada *shaker* selama 2 jam. Cuci dengan TBS 3 kali 5 menit. Tambahkan substrat alkaline phosphatase selama 30 menit dan siap direkam.

Penelitian untuk Uji diagnostik

Prosedur Pengecatan (21)

Usapkan sputum pada obyek glass dan keringkan dalam udara. Fiksasi dengan alkohol 96 %. Rehidrasi dengan alkohol bertingkat (80%, 70%, 50%, 30%) masing-masing 3 menit. Cuci dengan PBS pH 7,4 selama 4 menit dan diulang sampai 3 kali. Tetesi dengan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dan diinkubasi 20 menit, kemudian keringkan. Tetesi sampel tersebut dengan antibodi primer (IgG Y) dan inkubasi selama 60-120 menit pada suhu ruangan atau semalam pada suhu 4°C. Kemudian cuci dengan PBS pH 7,4 selama 2 menit sebanyak 3 kali. Tetesi dengan Antibodi sekunder *Alkaline phosphatase conjugate* 20 menit dan cuci dengan PBS lagi 3 kali. Tetesi dengan substrat untuk Alkaline phosphatase yaitu NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*). Cuci dengan destilated H₂O dan dikeringkan. *Counterstain* dengan *Mayer Hematoxiline* 5 menit. Cuci dengan air mengalir dan keringkan.

Sampel dilihat dibawah mikroskop cahaya 1.000 x, bila terdapat antigen dari kuman *Klebsiella pneumoniae* akan tampak warna biru keunguan, sedangkan bahan lain berwarna biru kemerahan.

Tes silang sampel sputum dengan kultur

Untuk membandingkan hasil pemeriksaan imunositokimia ini, maka sputum juga dilakukan kultur untuk melihat apakah sputum yang positif mengandung kuman *K.pneumoniae* dengan reaksi imunositokimia akan tumbuh kuman *K.pneumoniae* dan sebaliknya sputum yang negatif tidak akan terjadi pertumbuhan kuman *K.pneumoniae*.

Pemeriksaan kultur sputum dilakukan oleh Ahli Mikrobiologi Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar Malang yang tidak mengetahui hasil pemeriksaan imunositokimia sputum. Hasil kultur dinyatakan tumbuh kuman *Klebsiella pneumonia* atau tidak.

Analisis data

Setelah pengumpulan data selesai, dilakukan tabulasi hasil uji diagnostik (imunositokimia) dan hasil pemeriksaan baku emas (kultur sputum) untuk setiap sputum pasien.

Untuk mendapatkan kualitas uji diagnostik maka dibuat kriteria positif dengan menggunakan *cut off* sebagai berikut:

- Positif 1: bila dari seluruh lapangan pandang hanya didapatkan sedikit bakteri.
- Positif 2: bila dari tiap lapangan pandang terdapat sedikit bakteri.
- Positif 3: bila dari tiap lapangan pandang terdapat banyak bakteri.

Selanjutnya hasil tabulasi tersebut disusun dalam tabel 2 x 2 sbb. : (4)

HI	HK		
		+	-
	+	A	B
	-	C	D
		A+C	B+D
		= A + B	
		= C + D	
		= A+B+C+D	

Keterangan:

HK: Hasil Kultur

HI: Hasil Imunositokimia

Sensitifitas :

$$A / A + C \times 100 \% = \quad \%$$

Spesifitas :

$$D / B + D \times 100 \% = \quad \%$$

Nilai prediksi positif :

$$A / A + B \times 100 \% = \quad \%$$

Nilai prediksi negatif :

$$D / C + D \times 100 \% = \quad \%$$

HASIL PENELITIAN

Hasil Survei

Survei yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUD Dr. Saiful Anwar Malang tahun 2002 didapatkan hasil seperti pada tabel 1 dan tabel 2.

Tabel 1. Profil isolat bakteri yang berasal dari sputum penderita yang dirawat di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang 2002.

No.	Jenis isolat bakteri	Jumlah	%
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	18
2	<i>Staph. Coagulase pos.</i>	14	12,7
3	<i>Staph. Coagulase neg.</i>	14	12,7
4	<i>Streptococcus.sp</i>	11	9,9
5	<i>Acinetobacter anitratus</i>	10	9
6	<i>E. colli</i>	8	7,3
7	<i>Candida</i>	7	6,9
8	<i>Ps. Sketzeri</i>	4	9,6
9	<i>Pseudomonas</i>	3	2,7
10	Lain-lain	18	16,3
Jumlah		110	100

Menurut tabel diatas *K. pneumoniae* merupakan isolat yang terbanyak 20 isolat (18%), disusul *Staphylococcus coagulase positif*, *Staphylococcus coagulase negatif*, *Streptococcus sp* dan *Acinetobacter anitratus*.

Tabel 2. Hasil sensitifitas kuat dari kuman *K. pneumoniae* (n=20) yang diisolasi dari sputum penderita yang dirawat di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang 2002

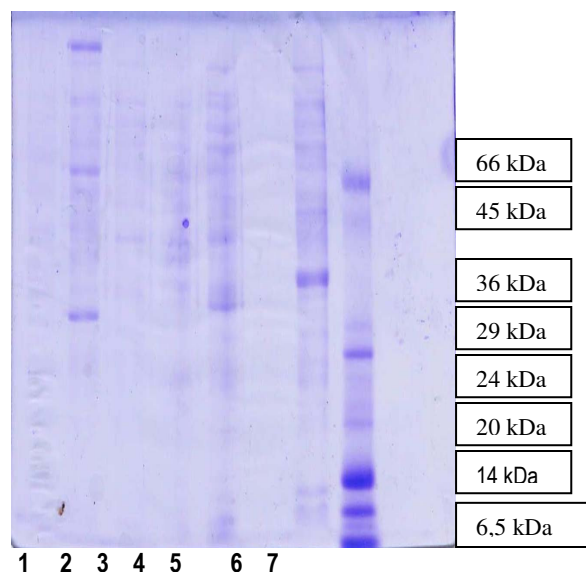
No	Jenis obat	Frekwensi	(%)
1.	Ampicillin	3	15
2	Amox-Clav.Ac.	19	95
3	Cefotaxim	20	100
4	Cefuroxim	6	30
5	Cephalotin	18	90
6	Gentamycin	20	100
7	Netimicine	20	100
8	Amikacine	20	100
9	Ciprofloxacin	16	80
10	Norfloxacin	19	95
11	Tetracycline	11	55
12	Cotrimoxazole	18	90
13	Fosfomycine	19	95

Tampak bahwa kuman *K. pneumoniae* masih peka terhadap obat-obat: Amoxycilline-Clavulanate acide, Cefotaxime, Cefuroxime, Cephalotone, Gentamycine, Netilmicine, Amikacine, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Cotrimoxazole dan Fosfomicine.

Hasil Elektroforesis kuman *K. pneumoniae* dan kuman Lain

Monitoring bobot molekul protein dari 8 galur kuman-kuman *Enterobacteriaceae* dengan menggunakan SDS-PAGE.

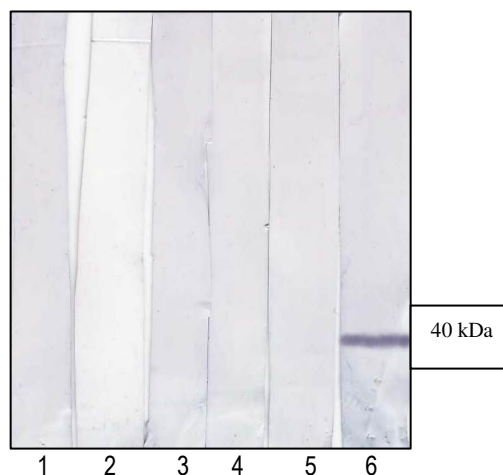
Hasil elektroforesis kuman *Klebsiella pneumoniae* dibanding dengan kuman-kuman famili *Enterobacteriaceae* ditampilkan pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil elektroforesis kuman *Klebsiella pneumoniae* dibandingkan dengan kuman-kuman dalam famili *Enterobacteriaceae*.

Lajur 1: Protein *Proteus*. Lajur 2: Protein *Enterobacter*. Lajur 3: Protein *Staphylococcus coagulase positif*. Lajur 4: *Pseudomonas*. Lajur 5: Protein *E.colli*. Lajur 6: Protein *A.anitratus*. Lajur 7: Protein *Klebsiella pneumoniae*. Lajur 8: Protein perunut menggunakan petanda albumin 66 kDa., ovalbumin 45 kDa., glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenase 36 kDa., carbonic anhydrase 29 kDa., trypsinogen 24 kDa., trypsin inhibitor 20 kDa., a-lactalbumin 14,2 kDa. Dan aprotinin 6,5 kDa.

Hasil immunoblotting antibodi terhadap OMP *Klebsiella pneumoniae* diantara kuman famili *Enterobacteriaceae* dapat dilihat pada gambar 2.

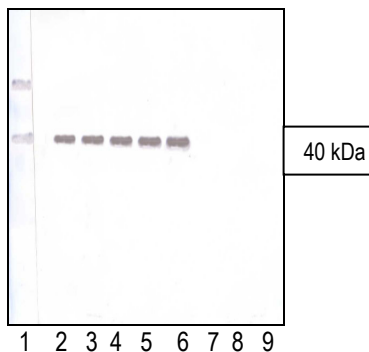


Gambar 2. Hasil imunoblotting antibodi terhadap OMP *Klebsiella pneumoniae* dibandingkan dengan kuman-kuman yang tergolong famili *Enterobacteriaceae*.

Lajur 1: kuman *Enterobacter*. Lajur 2: kuman *Staphylococcus coagulase positif*. Lajur 3: kuman *pseudomonas*. Lajur 4: kuman *E. coli*. Lajur 5: kuman *A.anitratus*. Lajur 6: kuman *Klebsiella pneumoniae*.

Dari gambar tersebut terlihat bahwa yang dikenali oleh antibodi terhadap OMP *K. pneumoniae* adalah hanya kuman *K. pneumoniae* sementara kuman-kuman yang lain tidak dikenali sehingga bisa dikatakan bahwa antibodi tersebut memang anti terhadap kuman *K. pneumoniae*. Kedudukan pita 40 kDa relative dibawah oleh karena perlakuan elektroforesis waktunya lebih lama.

Hasil immunoblotting Antibodi terhadap OMP *K. pneumoniae* pada sputum terlihat pada Gambar 3.

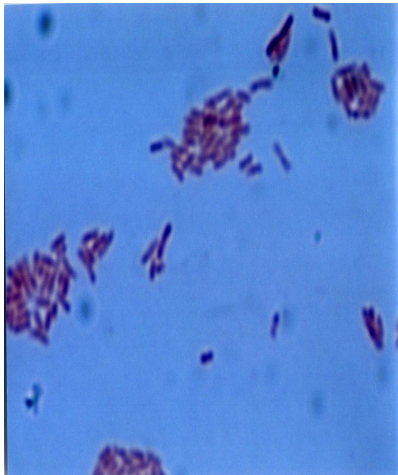


Gambar 3. Hasil immunoblotting antibodi terhadap OMP *Klebsiella pneumoniae* pada sputum yang diambil dari penderita pneumonia karena kuman *Klebsiella pneumoniae* dibanding dengan kuman lainnya (konfirmasi dengan hasil kultur).

Lajur 1: Protein perunut. Lajur 2 – 6: Protein sel bakteri utuh *K. pneumoniae* dalam sputum. Lajur 7-9: protein sel bakteri non *K. pneumoniae* dalam sputum.

Dari gambar tersebut terlihat bahwa yang dikenali oleh antibodi terhadap *K. pneumoniae* adalah pada bahan sputum yang mengandung kuman *K. pneumoniae* (sesuai hasil kultur). Sedangkan sputum yang mengandung kuman yang lainnya tidak dikenali.

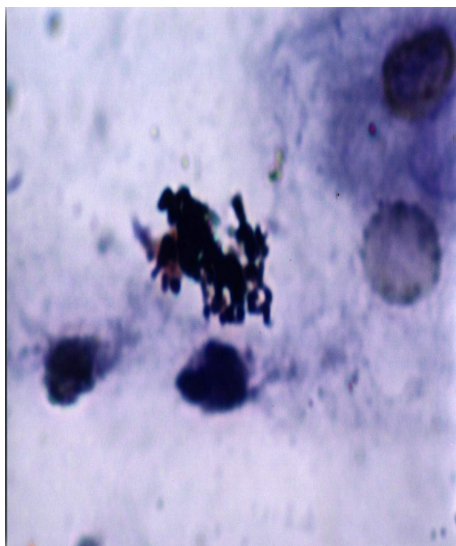
Hasil Pengecatan Gram Bakteri *K. pneumoniae* tampak pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil pengecatan gram bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

Pada pengecatan gram bakteri *K. pneumoniae* tampak kuman batang biru kemerahan.

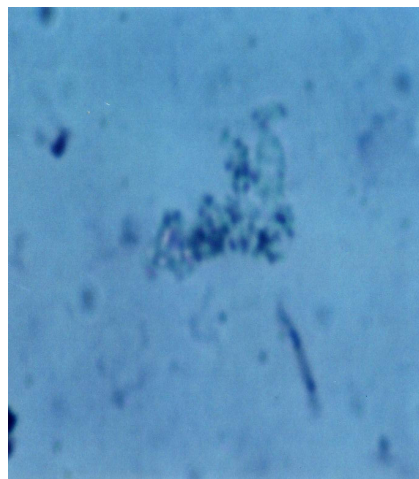
Hasil imunositokimia antibodi terhadap OMP *K. pneumoniae* pada sputum yang mengandung kuman *K. pneumoniae* dan kuman-kuman lainnya (konfirmasi dengan hasil kultur) seperti Gambar 5.



Gambar 5. Hasil imunositokimia antibodi terhadap OMP *Klebsiella pneumoniae* pada sputum yang mengandung kuman *Klebsiella pneumoniae* dan kuman-kuman lainnya (konfirmasi dengan hasil kultur).

Pada sediaan sputum yang mengandung bakteri *K. pneumoniae* (sesuai dengan hasil kultur), dilakukan pengecatan imunositokimia dengan menggunakan antibodi terhadap OMP *K. pneumoniae*, tampak bentukan bakteri batang bergerombol, berwarna biru keunguan yang dikelilingi sel-sel radang.

Hasil imunositokimia antibodi terhadap OMP *K. pneumoniae* pada sputum yang mengandung kuman bukan *K. pneumoniae* (konfirmasi dengan hasil kultur) seperti Gambar 6.



Gambar 6. Hasil imunositokimia antibodi terhadap OMP *Klebsiella pneumoniae* pada sputum yang mengandung kuman bukan *K. pneumoniae* (konfirmasi dengan hasil kultur).

Pada sediaan sputum yang mengandung bakteri selain *K. pneumoniae* (sesuai dengan hasil kultur), dilakukan pengecatan imunositokimia dengan menggunakan antibodi terhadap OMP *K. pneumoniae*, tampak bentukan bakteri batang pendek, bergerombol, berwarna biru kemerahan.

Hasil uji diagnostik antibodi anti OMP *K. pneumoniae* terhadap bakteri *K. pneumoniae* yang terdapat pada sputum, dengan menggunakan metode imunositokimia didapatkan sebagai berikut:

		HK		
		+	-	
HI	+	18	4	= 22
	-	2	86	= 88
		20	90	= 110

Keterangan:

HK: Hasil Kultur

HI: Hasil Imunositokimia

Sensitifitas :

$$A / A + C \times 100 \% = 18/18+2 \times 100 \% = 90 \%$$

Spesifitas :

$$D / B + D \times 100 \% = 86/86+4 \times 100 \% = 95 \%$$

Nilai prediksi positif :

$$A / A + B \times 100 \% = 18/18+4 \times 100 \% = 81,8 \%$$

Nilai prediksi negatif :

$$D / C + D \times 100 \% = 86/86+2 \times 100 \% = 97,7 \%$$

PEMBAHASAN

Dari survei yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUD Dr Saiful Anwar Malang tahun 2002 terhadap 110 sampel sputum, didapatkan profil isolat bakteri (Tabel 1) terbanyak adalah *K. pneumoniae* yaitu 20 (18%), disusulasi dengan bakteri *Staphylococcus coagulase positif*, *Staphylococcus coagulase negatif*, *Streptococcus* dan *A. anitratus*. Hasil ini hampir sama dengan yang didapatkan dari Laboratorium yang sama tahun 2002 yang diambil dari semua sputum yang masuk di Laboratorium tersebut. Juga dari beberapa survei yang dilakukan di Jakarta dan Malang dapat diketahui bahwa penyebab pneumonia utama yang diambil dari sputum adalah kuman *K. pneumoniae*. Soepadi P (1997) menemukan 42,85 % pneumonia di Jakarta disebabkan oleh *K. pneumoniae*, di Jakarta Jabang M (1997/1998) menemukan 36,36 %; Hadiarto M (1997) menemukan 44,4 % dan Hadiarto M (1997/1998) menemukan 20%; Sartono dan Sumarno di Malang 2002 menemukan 19,4 %.

Sedangkan hasil sensitivitas dari *K. pneumoniae* terhadap beberapa obat (Tabel 2) didapatkan sensitivitas kuat terhadap Amoxicylline-Clavulanic acide (95%), Cefotaxim (100%), Cephalotine (90%), Gentamycine (100%), Netilmycine (100%), Amikacine (100%), Ciprofloxacin (80%), Norfloxacin (95%), Cotrimoxazole (90 %) dan Fosfomycine (95%).

Dari hasil elektroforesis *Outer Membrane Protein (OMP)* *K. pneumoniae*, menunjukkan bahwa pada OMP tersebut terdiri dari beberapa fraksi protein major dan minor. Pada penelitian ini isolasi OMP dilakukan dengan menggunakan *n-octyl glucoside* (NOG). Hal ini didasarkan pada penelitian sebelumnya bahwa OMP yang diisolasi menggunakan NOG memberikan pola protein yang lebih banyak terutama protein major bila dibandingkan dengan OMP yang diisolasi dengan menggunakan sarkosil.

Outer Membrane Protein K. pneumoniae yang diisolasi menggunakan NOG didapatkan protein mayor yang mempunyai berat molekul 40 kDa.

Dari kepustakaan yang kami peroleh ternyata kapsul *K. pneumoniae* mempunyai berat molekul yang bervariasi sesuai dengan serotipenya yaitu 32 Kda, 40 kDa, 64 kDa sampai 300 kDa (6). Disini terdapat perbedaan yang kemungkinan disebabkan adanya perbedaan lingkungan/*environment* yang mengakibatkan perbedaan ekspresi gene yang selanjutnya berpengaruh pada sintesa protein dan akhirnya mempengaruhi virulensi kumannya. Perbedaan bisa juga karena adanya variabilitas galur atau strain dari kuman sehingga terdapat sifat maupun protein yang berbeda.

Protein *OMP K. pneumoniae* yang dipilih digunakan untuk membuat antibodi dengan cara mengimunisasikan protein tersebut pada ayam. Antibodi diambil dari kuning telur ayam tersebut.

Untuk membuktikan bahwa antibodi yang kita buat adalah spesifik terhadap *OMP K. pneumoniae*, dilakukan *immunoblotting* baik terhadap koloni kuman maupun bahan yang diambil dari sputum.

Pada *immunoblotting (Western Blotting)* digunakan antibodi dari *K. pneumoniae* dan sebagai antigen adalah protein dari kuman-kuman famili *Enterobacteriaceae* sesuai dengan hasil kultur kuman. Didapatkan bahwa hanya kuman *K. pneumoniae*

saja yang dikenali oleh antibodi tersebut, begitu juga pada *immunoblotting* antibodi pada sediaan sputum baik yang mengandung kuman *K. pneumoniae* maupun kuman-kuman yang lain hanya pada sputum yang mengandung kuman *K. pneumoniae* (sesuai dengan hasil kultur) yang dikenali oleh antibodi tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa antibodi terhadap *K. pneumoniae* yang kami buat tersebut spesifik untuk kuman *K. pneumoniae*. Sejauh ini belum ada penelitian lain yang membuat antibodi terhadap *K. pneumoniae* ini, sehingga hasil ini belum bisa dibandingkan dengan hasil peneliti lain. Tetapi sebagai pedoman bahwa prosedur untuk isolasi protein maupun prosedur untuk membuat antibodi telah sesuai / mengikuti prosedur yang dilakukan oleh peneliti lain untuk kuman lain yaitu dari Chung tahun 1985 (5).

Antibodi yang didapatkan, selanjutnya digunakan untuk mendeteksi bakteri *K. pneumoniae* dalam sputum dengan prinsip reaksi antigen antibodi. Sebagai antigen adalah protein OMP dari bakteri *K. pneumoniae* yang terdapat dalam sputum tersebut. Dengan teknik imunositokimia dimana antibodi diberi label dengan enzim *Alkaline phosphatase*, apabila terdapat reaksi antigen antibodi akan tampak pada dinding sel bakteri *K. pneumoniae* yang berupa bentukan kuman batang dengan warna bercak-bercak biru keunguan, sementara kuman / sel-sel lain akan berwarna biru kemerahan. (7)

Dari hasil imunositokimia yang menggunakan antibodi dari anti OMP *K. pneumoniae* terhadap bakteri *K. pneumoniae* yang ada dalam sputum didapatkan beberapa hapusan sputum dimana imunositokimia positif tetapi kulturnya negatif dan sebaliknya hasil imunositokimia negatif tetapi hasil kultur positif. Hal ini mungkin disebabkan oleh beberapa faktor antara lain:

1. Hapusan sputum yang digunakan mungkin sudah rusak, mengingat saat pembuatan hapusan pertama sampai terakhir memerlukan waktu lebih dari 7 bulan.
2. Jumlah bakteri dalam sputum sangat sedikit sehingga tidak terdeteksi saat pemeriksaan dibawah mikroskop.
3. Sputum yang dalam kultur negatif tetapi hasil imunositokimia positif mungkin disebabkan bakteri *K. pneumoniae* dalam sputum jumlahnya sedikit, pada waktu dalam perbenihan tidak tumbuh karena didominasi oleh bakteri lain atau jamur yang dapat membunuh bakteri *K. pneumoniae*.

Dari uji diagnostik untuk mendeteksi bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang ada dalam sputum dengan imunositokimia didapatkan:

- Apabila menggunakan *cut off* positif 1, maka sensitivitas 90 %, spesifitas 95 %, nilai prediksi positif 81,8 % dan nilai prediksi negatif 97,7 %.
- Apabila menggunakan *cut off* positif 2, maka sensitivitasnya 33,3 %, spesifitas 100 %, nilai prediksi positif 100 %, nilai prediksi negatif 90 %.

Apabila dilihat dari hasil uji diagnostik tersebut tampak bahwa deteksi bakteri *K. pneumoniae* dengan menggunakan imunositokimia cukup baik apabila menggunakan *cut off* positif 1, bakteri yang terdeteksi hanya sedikit pada seluruh lapangan pandang. Tetapi bila menggunakan *cut off* positif 2 maka hasilnya sangat sedikit. Hal ini mungkin disebabkan sediaan hapusan yang dipakai sudah mengalami kerusakan protein, atau mungkin karena jumlah bakteri yang memang hanya sedikit. Untuk itu diperlukan penelitian yang menggunakan sputum segar

supaya protein yang ada pada bakteri tidak rusak. Disamping itu diperlukan penelitian yang lebih spesifik untuk klinisnya misalnya penderita yang memang secara klinis khas menderita pneumonia yang disebabkan oleh *K. pneumoniae*.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Dari survei yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUD Dr Saiful Anwar Malang tahun 2002 terhadap 110 sampel sputum, didapatkan profil isolat bakteri terbanyak adalah *Klebsiella pneumoniae* yaitu 20 (18%).
2. Hasil sensitivitas dari *Klebsiella pneumoniae* terhadap beberapa obat didapatkan sensitivitas kuat terhadap Amoxycilline-Clavulanic acide (95 %), Cefotaxim (100 %), Cephalotine (90 %), Gentamycine (100 %), Netilmycine (100 %), Amikacine (100 %), Ciprofloxacin (80 %), Norfloxacin (95 %), Cotrimoxazole (90 %) dan Fosfomycine (95 %).
3. Outer Membrane Protein *Klebsiella pneumoniae* yang diisolasi menggunakan NOG didapatkan protein mayor yang mempunyai berat molekul 40 kDa.
4. Pada immunoblotting (Western Blotting) menunjukkan bahwa antibodi terhadap *K. pneumoniae* spesifik untuk kuman *K. pneumoniae*.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Dzen SM. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. 1994.
2. Priyanti ZS. *Penatalaksanaan Mutakhir Pneumonia Komunitas*. Bagian Pulmonologi FKUI / RSUP Persahabatan. Jakarta; 2002.
3. Sartono dan Sumarno. *Gambaran pola kuman pada pemeriksaan sputum di Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang*. 2002 (Unpublish).
4. Sudigdo S. *Dasar-dasar Metode Penelitian Klinis*. Bagian Ilmu Kesehatan Anak FKUI. Jakarta; 1995.
5. Sumarno. *Karakterisasi Molekul Protein Adesi Vibrio Cholera 01 M094 V dan Protein Reseptornya pada Sel Epitel Usus Halus Tikus Putih (Wistar)*. Studi Patogenesis Vibrio Cholera 01 M094V. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya. 2000.
6. Kiska K, et al. Relationships among Capsular Structure, Phagocytosis, and Mouse Virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*; Mar. 1995; 847-852.
7. Keith, Miller. *Immunocytochemical Techniques. Theory and Practice of Histological Techniques*. 5th edition. Toronto; 2002; 421-458.
8. Dzen SM. *Enterobacteriaceae & Kuman Batang Gram Negatif yang lain*. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. 1993.
9. Sydney M, Finegold MD. *Enterobacteriaceae in Diagnostic Microbiology*. 7th edition. Toronto; 1986; 397-421.
10. Freeman BA. *Textbook of Microbiology* 22th edition. Japan; 1985; 34-35.
11. P Ustian T. *The Gram Negative Cell Wall*. University of Wisconsin Madison 199; 1-3.
12. Brooks GF, Botel JS, Ornston L. *Medical Microbiology*. Connecticut. USA. 19th edition; 1989; 15-16, 19-20.

5. Dari hasil imunositokimia yang menggunakan antibodi dari Anti OMP *K. pneumoniae* terhadap bakteri *K. pneumoniae* yang ada dalam sputum didapatkan beberapa hapusan sputum memberikan imunositokimia positif tetapi kulturnya negatif dan sebaliknya hasil imunositokimia negatif tetapi hasil kultur positif.
6. Dari uji diagnostik untuk mendeteksi bakteri *K. pneumoniae* yang ada dalam sputum dengan imunositokimia didapatkan:
 - Apabila menggunakan cut off positif 1, maka sensitivitas 90%, spesifitas 95%, nilai prediksi positif 81,8% dan nilai prediksi negatif 97,7%.
 - Apabila menggunakan cut off positif 2, maka sensitivitasnya 33,3%, spesifitas 100%, nilai prediksi positif 100%, nilai prediksi negatif 90%.
7. Perlu penelitian lebih lanjut dengan melakukan penyempurnaan terutama dalam melakukan fiksasi, metode pengecatan dan paduan laboratoris dengan kondisi klinis untuk mendapatkan uji diagnostik yang lebih tinggi.