

**UJI AKTIVITAS ANTI BAKTERI, ANTI ADHESI DAN ANTI KOLONISASI DARI
ISOLAT BAKTERI *Lactobacillus helveticus* C2 TERHADAP BAKTERI
Klebsiella pneumoniae MULTI DRUG RESISTANT PADA MENCIT BALB-C**

TESIS

Untuk memenuhi persyaratan memperoleh Gelar Magister



**Oleh:
Iryasti Yudistia
176070100011006**

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KONSENTRASI IMUNOLOGI, PARASITOLOGI & MIKROBIOLOGI**

**PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
2019**

TESIS

**UJI AKTIVITAS ANTI BAKTERI, ANTI ADHESI DAN ANTI KOLONISASI DARI
ISOLAT BAKTERI *Lactobacillus helveticus* C2 TERHADAP BAKTERI
Klebsiella pneumoniae MULTI DRUG RESISTANT PADA MENCIT *BALB-C***

Oleh:
IRYASTI YUDISTIA

Dipertahankan di depan penguji
Pada Tanggal: 11 Desember 2019
Dan dinyatakan memenuhi syarat

Komisi Pembimbing,

Dr.rer.nat. Tri Yudani M. Raras, M.App.Sc.Ph.D.

Ketua

dr. Tri Wahyu Astuti, M.Kes., Sp.P(K)

Anggota

Penguji,

Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK(K)

Penguji 1

Agustina Tri Endharti, S.Si., Ph.D.

Penguji 2

Malang,

**Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran**

Dekan,

Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med., SpA(K)

NIP. 195804141987012001

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT atau Tuhan YME, atas limpahan rahmat dan hidayah-Mu penulis dapat menyelesaikan proposal tesis yang berjudul: Uji Aktivitas Antiadhesi dan Kolonisasi dari Isolat Bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 Terhadap Bakteri *Klebsiella pneumoniae* Multi Drug Resistant pada Mencit *Balb-C*.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, masih dirasakan banyak kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun.

Malang,

Penulis



RINGKASAN

Iryasti Yudistia, NIM. 176070100011006. Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, 18 Juli 2018. Uji Aktivitas Anti Bakteri, Anti Adhesi dan Anti Kolonisasi dari Isolat Bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 Terhadap Bakteri *Klebsiella pneumoniae* Multi Drug Resistant pada Mencit Balb-C. Komisi Pembimbing, Ketua: Tri Yudhani M. Raras, Anggota: Tri Wahyu Astuti. Penguji 1: Sanarto Santoso, Penguji 2: Agustina Tri Endharti.

Klebsiella pneumoniae merupakan penyebab penyakit infeksi berbahaya seperti infeksi saluran kemih (ISK), radang paru-paru, infeksi intra-abdomen dan abses hati piogenik (Vading et al., 2018). Bakteri *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri penghuni mulut orang sehat akan tetapi dalam kondisi imun yang lemah, bisa berimigrasi dan mengkolonisasi saluran pencernaan. Masalah infeksi oleh *Klebsiella pneumoniae* menjadi semakin kompleks dengan ditemukannya *Klebsiella pneumoniae* Multi-Drug Resistance (MDR). Pada dekade terakhir, kejadian resistensi *Klebsiella pneumoniae* terhadap antibiotik semakin sering ditemukan. Resistensi pada bakteri tampaknya berhubungan dengan aktifitas biofilm dari pathogen tersebut. Tebalnya biofilm yang menyelimuti sel menjadi barrier bagi penetrasi antibiotik.

Beberapa studi menemukan bahwa probiotik dapat berperan sebagai agen pencegahan dan terapeutik untuk mengeradikasi bakteri patogen melalui penghambatan adhesi dan kolonisasi sehingga tidak akan tumbuh dan membentuk biofilm. Pada studi sebelumnya, Raras et al. (2019) berhasil mengisolasi *Lactobacillus helveticus* C2 dari kefir susu kambing. *Lactobacillus helveticus* C2 merupakan BAL yang mampu menghambat adhesi dan kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR. *Lactobacillus helveticus* C2 mensintesa biosurfaktan sebagai bahan antiadhesi yang secara kompetitif menghambat perlekatan bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR pada kolonisasi usus halus mencit Balb-C dan akan mempengaruhi proses pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae* MDR.

Selain itu zat aktif bakteriosin yang terkandung dalam supernatan bakteri asam laktat dapat menyebabkan lisis sel dan menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* (Da Silva Sabo, et al., 2014). Asam organik seperti asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat mampu merubah permeabilitas membran luar *Klebsiella pneumoniae* MDR yang tidak dapat dilalui bakteriosin dan antibiotik hidrofobik untuk menghambat viabilitas bakteri tersebut, serta merubah pH lingkungan sehingga mencegah pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* MDR (Alakomi, et al., 2000).

Berdasarkan hal tersebut dilakukan penelitian lanjutan yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas anti bakteri isolat *Lactobacillus helveticus* C2 serta potensi *Lactobacillus helveticus* C2 dalam menghambat adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR secara *in-vitro* dan kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR secara *in-vivo* pada mencit Balb-C.

Uji aktivitas antibakteri pelet *Lactobacillus helveticus* C2 dilakukan dengan metode overlay agar ganda (Aween et al., 2012; Debashis dan Shyamapada et al., 2016) terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR. Inokulasi pelet *Lactobacillus helveticus* C2 dalam sumur (diameter ≈6 mm) pada media MRS agar dan inkubasi anaerob pada suhu 37°C selama 24 jam. Media MRS agar yang mengandung pertumbuhan *Lactobacillus helveticus* C2 dalam sumur kemudian dilapisi dengan media Muller-Hinton agar yang mengandung bakteri

Klebsiella pneumoniae MDR (10^5 cfu/ml). Inkubasi aerob pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi 24 jam, selanjutnya menghitung zona bening yang terbentuk. Tes dilakukan dengan dua kali pengulangan.

Uji aktivitas anti bakteri *Cell free supernatant* (CFS) and *neutralized* (NCFS) *Lactobacillus helveticus* C2 dilakukan dengan uji difusi sumur agar (Davoodabadi et al., 2015; Nikolova et al., 2009). *Klebsiella pneumoniae* MDR dikultur pada media luria bertani broth selama 24 jam. Inokulasi *Klebsiella pneumoniae* MDR (10^5 CFU/mL) pada media Muller-Hinton agar. Sementara isolat *Lactobacillus helveticus* C2 ditanam dalam MRS broth selama 24 jam. CFS *Lactobacillus helveticus* C2 diperoleh dengan melakukan sentrifugasi pada 6.000 rpm selama 10 menit. NCFS *Lactobacillus helveticus* C2 diperoleh dengan mengubah pH CFS menjadi 6,5. Selanjutnya 100 μL CFS maupun NCFS diinokulasi ke dalam sumur luria bertani agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona bening yang terbentuk disekitar masing-masing sumur diukur. Aktivitas antibakteri *Lactobacillus helveticus* C2 dengan zona bening kurang dari 11 mm, 11 hingga 16 mm, 17 hingga 22 mm dan lebih dari 23 mm masing-masing dikelompokkan sebagai negatif (-), ringan (+), kuat (++), dan sangat kuat (+++).

Uji hambatan adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR secara *in vitro* dilakukan dengan dua cara, yang pertama yaitu dengan menyiapkan sel bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 (1×10^8 CFU/ml) yang kemudian di adu dengan sel bakteri *Klebsiella pneumoniae* (1×10^8 CFU/ml) MDR dan diamati adhesinya pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C. Cara kedua yaitu dengan membuat preparasi dosis pili protein *Lactobacillus helveticus* C2 sebanyak 0 μg (kontrol), 25 μg , 50 μg , 100 μg , 200 μg , 400 μg dan 800 μg dalam 300 μl PBS dalam ependorf. Selanjutnya terhadap masing-masing ependorf di tambahkan suspensi enterosit sebanyak 300 μl dengan konsentrasi $10^8/\text{ml}$ dan kemudian ke dalam setiap campuran tersebut ditambah suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR ($10^8/\text{ml}$) sebanyak 300 μl . selanjutnya dihitung indeks adhesi. Indeks adhesi adalah jumlah rerata bakteri yang menempel pada enterosit, dihitung untuk setiap pengamatan terhadap 100 enterosit.

Uji hambatan kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR secara *in-vivo* dilakukan dengan menggunakan mencit Balb-C berusia 6 minggu. mencit Balb-C diinokulasi intragastrik dengan 200 μl suspensi *Klebsiella pneumoniae* MDR ($3,0 \times 10^9$ CFU/ml). Setelah 24 jam selanjutnya mencit Balb-C diberi 200 μl pellet *Lactobacillus helveticus* C2 ($1,9 \times 10^9$ CFU/ml), 200 μl CFS *Lactobacillus helveticus* C2, dan 200 μl PBS atau BHI sebagai kontrol. Kemudian feses mencit Balb-C diambil pada jam yang sama setiap hari selama 5 hari. Untuk mengukur jumlah total *Klebsiella pneumoniae* MDR CFU/g feses. Untuk analisis adhesi mukosa, mencit-mencit Balb-C tersebut di korbakan pada hari ke-6, usus mencit Balb-C diambil untuk menentukan jumlah *Klebsiella pneumoniae* MDR yang melekat pada mukosa. Hasilnya dinyatakan dalam jumlah CFU/g jaringan.

Penelitian ini berhasil membuktikan adanya aktivitas antibakteri *Lactobacillus helveticus* C2 yang kuat terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR baik pada pelet, pelet dengan pH netral, CFS dan NCFS *Lactobacillus helveticus* C2 diamati dari diameter zona bening yang terbentuk. Diameter zona bening yang terbentuk pada perlakuan pemberian antibiotik gentamicin yaitu 44 mm. Pada perlakuan Pelet *Lactobacillus helveticus* C2 dan pelet *Lactobacillus helveticus* C2 dengan pH yang dinetralkan masing-masing membentuk zona bening dengan diameter sebesar 40 mm dan 41 mm. Sementara perlakuan CFS dan NCFS *Lactobacillus helveticus* C2 masing-masing membentuk diameter zona bening 42 dan 44 mm. Seperti yang telah diketahui, *Lactobacillus* mampu memproduksi asam laktat sebagai metabolit primer hasil dari fermentasi

karbohidrat. Asam laktat yang dihasilkan mampu mempengaruhi permeabilitas membran sel bakteri Gram negatif dan memfasilitasi masuknya senyawa-senyawa bakterisidal lainnya sehingga menginduksi kematian bakteri patogen (Atassi dan Servin, 2010).

Penelitian ini juga dilakukan untuk mengobservasi lebih lanjut apakah bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 dan *Klebsiella pneumoniae* MDR dapat melakukan kompetisi penempelan pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C. Akan tetapi karna ukuran *Lactobacillus helveticus* C2 ($0,5-1,2 \times 1-10 \mu\text{m}$) yang jauh lebih besar dari *Klebsiella pneumoniae* MDR ($0,5 \times 1,2 \mu\text{m}$), maka *Klebsiella pneumoniae* MDR masih dengan mudah menempel pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C.

Penemuan yang menarik adalah ketika adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C dapat dihambat dengan menyalut protein pili dan protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2 terlebih dahulu pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C. Protein adhesi bakteri secara umum dikelompokkan menjadi protein adhesi fimbrial/pili atau *Fimbrial Adhesin* (FA) dan protein adhesi OMP atau *Afimbrial Adhesin* (AFA). Kedua protein adhesin ini berperan sebagai faktor virulensi pada proses adhesi dan kolonisasi (Salyers and Whit, 2002). Penyalutan protein pili dan protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2 ini dimaksudkan untuk menjenuhi reseptor yang terlibat pada proses adhesi sehingga dapat menghambat penempelan *Klebsiella pneumoniae* MDR.

Lactobacillus helveticus C2 menunjukkan aktivitas penghambatan adhesi dan kolonisasi yang baik terhadap *Klebsiella pneumoniae* MDR. Efek penghambatan ini ditunjukkan melalui penurunan jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR pada mencit BALB-C yang di induksi pelet dan CFS *Lactobacillus helveticus* C2.

Lactobacillus helveticus C2 memiliki peran perlindungan potensial terhadap patogen melalui mekanisme yang berbeda termasuk produksi senyawa antimikroba, penghambatan adhesi bakteri patogen pada reseptor epitel, stimulasi kekebalan tubuh dan kompetisi dalam mengikat inang (Georgieva *et al.*, 2015; Inglin *et al.*, 2015; Raras *et al.*, 2019). Dua laporan telah menyajikan bukti untuk mekanisme spesifik yang dikembangkan oleh strain *Lactobacillus* probiotik, dimana strain probiotik dapat bersaing melawan patogen bakteri dalam ekologi usus (Deriu *et al.* 2013).

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
RINGKASAN.....	liv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SINGKATAN.....	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Akademis.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
2.1.1 Morfologi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
2.1.2 Klasifikasi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
2.1.3 Patogenesis <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
2.1.4 Resistensi <i>Klebsiella pneumoniae</i> terhadap Antibiotik.....	18
2.2 Biofilm.....	20
2.2.1 Struktur Biofilm.....	21
2.2.2 Mekanisme Pembentukan Biofilm.....	22
2.2.3 Gen-Gen yang Mengkode Biofilm.....	23
2.3 Probiotik.....	25
2.4 <i>Lactobacillus helveticus</i>	27
2.4.1 Aktivitas Antibiofilm Bakteri <i>Lactobacillus helveticus</i>	28
2.4.2 Aktivitas Antimikroba Bakteri <i>Lactobacillus helveticus</i>	30
2.4.3 Aktivitas Imunomodulator Bakteri <i>Lactobacillus helveticus</i>	35

viii

4.5 Alat dan Bahan.....	54
4.5.1 Alat dan Bahan Pembuatan Stok Kultur <i>Lactobacillus helveticus</i> C2.....	54
4.5.2 Alat dan bahan Penyiapan Suspensi <i>Lactobacillus helveticus</i>	55
4.5.3 Alat dan Bahan Reidentifikasi <i>Lactobacillus helveticus</i> C2.....	55
4.5.4 Alat dan Bahan Pembuatan Stok Kultur <i>K. pneumonia</i> MDR.....	55
4.5.5 Alat dan Bahan Penyiapan Suspensi <i>K. pneumonia</i> MDR	55
4.5.6 Alat dan Bahan Reidentifikasi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	55
4.5.7 Alat dan Bahan Uji Anti Bakteri <i>Lactobacillus helveticus</i>	56
4.5.8 Alat dan Bahan Isolasi Pili dan OMP <i>Lactobacillus helveticus</i>	56
4.5.9 Alat dan Bahan Isolasi Enterosit Mencit.....	56
4.5.10 Alat dan Bahan Uji Adhesi <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 pada Enterosit Tikus.....	56
4.5.11 Alat dan Bahan Uji Hambatan Adhesi <i>K. pneumonia</i> MDR pada Enterosit Mencit	56
4.5.12 Alat dan Bahan Pewarnaan Gram	56
4.5.13 Alat dan Bahan Uji Kolonisasi Usus Mencit.....	57
4.5.14 Alat dan Bahan Uji Adhesi Mukosa Usus Mencit.....	57
4.6 Prosedur Penelitian.....	57
4.6.1 Pembuatan Stock Culture <i>Lactobacillus helveticus</i> C2	57
4.6.2 Penyiapan Suspensi <i>Lactobacillus helveticus</i> C2	58
4.6.3 Reidentifikasi <i>Lactobacillus helveticus</i> C2.....	58
4.6.4 Pembuatan Stock Kultur <i>K. pneumonia</i> MDR	58
4.6.5 Penyiapan Suspensi <i>K. pneumonia</i> MDR	59
4.6.6 Reidentifikasi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	59
4.6.7 Uji Aktivitas Anti Bakteri <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 Terhadap Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR.....	59
4.6.8 Metode Isolasi Pili <i>Lactobacillus helveticus</i> C2	60
4.6.9 Isolasi Enterosit Mencit.....	61
4.6.10 Uji Adhesi <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 pada Enterosit Mencit...62	
4.6.11 Uji Hambatan <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 Terhadap Adhesi <i>Klebsiella pneumonia</i> MDR pada Enterosit Mencit.....	62

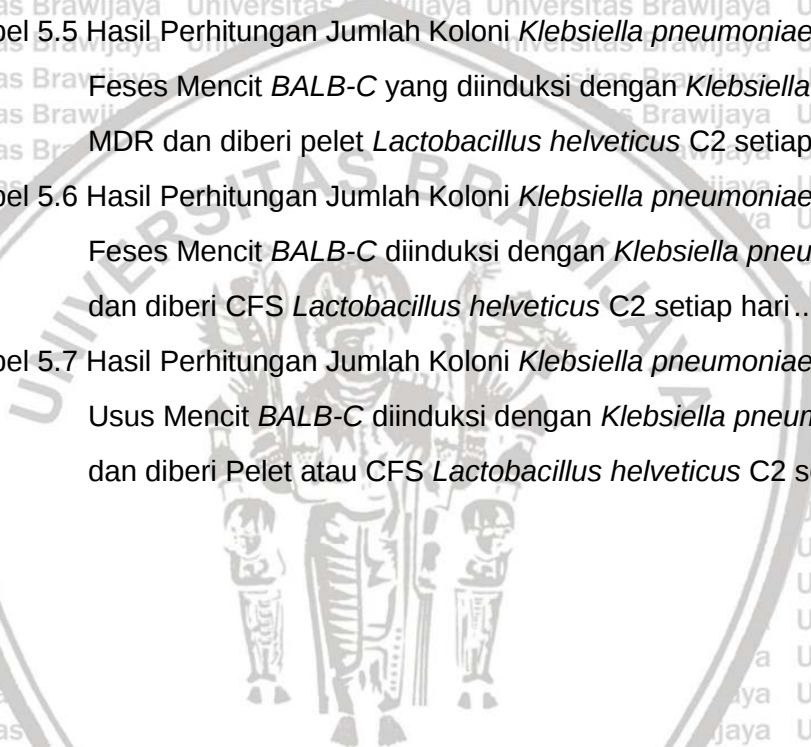
4.6.12 Pewarnaan Gram.....	63
4.6.13 Uji Kolonisasi Usus Mencit.....	63
4.6.14 Uji Adhesi Mukosa Usus Mencit.....	63
4.7 Analisis Statistika.....	64
4.8 Alur Penelitian.....	65
BAB 5 HASIL PENELITIAN.....	66
5.1 Aktivitas Anti Bakteri <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 Terhadap Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR.....	66
5.2 Kompetisi Adhesi Sel <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 dan Sel <i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> MDR pada Enterosit Mencit BALB-C.....	66
5.3 Efek Paparan Protein Pili <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 Terhadap Adhesi Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada Enterosit Mencit Balb-c.....	69
5.4 Efek Paparan Protein OMP <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 Terhadap Adhesi Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada Sel Enterosit Mencit BALB-C.....	73
5.5 Pengaruh Pelet <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 Terhadap Jumlah Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada Mencit BALB-C.....	77
5.6 Pengaruh CFS <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 Terhadap Jumlah Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada Mencit BALB-C.....	80
5.7 Perbandingan Pengaruh Pelet dan CFS <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 Terhadap Jumlah Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada kolon Mencit BALB-C.....	83
BAB 6 PEMBAHASAN.....	86
6.1 Aktivitas Anti Bakteri <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 terhadap Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR.....	86
6.2 Hambatan Adhesi Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> pada Sel Enterosit Usus Halus Mencit BALB-C oleh <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 Secara <i>In</i> <i>vitro</i>	87
6.3 Hambatan Kolonisasi <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR oleh Bakteri <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 Secara <i>In vivo</i>	92

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	95
7.1 Kesimpulan.....	95
7.2 Saran.....	95
DAFTAR PUSTAKA.....	97
LAMPIRAN.....	110



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Kelompok perlakuan uji kolonisasi usus mencit <i>Balb-C</i>	52
Tabel 5.1 Uji Statistik Normalitas Data.....	70
Tabel 5.2 Uji Statistik SPSS Tukey dengan Perlakuan Paparan Berbagai Dosis Protein Pili <i>Lactobacillus helveticus</i> C2.....	71
Tabel 5.3 Uji Statistik Normalitas Data	74
Tabel 5.4 Uji Statistik SPSS Tukey dengan Perlakuan Paparan Berbagai Dosis Protein OMP <i>Lactobacillus helveticus</i> C2.....	75
Tabel 5.5 Hasil Perhitungan Jumlah Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada Feses Mencit <i>BALB-C</i> yang diinduksi dengan <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR dan diberi pelet <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 setiap hari	77
Tabel 5.6 Hasil Perhitungan Jumlah Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada Feses Mencit <i>BALB-C</i> diinduksi dengan <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR dan diberi CFS <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 setiap hari.....	81
Tabel 5.7 Hasil Perhitungan Jumlah Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada Usus Mencit <i>BALB-C</i> diinduksi dengan <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR dan diberi Pelet atau CFS <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 setiap hari....	83



DARTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Pewarnaan Gram <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
Gambar 2.2 Faktor yang Mempengaruhi Patogenesis <i>K. Pneumoniae</i>	10
Gambar 2.3 Penghindaran imun yang diperantarai <i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
Gambar 2.4 Skema Pembentukan Biofilm dan Target Penghambatannya	22
Gambar 2.5 Pewarnaan Gram Bakteri <i>Lactobacillus helveticus</i>	27
Gambar 2.6 Struktur Biosurfaktan	28
Gambar 2.7 Sekresi Berbagai Senyawa Antimikroba oleh Sel <i>Lactobacilli</i>	31
Gambar 2.8 Struktur asam laktat	31
Gambar 2.9 Pengaruh antimikroba dari hidrogen proksida	33
Gambar 2.10 Aktivitas imunomodulator EPS	36
Gambar 2.11 Kerangka Teori	45
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian	48
Gambar 4.1 Alur Penelitian	62
Gambar 5.1 Aktivitas anti bakteri <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 terhadap bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR	65
Gambar 5.2 Hasil pewarnaan gram adhesin <i>Lactobacillus helveticus</i> c2 dan bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada sel enterosit usus halus mencit <i>BALB-C</i>	66
Gambar 5. 3 Hasil pewarnaan gram sel enterosit usus halus mencit <i>BALB-C</i> yang diinduksi berbagai konsentrasi bakteri <i>Lactobacillus helveticus</i> dan diinduksi bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR	67
Gambar 5.4 Hasil pewarnaan gram sel enterosit usus halus mencit <i>BALB-C</i> dengan perlakuan pemberian berbagai konsentrasi protein pili <i>Lactobacillus helveticus</i> C2	68
Gambar 5.5 Diagram indeks adhesi <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada sel enterosit usus halus mencit <i>BALB-C</i> yang dipapar berbagai konsentrasi protein pili <i>Lactobacillus helveticus</i> C2. Batang galat menunjukkan standar deviasi	70
Gambar 5.6 Hasil pewarnaan gram sel enterosit usus halus mencit <i>BALB-C</i> yang diinduksi bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR dengan perlakuan pemberian berbagai konsentrasi protein OMP <i>Lactobacillus helveticus</i> C2	73

Gambar 5.7 Diagram indeks adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C yang dipapar berbagai konsentrasi protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2. 74

Gambar 5.8 Biakan feses mencit BALB-C pada media MacConkey Agar dengan perlakuan peberian pelet *Lactobacillus helveticus* C2..... 77

Gambar 5.9 Biakan feses mencit BALB-C pada media MacConkey Agar dengan perlakuan peberian CFS *Lactobacillus helveticus* C2 80

Gambar 5.10 Biakan kolon mencit BALB-C pada media MacConkey Agar 82



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Indeks adhesi <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C yang dipapar berbagai konsentrasi protein pili <i>Lactobacillus helveticus</i> C2	112
Lampiran 2. Analisis statistik indeks adhesi <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C yang dipapar berbagai konsentrasi protein pili <i>Lactobacillus helveticus</i> C2	113
Lampiran 3. Indeks adhesi <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C yang dipapar berbagai konsentrasi protein OMP <i>Lactobacillus helveticus</i> C2	117
Lampiran 4. Analisis statistik indeks adhesi <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C yang dipapar berbagai konsentrasi protein OMP <i>Lactobacillus helveticus</i> C2	118
Lampiran 5. Hasil Perhitungan Jumlah Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada Feses Mencit BALB-C yang diinduksi dengan <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR dan diberi pelet <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 setiap hari	122
Lampiran 6. Analisis statistik Kolonisasi <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada Feses Mencit BALB-C yang diinduksi dengan <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR dan diberi pelet <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 setiap hari	123
Lampiran 7. Hasil Perhitungan Jumlah Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada Feses Mencit BALB-C yang diinduksi dengan <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR dan diberi CFS <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 setiap hari	125
Lampiran 8. Analisis statistik Kolonisasi <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada Feses Mencit BALB-C yang diinduksi dengan <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR dan diberi CFS <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 setiap hari	126
Lampiran 9. Hasil Perhitungan Jumlah Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada Usus Mencit BALB-C diinduksi dengan <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR dan diberi Pelet atau CFS <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 setiap hari	128
Lampiran 10. Analisis statistik Kolonisasi <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR pada Usus Mencit BALB-C diinduksi dengan <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR dan diberi Pelet atau CFS <i>Lactobacillus helveticus</i> C2 setiap hari	129

DAFTAR SINGKATAN

μl	: Mikro liter
μM	: Mikro molar
Ab	: Antibodi
AFA	: <i>Afimbrial Adhesin</i>
AHL	: <i>Acylated Homoserine Lactone</i>
AI	: <i>Autoinducer</i>
AIP	: <i>Autoinducer Peptides</i>
Anova	: <i>Analysis of Variance</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cells</i>
BAL	: Bakteri Asam Laktat
BHI	: <i>Brain Heart Infusion</i>
BSC	: <i>Biological Safety Cabinet</i>
CAP	: <i>Community-Acquired Pneumoniae</i>
CFS	: <i>Cell Free Supernatan</i>
CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>
Chaps	: <i>(3-[(3 Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1- propanesulfonate hydrate)</i>
CK	: Cytokines
CPS	: <i>Capsul Polisacarida</i>
DC	: <i>Dendritic Cell</i>
DNA	: <i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
ECM	: <i>Extra Cellular Matrix</i>
EDTA	: <i>Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid</i>
EPS	: <i>Extracellular Polymeric Substances</i>
ESBL	: <i>Extended-Spectrum-B-Lactamase</i>
FA	: <i>Fimbrial Adhesin</i>
FIM	: <i>Fimbrial Subunit Type 1 Precursor</i>
GRAS	: <i>Generally Recognized as Safe</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
IFG	: <i>Interferon gamma</i>
Ig	: <i>Imunoglobulin</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
ISK	: <i>Infeksi Saluran Kemih</i>
LAF	: <i>Laminar Airflow</i>

LB	: <i>Luria Bertani</i>
LPS	: <i>Lipopolysaccharide</i>
MAC	: <i>Mast Cells</i>
MDR	: <i>Multiple Drug Resistance</i>
mg	: <i>mili gram</i>
ml	: <i>mili liter</i>
MRS	: <i>deMan Rogose Sharpe</i>
MTT	: <i>3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid</i>
MYE	: <i>Milk Yeast Extract</i>
NCFS	: <i>Neutralized Cell Free Supernatan</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PLA	: <i>Pyogenic liver abscess</i>
PMF	: <i>Proton Motive Force</i>
QQ	: <i>Quorum Quenching</i>
QS	: <i>Quorum Sensing</i>
rRNA	: <i>Ribosomal Ribose Nucleic Acid</i>
RSSA	: <i>Rumah Sakit Syaiful Anwar</i>
RTF	: <i>Resistensi Transfer Factor</i>
TGF	: <i>Transforming Growth Factor</i>
Th	: <i>T helper</i>
TLR	: <i>Toll-Like Receptor</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
Treg	: <i>Regulatory T Cell</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.5. Latar Belakang

Klebsiella pneumoniae merupakan flora normal di saluran cerna pada individu sehat tanpa menimbulkan penyakit (Rawat dan Deepthi, 2010). Namun pada kondisi patologis tertentu dapat berpindah dan menginfeksi berbagai organ lainnya. *Klebsiella pneumoniae* dapat menimbulkan beragam macam penyakit yang cukup berat seperti infeksi saluran kemih, pneumonia, infeksi intra-abdomen, infeksi aliran darah, meningitis dan abses hati piogenik (Magill et al., 2014; Martin dan Michael, 2018; Vading et al., 2018)

Beberapa jenis infeksi *Klebsiella pneumoniae* dapat diobati dengan antibiotik. Akan tetapi, masalah infeksi oleh *Klebsiella pneumoniae* menjadi semakin kompleks dengan ditemukannya *Klebsiella pneumoniae* yang telah resisten terhadap berbagai antibiotik, diantaranya ampicillin, sulbactam, cefazolin, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam, ciprofloxacin dan trimethoprim (Raras et al., 2019). Martin dan Michael (2018) juga melaporkan bahwa *Klebsiella pneumoniae* juga telah resisten terhadap antibiotik Carbapenem yang dikenal dengan Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Klebsiella pneumoniae* dapat menghasilkan enzim ESBL (Extended Spektrum β -Lactamase) sehingga dapat menghidrolisis cincin β -laktam yang terdapat pada antibiotik β -laktam dan menyebabkan resistensi terhadap antibiotik tersebut (Martin dan Michael, 2018).

Selain produksi enzim-enzim penghambat kerja antibiotik, yang menjadi faktor virulensi *Klebsiella pneumoniae* lainnya adalah kemampuannya mensintesis molekul adhesi (molekul yang dapat membantu proses penempelan agen infeksi ke sel inang) dan pili (fimbriae) tipe 1 dan pili tipe 3. Pili tipe 1 adalah heteropolymeric mannose yang dihasilkan oleh semua anggota keluarga

Enterobacteriaceae yang memediasi melekatnya bakteri terhadap berbagai jenis sel epitel, salah satu contohnya adalah epitel kandung kemih. Pili tipe 3 memiliki protein adhesin yang memainkan peran utama dalam virulensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan cara melekat pada sel inang, seperti pada urogenital, pernapasan, saluran usus dan pada saluran urin (Liang, 2016; Yu et al., 2011). Dengan cara ini pili tipe 3 dapat memfasilitasi kolonisasi bakteri, proliferasi pada permukaan mukosa sel inang, dan mengakibatkan infeksi. Pili tipe 3 juga digunakan untuk pembentukan biofilm oleh bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada plastik dan matriks ekstraselular manusia. Pertumbuhan biofilm dapat di temukan pada perangkat plastik dalam tubuh seperti kateter intravena dan kateter urin. Diketahui sebanyak 95% infeksi saluran kemih disebabkan oleh penggunaan kateter urin yang terkontaminasi (Liang, 2016). Hal ini menjadi permasalahan di dunia medis karena dapat menyebabkan kejadian resistensi *Klebsiella pneumoniae* terhadap beberapa antibiotik yang di kenal dengan *Klebsiella pneumoniae* MDR yang kemudian memicu infeksi kronis serta kegagalan terapi.

Pada dekade terakhir ini, kejadian *Klebsiella pneumoniae* MDR semakin banyak ditemukan. Hal ini mendorong para ilmuwan untuk menemukan strategi alternatif yang berasal dari alam. Salah satunya yaitu menggunakan probiotik sebagai agen pencegahan dan terapeutik untuk membangun kembali homeostasis mikroba dan menghilangkan potensi patogen melalui penghambatan pembentukan biofilm (Pamer, 2016). *Lactobacillus helveticus* merupakan salah satu bakteri tersebut. Bakteri *Lactobacillus helveticus* memperlihatkan aktivitas antibiofilm melalui produksi senyawa biosurfaktan yang bekerja menghambat proses perlekatan bakteri patogen, sehingga meningkatkan efektivitas antibiotik.

Senyawa tersebut juga ditemukan dalam supernatan *Lactobacillus* spp, seperti *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus pentosus* yang dapat menunjukkan aktivitas antibiofilm terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*

dan *Salmonella enterica* (Khiralla et al., 2015). Dilaporkan bahwa *Lactobacillus helveticus* MRTL91 mampu memproduksi biosurfaktan yang menghambat pertumbuhan sejumlah bakteri patogen seperti: *Lactobacillus monocytogenes*, *Lactobacillus innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, dan *Salmonella flexneri* (Sharma dan Saharan, 2016). Secara *in vitro* telah diteliti bahwa sifat hidrofobisitas lapisan biosurfaktan yang diproduksi oleh *Lactobacillus helveticus* strain KS300 berhasil menghalangi perlekatan sejumlah bakteri patogen yang bertanggung jawab pada vaginosis pada kultur sel HeLa sehingga menghambat pembentukan biofilm bakteri patogen (Atassi et al., 2006). Selain melalui produksi biosurfaktan, penelitian terbaru menunjukkan kemampuan bakteri *Lactobacillus* dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri patogen melalui *downregulation* gen-gen penyandi protein adhesi (Bandeira et al., 2017; Liang, 2016).

Beberapa studi menunjukkan besarnya potensi bakteri asam laktat beserta senyawa yang dihasilkannya apabila dikembangkan menjadi agen antimikroba alami khususnya dalam mengatasi permasalahan resistensi antibiotik terhadap infeksi *Klebsiella pneumoniae* (Alexandre et al., 2014; Matsubara et al., 2016; Sikorska dan Smoragiewicz, 2013; Vuotto et al., 2014; Wu et al., 2011). Pada studi sebelumnya, Raras et al. (2019) telah mengisolasi *Lactobacillus helveticus* C2 dari kefir susu kambing yang terbukti memiliki kemampuan terbaik dalam menurunkan viabilitas *Klebsiella pneumoniae* MDR, menghambat pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae* MDR serta mampu bertahan pada keadaan asam lambung. Berdasarkan hal tersebut akan dilakukan penelitian lanjutan yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas anti bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 terhadap *Klebsiella pneumoniae* MDR serta potensi *Lactobacillus helveticus* C2 dalam menghambat adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR secara *in-vitro* dan kolonisasi *K. pneumoniae* MDR secara *in-vivo* pada mencit *Balb-C*.

1.6. Rumusan Masalah

Apakah isolat *Lactobacillus helveticus* C2 dapat menghambat pertumbuhan, adhesi dan kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada usus mencit *Balb-C*?

1. Apakah aktivitas anti bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 mampu menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* MDR?

2. Apakah *Lactobacillus helveticus* C2 mampu menghambat adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada usus mencit *Balb-C*?

3. Apakah *Lactobacillus helveticus* C2 mampu menghambat kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada usus mencit *Balb-C*?

1.7. Tujuan Penelitian

1.7.1. Tujuan Umum

Membuktikan bahwa isolat *Lactobacillus helveticus* C2 dapat menghambat pertumbuhan, adhesi dan kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada usus mencit *Balb-C*.

1.7.2. Tujuan Khusus

1. Menganalisis aktivitas anti bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 dalam menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* MDR.

2. Membuktikan kemampuan *Lactobacillus helveticus* C2 dalam menghambat adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR melalui mekanisme antiadhesi.

3. Membuktikan kemampuan *Lactobacillus helveticus* C2 dalam menghambat kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada usus mencit *Balb-C*.

1.8. Manfaat Penelitian

1.8.1. Manfaat Akademis

Manfaat akademis penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mendapatkan bukti ilmiah dan pengetahuan baru mengenai aktivitas anti bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 dalam menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* MDR.
2. Untuk mendapatkan bukti ilmiah dan pengetahuan baru mengenai potensi *Lactobacillus helveticus* C2 dalam menghambat adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR melalui mekanisme antiadhesi.
3. Untuk mendapatkan bukti ilmiah dan pengetahuan baru mengenai potensi *Lactobacillus helveticus* C2 dalam menghambat kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada usus mencit *Balb-C*.
4. Sebagai dasar untuk melakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensi antiadhesi dan kolonisasi yang dihasilkan oleh *Lactobacillus helveticus* C2.

1.4.2 Manfaat Praktis

Diharapkan agar penelitian ini dapat menjadi dasar akademis pengembangan *Lactobacillus helveticus* C2 sebagai komplement pengobatan infeksi, khususnya infeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

2.1.1 Morfologi *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang, berukuran 0,5 x 1,2 µm dan non motil (Gambar 2.1A). Bakteri ini memiliki kapsul, tetapi tidak membentuk spora. Berdasarkan kebutuhannya akan oksigen *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri fakultatif anaerob. *Klebsiella pneumoniae* menunjukkan pertumbuhan mukoid (Gambar 2.1B), kapsul polisakarida yang besar dan dapat memfermentasikan karbohidrat membentuk asam dan gas dan biasanya memberikan hasil positif untuk tes dekarboksilase lisin dan sitrat (Anderson et al., 2007; Clegg dan Murphy, 2016). Morfologi khas dari *Klebsiella* dapat dilihat dalam pertumbuhan padat in vitro tetapi morfologinya sangat bervariasi dalam bahan klinik (Podscun dan ullmann, 1998).



Gambar 2.1 Bakteri *Klebsiella pneumoniae*

Keterangan:

Identifikasi bakteri *Klebsiella pneumoniae*. (A) Pengecatan gram dilihat dengan mikroskop perbesaran 1000 X yang menunjukkan bakteri berwarna merah dan berbentuk batang pendek; (B) Lingkaran menunjukkan koloni mukoid pada kultur pada media MacConkey Agar (Dita, et al., 2019)

2.1.2 Klasifikasi *Klebsiella pneumoniae*

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Order	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Klebsiella</i>
Spesies	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Podschun dan Ullmann, 1998)

2.1.3 Patogenesis *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri gram negatif dengan karakteristik berbentuk batang, non-motil, terbungkus kapsul dan merupakan keluarga Enterobacteriaceae (Vuotto, et al., 2017). *Klebsiella pneumoniae* banyak ditemukan pada mulut, kulit dan pencernaan manusia, serta pada lingkungan rumah sakit dan alat-alat kesehatan. Bakteri tersebut dapat menyerang individu dengan sistem imun lemah, dimana patogen tersebut umumnya ditemukan sebagai flora normal di kulit dan saluran cerna pada individu sehat tanpa menimbulkan penyakit (Rawat dan Deepthi, 2010). Namun pada kondisi patologis tertentu dapat berpindah dan menginfeksi berbagai organ lainnya. *Klebsiella pneumoniae* dilaporkan menjadi penyebab utama sejumlah penyakit infeksi baik yang diperoleh pasien dari lingkungan sekitar tempat tinggalnya (*community-acquired pneumoniae*) maupun yang didapat pasien ketika dirawat di rumah sakit (*nosocomial/hospital-acquired pneumoniae*) (Clegg dan Murphy, 2016). *Klebsiella pneumoniae* dapat menimbulkan beragam macam penyakit yang cukup berat seperti pneumoniae, *Pyogenic liver abscess* (PLA), infeksi saluran kemih (ISK), dan infeksi aliran darah (Magill et al., 2014; Martin dan Michael, 2018; Vading et al., 2018).

Infeksi *Klebsiella pneumoniae* diketahui menyebabkan timbulnya kasus CAP. CAP merupakan salah satu penyakit dengan tingkat mortalitas yang tinggi khususnya di negara-negara kawasan Asia Tenggara, termasuk salah satunya adalah di Indonesia (Gray dan Zar, 2010). Sepanjang tahun 2007 sampai dengan 2011 angka kematian yang disebabkan oleh CAP di Semarang mencapai 30% (Farida *et al.*, 2015). Pada CAP, infeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae* dapat mengakibatkan timbulnya PLA yang tanpa didasari oleh penyakit hepatobilier terlebih dahulu. PLA adalah salah satu penyakit yang disebabkan oleh kemampuan translokasi *Klebsiella pneumoniae* dari saluran pencernaan menuju hati dengan menembus intestinal barrier (Fung *et al.*, 2012). Oleh karena itu tingkat mortalitas kaitannya dengan kasus ini adalah cukup tinggi khususnya di kawasan Asia dan Asia Tenggara (Paterson *et al.*, 2004; Melot *et al.*, 2015). Selain melalui CAP, kasus infeksi *Klebsiella pneumoniae* juga ditemui secara nosokomial dan tersebar di sejumlah rumah sakit di seluruh dunia (Onori *et al.*, 2015).

Infeksi *Klebsiella pneumoniae* diketahui pula dapat menyebabkan ISK. Infeksi saluran kemih adalah infeksi akibat berkembangbiaknya mikroorganisme di dalam saluran kemih, yang dalam keadaan normal urine tidak mengandung bakteri, virus atau mikroorganisme lain. ISK mencakup spektrum klinis mulai dari infeksi asimtomatik sampai pielonefritis akut dengan sepsis. Sekitar 7 juta kasus sistitis akut dan 250.000 kasus pielonefritis akut terjadi setiap tahun di Amerika Serikat, sehingga mengakibatkan lebih dari 100.000 masuk rumah sakit (Fish, 2009). ISK merupakan penyebab pertama infeksi nosokomial rumah sakit, yaitu sebesar 40%, diikuti dengan pneumonia nosokomial. Sekitar 80-90% ISK nosokomial terjadi berhubungan dengan pemasangan kateter. *Klebsiella pneumoniae* dapat mencapai saluran kemih oleh hematogen atau penyebaran limfatik, tetapi ada beberapa bukti klinis dan eksperimental yang menunjukkan

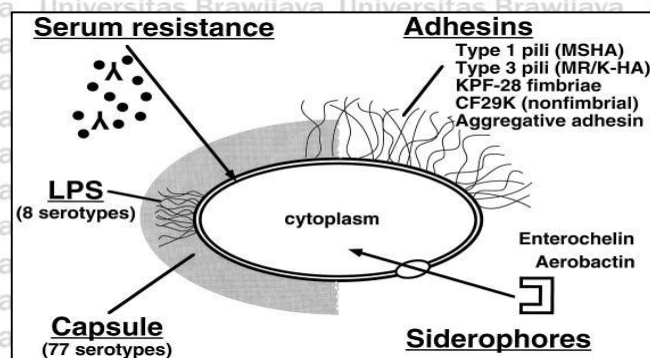
bahwa *Klebsiella pneumoniae* naik melalui uretra dan disebut sebagai jalur yang paling umum penyebab ISK.

Pemeriksaan klinis mengindikasikan bahwa infeksi *Klebsiella pneumoniae* termasuk yang memproduksi karbapenemase maupun ESBL berasal dari saluran pencernaan (Gorrie *et al.*, 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Hsu, *et al.*,(2015) memberikan bukti mekanisme translokasi koloni *Klebsiella pneumoniae* dari saluran pencernaan yang mampu menembus *barrier* menuju lokasi lain dan menyebabkan infeksi. Kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* yang virulen pada saluran pencernaan berkaitan erat dengan terjadinya PLA (Fung *et al.*, 2012).

Infeksi nosokomial yang disebabkan oleh *Klebsiella pneumoniae* umumnya berkelanjutan disebabkan oleh dua faktor : biofilm *Klebsiella pneumoniae* yang terbentuk melindungi bakteri tersebut dari sistem imun inang dan antibiotik (Jagnow dan Clegg, 2003) dan sifat resistensi terhadap berbagai macam obat dikarenakan adanya ESB atau karbapenemase pada isolat bakteri dari infeksi nosokomial (Paterson, *et al.*, 2004)

Terdapat dua antigen pada *Klebsiella pneumoniae* yaitu antigen K dan O untuk meningkatkan patogenitas klebsiella itu sendiri. Antigen O adalah bagian terluar dari LPS, sedangkan antigen K adalah polisakarida pada kapsul bakteri. Lebih dari 70 jenis antigen K telah ditemukan pada *Klebsiella pneumoniae*, beberapa diantaranya memiliki fenotip hipervirulent dikarenakan peningkatan produksi kapsul polisakarida (Shon dan Russo, 2014). Jenis hipervirulent tersebut sangat bersifat invasif dan dapat menyerang individu dengan sistem imun normal, serta menyebabkan infeksi seperti PLA, meningitis, fasciitis, endophtalmitis dan pneumonia. Komplikasi infeksi yang bersifat metastatik yang disebabkan PLA banyak ditemukan pada infeksi serotip K1/K2 (Siu, *et al.*, 2012).

Terdapat lima faktor utama yang mempengaruhi patogenesis dari *Klebsiella pneumoniae* (Gambar 2.2) (Podschun dan Ullmann, 1998).



Gambar 2. 2. Faktor yang Mempengaruhi Patogenesis *Klebsiella pneumoniae*. (a) kapsuler antigen; (b) LPS dan serum resisten; (c) adhesin; dan (d) siderophores.

a. Kapsuler antigen (kapsul polisakarida)

Klebsiella pneumoniae memiliki kemampuan untuk mengembangkan kapsul bakteri menonjol yang terdiri dari asam polisakarida yang kompleks. Setiap subunit kapsuler memiliki empat sampai enam gula dan juga asam uronic (sebagai komponen yang bermuatan negatif) yang dapat diklasifikasikan ke dalam 77 jenis serologi. Bagian kapsul pada *Klebsiella pneumoniae* merupakan bagian yang sangat penting untuk melakukan virulensi. Kapsul bakteri *Klebsiella pneumoniae* memiliki struktur fibrillari yang tebal yang dapat menutupi permukaan bakteri. Hal inilah yang melindungi bakteri *Klebsiella pneumoniae* dari fagositosis oleh granulosit polimorfonuklear dan mencegah pembunuhan bakteri oleh faktor serum bakterisidal (Podschun dan Ullmann, 1998).

Lokus gen kapsul polisakarida

Kapsul polisakarida *Klebsiella pneumoniae* adalah polisakarida asam yang umumnya terdiri dari unit berulang dari tiga hingga enam gula. Kelompok gen kapsul polisakarida terdiri dari gen yang berperan dalam sintesis nukleotida dan sintesis kapsul. Panjang gugus gen kapsul polisakarida *Klebsiella pneumoniae* berkisar antara 21 hingga 30 kb, menampung 16–25 gen. Wilayah terminal 5' dari

semua kelompok gen kapsul polisakarida *Klebsiella pneumoniae* diketahui mengandung enam gen yang dikonservasi (dalam urutan berikut: *galF*, *orf2*, *wzi*, *wza*, *wzb* dan *wzc*) dan wilayah ujung 3' berisi gen *gnd* dan sebagian besar diakhiri pada gen *ugd*, sedangkan daerah pusat menyandikan protein untuk polimerisasi dan perakitan subunit kapsul polisakarida (Li *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2013).

Sintesis kapsul polisakarida & magA

Sintesis kapsul polisakarida dimulai dengan perakitan unit pengulangan gula yang dikatalisis oleh glikosiltransferase yang berbeda secara berurutan. Hasil pengulangan ditransfer melintasi membran bagian dalam oleh flippase *Wzx* dan menjalani polimerisasi oleh polimer *Wzy* dalam ruang periplasmik. Kontrol polimerisasi lebih lanjut dan ekspor kapsul polisakarida matang ke permukaan sel bakteri terjadi di bawah aksi gabungan *Wza* (membrane dalam tirosin autokinase), *Wzb* (protein tirosin fosfatase) dan *Wzc* (lipoprotein membran luar) (Li *et al.*, 2014).

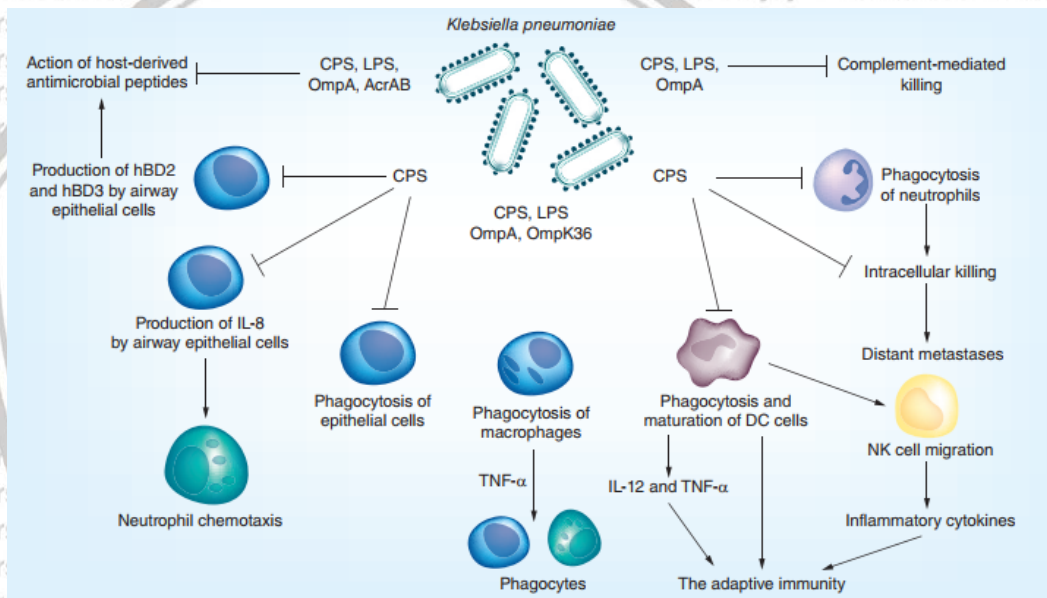
Gen *magA* (*wzyKpK1*) mengkodekan *Wzy* polimerase spesifik pada kapsular K1, tetapi tidak berperan dalam sintesis LPS dan bertindak sebagai penentu virulensi penting dalam infeksi metastasis yang diinduksi oleh *Klebsiella pneumoniae* K1 (Hunt *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014).

rmpA / *rmpA2*

Plasmid *rmpA* dan isoform *rmpA2* mengkodekan aktivator transkripsi gen transkripsi kapsul polisakarida, sintesis kapsul polisakarida, dan hipermucovisitas pada *Klebsiella pneumoniae* K1/K2. Pada strain K2 CG43, baik *rmpA* maupun *rmpA2* berperan sebagai aktivator biosintesis kapsul polisakarida dan berperan penting terhadap virulensi pada tikus (Hsu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014).

Resistensi terhadap fagositosis

Kehadiran kapsul tebal di permukaan sel melindungi *Klebsiella pneumoniae* dari opsonisasi dan fagositosis oleh makrofag, neutrofil, sel epitel dan DC, dengan menghalangi pengikatan dan internalisasi (Gambar 2.3). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* K1 menunjukkan tingkat interaksi yang lebih rendah secara signifikan dengan makrofag dibandingkan dengan galur non-virulen, selain itu, piruvasi asam glukuronat yang luas dan asetilasi C2-OH (atau C3-OH) pada kapsul polisakarida K1 dapat membantu *Klebsiella pneumoniae* untuk



Gambar 2.3. Penghindaran imun yang diperantarai *Klebsiella pneumoniae*. *Klebsiella pneumoniae* memiliki berbagai struktur permukaan (misalnya, CPS, LPS, OmpA, OmpK36, dan AcrAB) yang berperan untuk menghindari pertahanan kekebalan tubuh inang, memungkinkan bakteri untuk melawan *complement-mediated killing*, aksi peptida antimikroba yang diturunkan inang dan fagositosis sel epitel, makrofag, neutrofil, dan DC. Hal ini memungkinkan *Klebsiella pneumoniae* untuk lepas dari pembunuhan intraseluler yang dimediasi neutrofil dari bakteri yang tertelan, merusak produksi sitokin IL-8 proinflamasi dan peptida antimikroba *hBD2* dan *hBD3* oleh sel-sel epitel saluran napas dan untuk menghambat maturasi DC. CPS: Kapsul polisakarida; DC: Sel dendritik; LPS: Lipopolysaccharide; NK: Natural killer (Li *et al.*, 2014).

menghindari fagositosis. Selanjutnya, hipervirulen K1 *Klebsiella pneumoniae*, setelah difagositosis oleh neutrofil, dapat dengan mudah melepaskan diri dari pembunuhan intraseluler yang dimediasi-neutrofil dan mengangkut bakteri K1 ke lokasi yang jauh, seperti hati sehingga menyebabkan pembentukan abses (Gambar 2.3) (Li et al., 2014).

Penekanan respon inflamasi dini

Sel-sel epitel saluran napas menghasilkan reseptor seperti TLRs untuk mengenali molekul-molekul yang diekspresikan oleh patogen, yang pada gilirannya mengaktifkan jalur pensinyalan untuk memproduksi molekul antimikroba, seperti β -defensin manusia (hBDs) dan molekul costimulatori untuk melepaskan sitokin dan kemokin (Gambar 2.3). Secara mekanis, efek antiinflamasi kapsul polisakarida ditandai oleh penghambatan ekspresi IL-8 melalui penghambatan pensinyalan TLR2 dan TLR4 melalui jalur NOD1 (Li et al., 2014; Reguero et al., 2011).

Perlawanan terhadap peptida antimikroba

Kapsul polisakarida pada permukaan sel *Klebsiella pneumoniae* bertindak sebagai perisai pelindung terhadap akses peptida antimikroba yang diturunkan inang, dan kapsul polisakarida yang dilepaskan dari sel bakteri dapat menjebak polipeptida antimikroba untuk mengurangi jumlah polipeptida antimikroba yang mencapai permukaan bakteri (Gambar 2.3). Selain itu, konsentrasi peptida antimikroba di saluran napas menginduksi ekspresi gen *cps*, yang berperan melindungi bakteri terhadap aksi polipeptida antimikroba. *liiBD* yang diproduksi oleh sel-sel epitel saluran napas merupakan peptida antimikroba yang kuat; *hBD1* diekspresikan secara konstitutif, sedangkan ekspresi *hBD2* dan *hBD3* diinduksi oleh patogen dan sitokin proinflamasi matory. Kapsul polisakarida *Klebsiella pneumoniae* mengurangi ekspresi *hBD2* dan *hBD3* melalui pencegahan respons

yang bergantung pada TLR dan merangsang ekspresi CYLD dan MKP-1, yang bertindak sebagai regulator negatif ekspresi *hBD* (Gambar 2.3) (Li *et al.*, 2014).

Penghambatan pematangan sel dendritik

Kapsul polisakarida *Klebsiella pneumoniae* dapat merusak maturasi DC (Gambar 2.3) dan dengan demikian mengurangi produksi sitokin pro-Th1 yang dimediasi DC, seperti IL-12 dan TNF- α , yang akan mengarah pada fungsi destruktif DC imatur selama presentasi antigen *Klebsiella pneumoniae* (dengan demikian mengganggu aktivasi sel-T), dan terlebih lagi menghasilkan pengurangan migrasi sel pembunuh alami yang dimediasi DC. Secara bersamaan, penghambatan pematangan DC oleh kapsul polisakarida *Klebsiella pneumoniae* memungkinkan bakteri untuk menghindari pertahanan inang (Li *et al.*, 2014).

b. Lipopolisakarida dan resistensi serum

Pertahanan tubuh sel inang dalam melawan serangan mikroorganisme yang masuk ke dalam tubuh selain melalui fagositosis adalah dengan efek bakterisidal serum. Aktivitas bakterisidal serum dimediasi oleh protein komplemen. Namun, dalam menghadapi pertahanan tubuh sel inang tersebut, mikroorganisme patogen seperti *Klebsiella pneumoniae* telah mengembangkan strategi untuk melawan efek dari serum bakterisidal. Hampir semua bakteri gram negative sensitive terhadap efek bakterisidal dari serum manusia, namun tidak pada strain patogen yang menunjukkan sifat resistensi terhadap serum dan aktivitas perlawanan serum juga berakibat menimbulkan reaksi infeksi dan gejala menjadi semakin parah. Sifat resistensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* terhadap efek bakterisidal serum diberikan oleh rantai O lipopolysaccharide. Peran utama dari serum bakterisida adalah untuk mencegah mikroorganisme patogen menyerang dan bertahan dalam darah, selain itu kerentanan bakteri terhadap serum juga

menentukan lamanya waktu yang dibutuhkan oleh bakteri untuk melakukan infeksi (Liang, 2016; Podschun dan Ullmann, 1998).

Liopolisakarida terdiri dari tiga bagian: lipid A yang hidrofobik yang terletak di membran luar; antigen-O yang sangat bervariasi sebagai komponen terluar dari LPS; dan inti polisakarida yang menghubungkan lipid A dan antigen-O (Li et al., 2014).

Antigen-O

Setidaknya ada sembilan kelompok antigen O (O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 dan O12) telah dikenali pada *Klebsiella pneumoniae*. Biosintesis antigen O di mediasi oleh enzim yang dikodekan oleh enam kelompok gen *wb* yang terdiri dari *wzm*, *wzt*, *wbbM*, *glf*, *wbbN* dan *wbbO* sehubungan dengan arah transkripsi. Kelompok gen *wb* menunjukkan variasi genetik yang tinggi dalam urutan pengkodean yang sesuai, yang menyumbang variabilitas kimia yang tinggi pada kelompok antigen O yang berbeda. O1 adalah serotipe yang paling umum di antara isolat klinis *Klebsiella pneumoniae*, dan juga lebih banyak ditemukan pada strain *hypermucoviscous* (invasif) dari pada strain *nontissueinvasive*. Antigen O *Klebsiella pneumoniae* mencegah akses komponen komplemen ke aktivator (mis., Porins dan LPS kasar) dan dengan demikian berkontribusi terhadap resistensi bakteri terhadap pembunuhan yang dimediasi komplemen (Gambar 2.3), dan ada frekuensi resistensi serum yang lebih tinggi di antara serotipe isolat O1 dari pada serotipe isolat non-O1 (Li et al., 2014).

Inti polisakarida

Hanya dua jenis inti polisakarida yang dikarakterisasi pada *Klebsiella pneumoniae* yaitu tipe 1 dan tipe 2 yang disintesis oleh 2 produk berbeda dari 13 kelompok gen *wa*. Kelompok gen *wa* dari inti polisakarida tipe 2 yaitu *hldD*, *waaF*, *waaC*, *wabK*, *waaL*, *wabM*, *waaQ*, *wabG*, *wabH*, *orf10*, *waaA*, *waaE* dan *coaD*. Sementara itu, inti polisakarida tipe 1 hanya terdiri dari dua kelompok gen *wa* yang

berbeda yaitu *wabI* dan *wabJ* yang mengkode 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) transferase dan heptosyltransferase, yang bertanggung jawab untuk penggabungan dua residu inti luar terakhir (Li et al., 2014).

Lipid A

Lipid A disintesis dalam sitoplasma oleh satu set enzim konstitutif, diangkut oleh transporter ABC MsbA dan akhirnya berlabuh di membran luar. Modifikasi kovalen lipid A dikatalisis oleh berbagai enzim modifikasi terhadap rangsangan lingkungan, yang terlibat dalam modulasi virulensi sejumlah patogen Enterobacteriaceae. Modifikasi lipid *Klebsiella pneumoniae* berperan sebagai sistem resistensi pada pertahanan bawaan, terutama resistensi terhadap peptida anti-bakteri (Gambar 2.3), dan mutasi modifikasi gen untuk enzim ini mengarah pada pelemahan virulensi *Klebsiella pneumoniae* ketika diuji dalam model hewan yang berbeda. Lipid A dan inti polisakarida diperlukan untuk resistensi terhadap fagositosis oleh makrofag alveolar tikus (Gambar 2.3), yang memainkan peran penting dalam pertahanan inang terhadap *Klebsiella pneumoniae* (Li et al., 2014).

c. Adhesin

Faktor adhesin berkaitan dengan pili atau fimbriae yang terdapat pada bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Salah satu tahap utama dalam proses menginfeksi adalah mikroorganisme patogen harus dapat mendekat dan melekat pada permukaan mukosa dari sel inang. Sifat perekat pada bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada umumnya dimediasi oleh beberapa jenis pili. Pada *Klebsiella pneumoniae* terdapat dua pili yang memiliki morfologi dan fungsional yang berbeda yaitu pili tipe 1 dan pili tipe 3 (Podschun dan Ullmann, 1998).

Pili tipe 1 adalah serat heteropolymeric mannose yang dihasilkan oleh semua anggota keluarga Enterobacteriaceae yang memediasi melekatnya bakteri terhadap berbagai jenis sel epitel, salah satu contohnya adalah epitel kandung

kemih. Pili Tipe 1 dikodekan oleh fimABCDEFGHIK, dengan fimA menjadi subunit struktural utama sementara fimH mengkodekan subunit perekat. FimH telah terbukti memediasi adhesi pada struktur yang mengandung manosa yang ada pada permukaan jaringan host dan matriks ekstraseluler (Klemm et al., 1990; Krogfelt et al., 1990). Penelitian Struve et al. (2008) membuktikan bahwa pili tipe 1 berperan penting pada kemampuan *Klebsiella pneumoniae* untuk menyebabkan infeksi saluran kemih.

Pili Tipe 3 dikode oleh *mrk operon family*. Pili tipe 3 memiliki protein adhesin yang memainkan peran utama dalam virulensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan cara melekat pada sel inang, seperti pada urogenital, pernapasan, dan pada saluran usus. Hal ini, dapat mengakibatkan kolonisasi bakteri, proliferasi pada permukaan mukosa sel inang, dan mengakibatkan infeksi. Pili tipe 3 juga digunakan untuk pembentukan biofilm oleh bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada plastik dan matriks ekstraseluler manusia, pembentukan ini di mediasi keberadaan perangkat plastic dalam tubuh seperti kateter intravena dan kateter urin (Bandeira et al., 2017; Liang, 2016; Yu et al., 2011).

d. Siderophores

Siderophores merupakan mekanisme yang dilakukan oleh bakteri *Klebsiella pneumoniae* untuk meningkatkan penyerapan zat besi, dikarenakan kelangkaan zat besi di dalam lingkungan mikro. Sintesis chelators besi (siderophores) yang paling sering dilakukan adalah enterobactin (yang juga disebut enterochelin) dan aerobactin (Liang, 2016).

2.1.4 Resistensi *Klebsiella pneumoniae* terhadap Antibiotik

Penggunaan bermacam-macam antibiotika yang tersedia telah mengakibatkan munculnya banyak jenis bakteri yang resisten terhadap lebih dari satu jenis antibiotika (*Multiple Drug Resistance*). Resistensi bakteri adalah suatu keadaan dimana kehidupan bakteri itu sama sekali tidak terganggu oleh kehadiran antibiotika. Sifat ini merupakan suatu mekanisme pertahanan tubuh dari suatu makhluk hidup. Penggunaan antibiotika secara berlebihan dan tidak selektif akan meningkatkan kemampuan bakteri untuk bertahan (Stitzel and Craig, 2005).

Menurut Peleg and Hooper (2010) terdapat beberapa mekanisme resistensi antibiotika dari bakteri gram negatif yang digunakan sebagai perlawanan terhadap antibiotika. Mekanisme-mekanisme tersebut adalah: resistensi melalui penutupan celah atau pori (loss of porins) pada dinding sel bakteri, sehingga menurunkan jumlah obat yang melintasi membran sel; peningkatan produksi betalaktamase dalam periplasmik, sehingga merusak struktur betalaktam; peningkatan aktivitas pompa keluaran (efflux pump) pada transmembran, sehingga bakteri akan membawa obat keluar sebelum memberikan efek; modifikasi enzim-enzim, sehingga antibiotika tidak dapat berinteraksi dengan tempat target; mutasi tempat target, sehingga menghambat bergabungnya antibiotika dengan tempat aksi; modifikasi atau mutasi ribosomal, sehingga mencegah bergabungnya antibiotika yang menghambat sintesis protein bakteri; mekanisme langsung terhadap metabolik (metabolic bypass mechanism), yang merupakan enzim alternatif untuk melintasi efek penghambatan antibiotika dan mutasi dalam lipopolisakarida, yang biasanya terjadi pada antibiotika polimiksin, sehingga tidak dapat berikatan dengan targetnya.

Resistensi bakteri terhadap golongan antibiotik ditentukan oleh elemen yang bersifat genetik maupun yang berada di dalam kromosom maupun diluar kromosom. Pasmid merupakan kromosom ekstraseluler pembawa sifat resistensi

yang dapat dipindahkan melewati komponen yakni faktor R. Faktor R plasmid terdiri dari 2 unit yaitu segmen RTF (resistensi transfer factor) dan determinan r (unit r). Segmen RTF berperan dalam perpindahan faktor R dan unit r berperan untuk membawa sifat resistensi terhadap antibiotik tersebut (Royston, 1972). Mekanisme genetik lain adalah transposon dan integron, yang memungkinkan gen pembawa plasmid menyatu (integrated) ke dalam kromosom bakteri sehingga resistensi yang terjadi menetap dan diturunkan ke generasi bakteri berikutnya (Shears, 2001).

Peningkatan prevalensi resistensi bakteri terhadap antimikroba merupakan masalah utama pada intervensi infeksi. *Klebsiella pneumoniae* memiliki kemampuan resistensi pada antibiotik dengan berbagai mekanisme yaitu mencegah penetrasi antibiotik dengan biofilm, penurunan laju pertumbuhan bakteri dalam biofilm dan ekspresi gen resisten antibiotik (Gharrah et al., 2017).

Klebsiella pneumoniae yang hidup dalam biofilm terlindungi dari penetrasi antibiotik karena adanya barrier berupa substansi polimer ekstraseluler (Naparstek et al., 2014). Isolat *Klebsiella pneumoniae* yang mengekspresikan adhesin fimbrial tipe 3 mampu membentuk biofilm pada permukaan abiotik maupun biotik (Schroll et al., 2010). Fimbriae tersebut dikode oleh lima gen yaitu *mrk ABCDF* yang menyusun polipeptida pada permukaan bakteri. Adhesin MrkD memediasi perlekatan bakteri pada struktur kolagen (Bellifa et al., 2013). Selain mekanisme tersebut, bakteri yang terletak jauh di dalam lapisan biofilm memiliki laju pertumbuhan yang lambat sehingga memungkinkan adaptasi terhadap paparan antibiotik (Vuotto et al., 2014).

Antibiotika yang paling sering digunakan untuk mengobati infeksi *Klebsiella pneumoniae* adalah jenis β -lactam yang bekerja dengan cara menghambat transpeptidase dalam sintesa dinding sel bakteri, akan tetapi dapat diinaktivasi oleh enzim β -lactamase (Gharrah, et al., 2017). Isolat *Klebsiella*

pneumoniae yang memiliki plasmid berisi gen pengkode ESBL berkaitan dengan resistensi bakteri tersebut terhadap berbagai antibiotik (Bennett *et al.*, 2010).

ESBL yang dimediasi plasmid bekerja dengan cara menghidrolisa agen *oxyimini- β -lactam* seperti cefalosporin generasi ketiga dan aztreonam. Plasmid tersebut juga membawa gen yang resisten terhadap antibiotik seperti aminoglikosida, kloramfenikol, sulfonamida, trimethoprim dan tetrasiklin, sehingga *Klebsiella pneumoniae* yang memiliki plasmid tersebut resisten terhadap berbagai antibiotik. Lebih dari 100 jenis enzim ESBL telah diidentifikasi, masing-masing dengan resistensi dan kerentanan terhadap antibiotik yang berbeda-beda (Gupta *et al.*, 2003).

Peningkatan penggunaan cefalosporin generasi ketiga merupakan faktor risiko utama peningkatan *Klebsiella pneumoniae* yang memproduksi ESBL. Beberapa faktor risiko lain terhadap kolonisasi dan infeksi *Klebsiella pneumoniae* yang memproduksi ESBL antara lain kateterisasi arteri dan vena sentral, kolonisasi bakteri pada saluran pencernaan, perawatan intensif jangka panjang di rumah sakit dan riwayat penggunaan antibiotik (Gupta *et al.*, 2003).

2.2 BIOFILM

Biofilm merupakan matriks ekstraseluler polisakarida yang berasal dari kumpulan bakteri yang bereplikasi membentuk mikrokoloni dan melekat secara ireversibel pada permukaan biotik atau abiotik. Biofilm dapat terbentuk hampir pada semua bakteri, pada bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif. Perbedaan jenis ataupun morfologi bakteri tersebut mempengaruhi kuat dan lemah pertahanan bakteri tergantung produksi substansi dari biofilm dan jenis bakteri yang dapat memproduksi biofilm (Williamson *et al.*, 2012).

2.2.1 Struktur Biofilm

Mikrokoloni yang terbentuk didalam biofilm merupakan komunitas sel bakteri yang tertutup matriks dan terdiri dari satu atau lebih spesies bakteri.

Berdasarkan spesies yang termasuk didalamnya, mikrokoloni dapat terdiri dari 10-25% sel dan 75-90% substansi matrik ekstraseluler polimerik/EPS (Garrett, *et al.*, 2008).

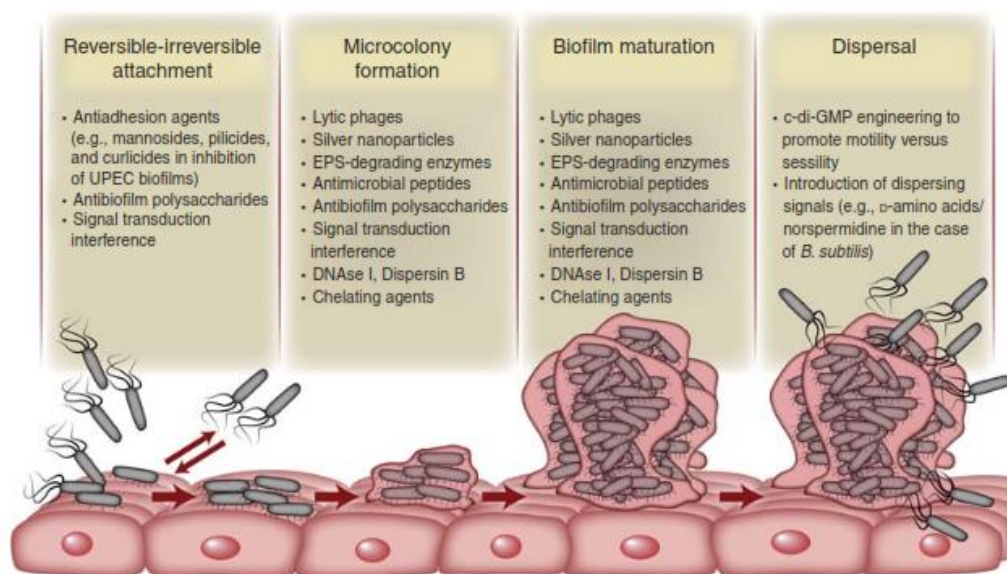
Matriks biofilm terdiri dari molekul EPS dan protein pengikat karbohidrat, pilli, flagella, serat adesif lainnya dan DNA ekstraseluler (eDNA) yang berfungsi sebagai lipatan yang menstabilkan struktur tiga dimensi biofilm. Dalam matriks tersebut, nutrisi ditangkap sebagai sumber metabolisme bakteri penghuni biofilm dan air juga disalurkan dengan efisien melalui interaksi ikatan-H dengan polisakarida hidrofilik. Enzim yang disekresi oleh bakteri memodifikasi komposisi EPS sebagai respon ketersediaan nutrisi, sehingga meregulasi bentuk biofilm sesuai dengan lingkungan yang spesifik. sehingga komponen struktur tersebut membentuk biofilm yang kuat dan terhidrasi dengan baik dan dengan kekuatan tarikan yang tinggi menjaga bakteri agar tetap berdekatan sehingga mudah untuk terjadi interaksi antar sel dan pertukaran DNA, dalam usaha menjaga biomass tersebut dari desikasi, predasi, molekul teroksidasi, radiasi dan agen perusak lainnya (Kostakioti *et al.*, 2013).

Struktur biofilm bakteri gram negatif terdiri dari homopolisakarida atau heteropolisakarida. Molekul tersebut memperkuat biofilm dengan berperan dalam stabilitas mekanis dan adhesi serta kohesi biofilm serta pertahanan dari kondisi lingkungan yang ekstrim (Garrett *et al.*, 2008). Diferensiasi fenotip sel yang berhubungan dengan gradien oksigen dan nutrisi ditemukan dalam biofilm monospesies bakteri fakultatif anaerob. Sel yang terletak pada lapisan biofilm teratas mengkonsumsi seluruh oksigen dan tumbuh secara aerobik, sementara mikroba anaerobik tumbuh dibawah lapisan aerobik tersebut. Daerah yang

kekurangan oksigen dan nutrisi ditemukan didasar lapisan struktur biofilm dan sebagian dari sel tersebut tidak aktif secara metabolik atau mati. Akibatnya respon bakteri sel bakteri terhadap lingkungan tersebut menghasilkan fenotip yang heterogen (Dufour *et al.*, 2012).

2.2.2 Mekanisme Pembentukan Biofilm

Pembentukan biofilm menurut Crouzet *et al.* (2014) secara umum dikategorikan menjadi 4 tahapan yakni: (a) perlekatan bakteri di suatu permukaan, (b) pembentukan *microcolony*, (c) pematangan biofilm, dan (d) pelepasan biofilm (dispersal). Tahap pembentukan biofilm oleh Kostakioti *et al.* (2013) digambarkan secara skematis pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Skema Pembentukan Biofilm dan Target Penghambatannya.

(Dari kiri ke kanan): (1) Tahap perlekatan bakteri yang bersifat reversible dan irreversible; (2) Tahap pembentukan *microcolony*; (3) Tahap pematangan biofilm; dan (4) Tahap disperse/pelepasan.

a. Perlekatan bakteri di suatu permukaan

Mula-mula sel-sel planktonik bakteri yang bermigrasi di satu permukaan menempel pada substrat melalui suatu mekanisme adhesi, dalam tahap ini tidak

semua bakteri planktonik langsung menempel begitu saja melainkan ada yang terlepas kembali setelah menempel, sehingga tahap ini juga disebut reversible-irreversible attachment.

b. Pembentukan microcolony

Pada tahap kedua, sel-sel bakteri mulai berkembang dan bermultiplikasi, diikuti dengan tahap ketiga yakni pembentukan awal struktur biofilm dan produksi molekul-molekul yang digunakan untuk proses komunikasi dan transduksi sinyal antar sel.

c. Pematangan biofilm

Pada akhir tahap ketiga ini akan terbentuk struktur biofilm yang matang ditandai dengan terbentuknya EPS. EPS sendiri tersusun dari polisakarida dan berbagai senyawa makromolekuler seperti protein, lemak, asam nukleat, dan lain-lain. Molekul biopolimer seperti glikopeptida, lipid dan lipopolisakarida membentuk semacam kerangka penyusun yang memperkuat struktur biofilm (Flemming dan Wingender, 2010).

d. Pelepasan biofilm (dispersal)

Tahap terakhir dari terbentuknya biofilm adalah terdispersinya *single cell* bakteri dari biofilm menuju lingkungan baru lainnya (Satpathy et al., 2016).

2.2.3 Gen-Gen Pengkode Biofilm

Ditinjau dari aspek biomolekuler, pembentukan biofilm diatur oleh sejumlah gen yang berkaitan fungsinya satu sama lain. Pada fase awal pembentukan biofilm, yakni saat pertama kali bakteri menempel di suatu permukaan, yang banyak berperan dalam proses tersebut adalah gen-gen pengkode protein permukaan. Secara khusus pada kasus-kasus infeksi nosokomial bakteri *Klebsiella pneumoniae*, yang memfasilitasi penempelan bakteri di peralatan medis

adalah fimbriae tipe 1 dan tipe 3 sedangkan fimbriae tipe IV pada lingkungan biotik seperti sel epitel inang. Fimbriae tipe 1 dan IV dikode oleh klaster gen *fim* sedangkan tipe 3 oleh *mrk operon*. (Bandeira *et al.*, 2017). Setelah fase penempelan (*adherent*) bakteri di permukaan tertentu, selanjutnya adalah proses pembentukan *microcolony* melalui interaksi antar sel bakteri. Bakteri berinteraksi satu sama lain melalui suatu sistem komunikasi yang disebut dengan *Quorum Sensing* (QS).

Quorum Sensing merupakan sistem komunikasi antar sel bakteri menggunakan sejumlah *signaling molecule* sebagai perantara. Molekul-molekul *signaling* yang berperan dalam QS disebut dengan *autoinducer* (AI). AI dihasilkan oleh bakteri melalui proses transkripsi gen sebagai respon ketika koloni telah mencapai suatu tingkat kepadatan sel tertentu. AI bekerja dengan prinsip ligan-reseptor kemudian diteruskan ke dalam sel secara transduksi sinyal. Berdasarkan jenis *autoinducer*-nya QS dikelompokkan menjadi dua macam, yakni QS-Tipe I dan QS-Tipe II (Ngeow *et al.*, 2013).

QS-Tipe I menggunakan molekul *Acyl-Homoserine Lactone* (AHL) sebagai AI. AHL diproduksi oleh enzim AHL synthase yang ekspresinya dikode oleh gen *luxI*. Apabila AHL yang diproduksi oleh bakteri mencapai suatu level konsentrasi tertentu (*threshold level*), maka AHL akan dikenali dan berikatan dengan protein reseptor yang disebut dengan LuxR. LuxR adalah suatu protein yang terdiri dari dua buah domain yakni ujung C-terminal merupakan *DNA binding domain* dan ujung N-terminal merupakan *AHL-binding domain* dan ekspresinya diatur oleh gen *luxR* (Parsek dan Greenberg, 2000; Steindler dan Venturi, 2006; Ngeow *et al.*, 2013).

QS-Tipe II mensekresi *autoinducer* golongan AI-2. AI-2 merupakan senyawa turunan furanosa yang sintesisnya diregulasi oleh enzim S-ribosylhomocysteine lyase (LuxS). AI-2 diinternalisasi oleh sel bakteri melalui

ikatan dengan protein transporter LuxS-regulator (Lsr). Molekul AI-2 yang berada di dalam sel akan berperan sebagai *gene regulator* untuk memicu perubahan tingkat seluler (Roy *et al.*, 2011).

2.3. PROBIOTIK

Probiotik didefinisikan sebagai bakteri hidup yang diberikan sebagai suplemen makanan yang mempunyai pengaruh menguntungkan terhadap kesehatan yakni bermanfaat dalam meningkatkan sistem kekebalan tubuh, memperbaiki penyerapan gizi makanan, memperlambat proses degeneratif alamiah akibat perkembangan bakteri-bakteri merugikan dalam sistem pencernaan, dan memperkuat fungsi usus dengan menjaga keseimbangan flora usus (Gatti *et al.*, 2004)

Microbial ecology dari usus sangat penting, karena *gut microenvironment* berpengaruh terhadap nutrisi, feed conversion dan terjadinya penyakit pada host (Guarner *et al.*, 2003). Bakteri probiotik mempunyai banyak dan macam pengaruh yang menguntungkan pada kesehatan host baik secara langsung maupun tidak langsung termasuk meningkatkan fungsi barrier (pertahanan) mukosa, perbaikan mikroflora normal, mencegah penyakit infeksi, mencegah alergi makanan, mereduksi kolesterol dalam darah (Roos and Katan, 2000), aktifitas anti kariogenik (Ishikaw *et al.*, 2005), memodulasi sistem imun mukosa, memproduksi bahan antimikroba, meningkatkan pencernaan dan absorpsi makanan serta merubah mikroflora usus (Jean *et al.*, 2003). Efikasi dari probiotik tergantung pada aktifitas mekanisme kerjanya termasuk kemampuan untuk melekat (*adherence*) dan berkolonisasi pada *human gut* yang nantinya akan meningkatkan sistem imun dari host (Sarah *et al.*, 2008). Adanya perlekatan bakteri probiotik terhadap sel akan menimbulkan bermacam aktifitas biologis terutama pelepasan sitokin dan

kemokin, selanjutnya akan menstimulasi aktifitas mukosa dan imunitas sistemik dari host (Delcenserie *et al.*, 2005).

Probiotik meningkatkan status imun dari host dengan cara menginduksi sel-sel yang terlibat didalam innate immunity sehingga dapat menstimulasi dan memodulasi sistem imun mukosa (Hart *et al.*, 2009). Mekanisme imunomodulasi oleh bakteri probiotik yaitu melalui interaksi antara bakteri probiotik dengan sel epitel atau M cells atau sel dendrit menghasilkan internalisasi bakteri atau komponennya. Interaksi ini akan menstimuli pelepasan IL-6 oleh sel epitel dan menstimuli makrofag dan sel dendrit untuk memproduksi TNF- α dan IFG- γ (Rachmilewitz *et al.*, 2004). Sel dendritik adalah Antigen Presenting cells yang penting di dalam fase pengenalan awal terhadap bakteri dan respon terbentuknya sel T. Di dalam usus DC mempunyai fungsi yang spesifik, kontribusi terhadap induksi oral tolerance dengan cara memacu regulasi sel T dan sel B dalam menghasilkan IgA melalui produksi cytokine seperti IL-10 dan TGF- β . Di dalam intestinal DC berinteraksi langsung dengan bakteri yang ada di lumen dengan cara DC masuk kedalam lumen usus dan secara tidak langsung melawan bakteri via M-cell. Posisi sel DC sangat penting terhadap interseksi antara innate dan adaptive immunity dengan kemampuannya untuk mengenal dan merespon komponen bakteri untuk initiate primary immune response, dan secara langsung merespon sel T dan sel B (Zeuthen *et al.*, 2006; Fink *et al.*, 2007). selain itu, Mast cells (MAC) juga distimulasi untuk memproduksi sitokin IL-4, yang mana bersama dengan IL-6 dan TGF- α menginduksi T independent untuk switch IgM ke IgA pada permukaan limfosit B, dengan demikian dapat meningkatkan produksi IgA (Rizzello *et al.*, 2011).

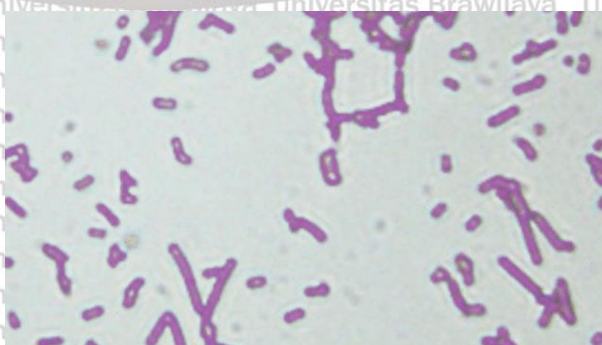
Produk pangan probiotik yang telah lama dikenal antara lain susu fermentasi seperti yogurt, yakult, susu asidofilus, dan lain-lain. Selain mempunyai nilai nutrisi yang baik, produk tersebut dianggap memberi manfaat kesehatan dan

terapeutik. Manfaat ini diperoleh akibat terbawanya bakteri-bakteri hidup ke dalam saluran pencernaan yang mampu memperbaiki komposisi mikroflora usus sehingga mengarah pada dominansi bakteri-bakteri yang menguntungkan kesehatan.

Produk-produk probiotik yang beredar di pasaran saat ini, kebanyakan berisi bakteri dari *Lactobacillus* sp.. Salah satu spesies *Lactobacillus* yang digunakan dalam suplemen probiotik yaitu *Lactobacillus helveticus* yang memiliki peranan dalam memelihara kesehatan fungsi pencernaan (Wakai dan Yamamoto, 2012).

2.4 *Lactobacillus helveticus*

Bakteri *Lactobacillus helveticus* merupakan probiotik yang banyak digunakan dalam minuman susu berfermentasi (Gatti et al., 2004; Vinderola et al., 2007). Bakteri ini memiliki kemampuan untuk mengurangi rasa pahit dan memberikan ciri khas rasa pada keju, yang menjadikan bakteri ini sebagai komponen penting dari kultur starter untuk industri susu. Minat konsumen dalam makanan fungsional telah memotivasi para peneliti untuk mempelajari senyawa bioaktif yang terbentuk selama fermentasi produk susu oleh BAL seperti *Lactobacillus helveticus* (Vinderola et al., 2007; Wakai dan Yamamoto, 2012).

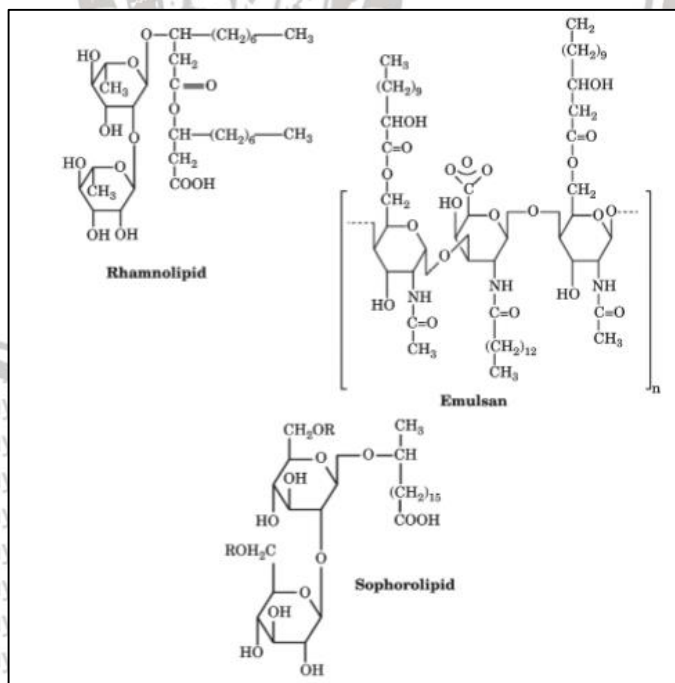


Gambar 2.5 Pewarnaan Gram Bakteri *Lactobacillus helveticus* (Ekundayo, 2014).

Berdasarkan taksonominya *Lactobacillus helveticus* termasuk ke dalam golongan bakteri Gram positif (Gambar 2.5) penghasil asam laktat sebagai hasil dari fermentasi karbohidrat, tidak menghasilkan enzim katalase, mikroaerotoleran, serta asidotoleran. *Lactobacillus helveticus* juga memiliki karakteristik berupa non-motil, tidak menghasilkan endospora, dapat berbentuk batang maupun kokus, dan bersifat anaerob fakultatif (Ekundayo, 2014).

2.4.1 Aktivitas Antibiofilm Bakteri *Lactobacillus helveticus*

Lactobacillus helveticus merupakan bakteri asam laktat yang memiliki potensi sangat besar dalam menghambat pertumbuhan bakteri lain yang bersifat patogen. *Lactobacillus helveticus* memiliki aktivitas anti biofilm dengan cara mensintesa biosurfaktan sebagai peptida aktif yang berpotensi sebagai bahan anti-adhesive untuk mencegah perlekatan bakteri patogen pada suatu substrat (Rodrigues et al., 2006).



Gambar 2.6. Struktur Biosurfaktan (Luna et al., 2009).

Biosurfaktan adalah molekul ampifilik dengan bagian hidrofobik yang terdiri dari asam lemak rantai panjang, asam lemak hidroksil, atau asam lemak α -alkil- β -hidroksi berupa karbohidrat, asam amino, siklik peptida, fosfat, asam karboksilat, atau alkohol (Gambar 2.6) (Luna *et al.*, 2009).

Biosurfaktan yang diproduksi oleh *Lactobacillus helveticus* telah dikarakterisasi secara kimia. Hasil spektrum TLC, FTIR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, dan GCMS menunjukkan bahwa biosurfaktan terdiri dari beberapa senyawa seperti asam oktadekanoat sebagai lipid utama yang terdiri dari rantai alifatik panjang dan polisakarida. Analisis proton dan karbon NMR mengkonfirmasi keberadaan $-\text{CH}_3$ (0.896 ppm), $-(1.286 \text{ ppm})$, $-(\text{CH}_2-\text{COO})-$ (2.324 ppm), $-\text{O}-\text{CH}-$ (4.386 ppm), dan $-\text{CH}_2=\text{CH}-$ (7.535 ppm). Proton NMR mengkonfirmasi keberadaan gugus karboksil, alkil, metil, alkana, dan keto. Biosurfaktan murni *Lactobacillus helveticus* berupa bubuk putih dan ditemukan bersifat anionik. Kromatografi cair dan spektroskopi massa menunjukkan bahwa biosurfaktan adalah glikolipid yang sangat mirip dengan xylolipid yang sebelumnya diperoleh dari LAB (Sharma *et al.*, 2011).

Lactobacillus helveticus merupakan bakteri asam laktat yang mampu mensekresikan biosurfaktan seperti *surfactin* yang berpotensi sebagai bahan anti-adhesif yang memiliki kemampuan menghambat penyebaran dan adhesi bakteri patogen pada sel epitel sebagai tahap awal proses pembentukan biofilm (Gupta dan Garg, 2009; Rodrigues *et al.*, 2006). Hal serupa juga didapatkan pada penelitian Shokouhfar *et al.* (2015), yaitu aktifitas anti-adhesif oleh biosurfaktan dari *L. acidophilus* terhadap patogen pembentuk biofilm *Serratia marcescens*.

Biosurfaktan tersebut mempengaruhi interaksi antar sel bakteri melalui perubahan tegangan permukaan dan muatan dinding sel, yang mana faktor tersebut dibutuhkan untuk perlekatan sel bakteri dengan permukaan substrat maupun antar sel bakteri (Shokouhfar *et al.* 2015).

Biosurfaktan yang dipurifikasi dari *Lactobacillus helveticus* menghambat pertumbuhan sel beberapa bakteri patogen dengan cara merusak membran sitoplasma mengakibatkan lisis sel, kebocoran zat metabolit dan merusak konformasi protein (Sharma dan Saharan, 2016).

Selain memproduksi biosurfaktan, Bakteri *Lactobacillus helveticus* juga mampu membentuk lapisan biofilm. Jalilsood *et al.* (2015) membuktikan kemampuan bakteri *Lactobacillus* dalam membentuk biofilm stabil yang menekan pembentukan biofilm oleh sejumlah bakteri patogen secara korelatif. Prinsip inilah yang mendasari konsep biokontrol bakteri patogen oleh bakteri *Lactobacillus*, dimana gen *gfp* pada bakteri *Lactobacillus* juga telah terbukti sangat stabil sehingga mampu mengekspresikan *green fluorescence protein* (GFP) sebagai reporter.

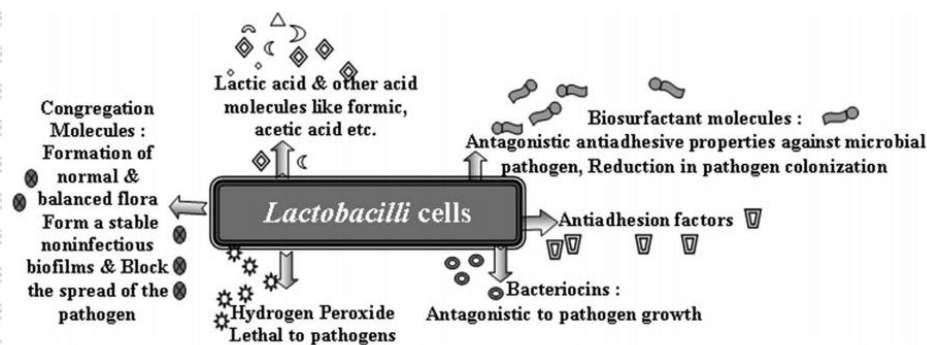
Bakteri *Lactobacillus* berkompetisi dengan bakteri pathogen dalam membentuk lapisan biofilm pada sistem pencernaan *host*. Molekul-molekul EPS yang dihasilkan oleh biofilm yang terbentuk dari BAL secara langsung akan mengurangi kemampuan adhesi bakteri pathogen di permukaan saluran cerna, sehingga biofilm bakteri patogen tidak akan terbentuk.

2.4.2 Aktivitas Antimikroba Bakteri *Lactobacillus helveticus*

Lactobacilli diketahui menghasilkan berbagai produk sampingan metabolisme selain biosurfaktan. Beberapa di antaranya memiliki aktivitas antimikroba termasuk asam laktat, hidrogen peroksida, bakteriosin dan zat mirip bakteriosin (Gambar 2.7) yang memiliki keunggulan penting terkait medis.

Bakteriosin dapat menyebabkan lisis sel dengan cara membentuk pori dan menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Sabo, *et al.*, 2014). Sedangkan Asam organik seperti asam laktat mampu merubah permeabilitas membran luar bakteri patogen yang tidak dapat dilalui bakteriosin dan antibiotik hidrofobik serta

merubah pH lingkungan sehingga menghambat viabilitas dan mencegah pertumbuhan bakteri patogen tersebut.

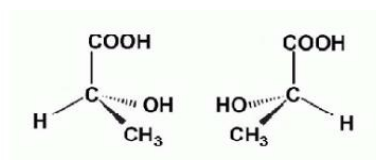


Gambar 2.7. Sekresi Berbagai Senyawa Antimikroba oleh Sel Lactobacilli

Lactobacilli diketahui menghasilkan berbagai produk sampingan metabolisme: bakteriosin, faktor anti adhesi, biosurfaktan, asam laktat dan zat mirip bakteriosin (Sabo, *et al.*, 2014)

Produksi Asam Laktat dan Penurunan pH Lingkungan

Asam laktat adalah asam 2-hidroksi propanoat dan dikenal juga sebagai asam susu atau *lactic acid* (Hart *et al.*, 2003). Secara struktur, asam laktat adalah asam karboksilat dengan satii gugus (hidroksil) yang menempel pada gugus karboksil (Gambar 2.8). Dalam air, asam ini terlarut lemah dan melepas proton (H^+), meinbentuk ion laktat. Asam laktat juga larut dalam alkohol dan bersifat menyerap air (higroskopik). Asam laktat uinumnya berupa D, L- atau L-asam laktat. Asam laktat diproduksi berdasarkan sintesis yang dimulai dari etanol membentuk rasemik D, L asam laktat atau mclalui homofennentasi karbohidrat yang biasanya membentuk L- tetapi bisa juga D, L- asam laktat.



Gambar 2.8. Struktur asam laktat (Hart *et al.*, 2010)

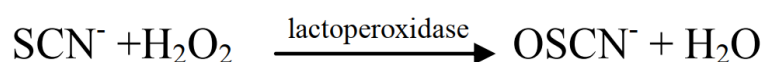
Bakteri *Lactobacillus helveticus* tergolong dalam BAL yang telah dibuktikan memproduksi asam laktat. Asam laktat yang dihasilkan oleh BAL mempunyai karakteristik sebagai antibakterisida terhadap bakteri-bakteri patogen melalui mekanisme induksi *acid tolerance response* pada bakteri patogen sehingga menyebabkan peningkatan sensitivitas terhadap hydrogen peroksida melalui downregulasi gen OxyR. Selain itu asam laktat juga diketahui mampu mempengaruhi permeabilitas membran sel bakteri Gram negatif sehingga memfasilitasi masuknya senyawa-senyawa bakterisidal lainnya dan menginduksi kematian bakteri patogen (Atassi dan Servin, 2010). Asam laktat yang dihasilkan oleh BAL berperan penting dalam menghambat pertumbuhan sekaligus pembentukan biofilm bakteri patogen. Maldonado *et al.* (2007) menemukan fakta bahwa kultur sel dan supernatan asam dari *Lactobacillus* menghambat pertumbuhan dan pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae*, sedangkan supernatant yang bersifat netral memiliki efek yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan kultur *whole* sel dan supernatant asam. Senada dengan hal tersebut, dilaporkan juga bahwa supernatan asam dari kultur *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus fermentum* yang diisolasi dari yoghurt dan vagina mempunyai efek penghambatan baik pada pertumbuhan sel planktonik *Klebsiella pneumoniae* maupun pembentukan biofilmnya. Lebih lanjut, kombinasi menggunakan antibiotik amikacin dan gentamicin selain dapat berefek pada biofilm juga menunjukkan efek bakterisida terhadap *Klebsiella pneumoniae* (Al-Mathkhury dan Assal, 2012).

Hidrogen Peroksida

Dalam kondisi adanya oksigen, BAL menghasilkan hydrogen peroksida melalui oksidasi molekul yang mengandung flavoprotein, oksidasi NADH. dan superoxide disniutase. BAL tidak menghasilkan katalase yang berfungsi mengurangi hydrogen peroksida. Pada sistem lainnya bafawa penguraian hydrogen peroksida

tidak seaktif dibandingkan dengan produksi hydrogen peroksida itu sendiri sehingga terjadi akumulasi hydrogen peroksida. Hydrogen peroksida tidak akan terakumulasi sebab hydrogen proksida diuraikan oleh peroksidase: flavoprotein, dan pseudcatalase. Pengaruh bakterisidal dari hydrogen peroksida dihubungkan dengan efek oksidasi yang kuat di dalam sel bakteri seperti kelompok sulfidril dari protein sel dan lipid membran dapat dioksidasi. Untuk menghasilkan hidrogen peroksida dibutuhkan oksigen sehingga menyebabkan lingkungan menjadi anerobik. Hal ini tidak baik untuk orgamsme yang bersifat aerobik (Salminen *et al.*, 2004).

Pada kondisi normal pengaruh antimikroba dari hidrogen proksida ditingkatkan karena adanya lactoperoksidase dan thiocyanate (SCN^-) (Gambar 2.9). OSCN^- menyebabkan kerusakan struktural dan perubahan pada meinbran sel bakteri. Namun yang menjadi faktor utaina hidrogen peroksida menjadi senyawa antimikroba yaitu menghainbat proses glikolisis. Hidrogen peroksida menghanibat pengangkutan glukosa, aktivitas heksokinase, dan aktivitas glyceraldehyde-3-phospat dehidrogenase dengan cara mengoksidasi sulfliydryl yang terdapat didalam enzim tersebut (Salminen *et all.* 2004).



Gambar 2.9. Pengaruh antimikroba dari hidrogen proksida

Bakteriosin

Bakteri asam laktat memiliki kemampuan memproduksi peptida yang disintesa dalam ribosom dan disekresikan ke ekstraseluler yang disebut bakteriosin. *Lactobacillus* merupakan genus terbesar dalam bakteri asam laktat

yang telah banyak dimanfaatkan sebagai produsen bakteriosin untuk mengatasi patogen yang berasal dari makanan maupun di bidang medis (Bosch *et al.*, 2011).

Bakteriosin tersebut menjadikan *Lactobacillus* mampu berkompetisi dengan bakteri patogen di dalam saluran pencernaan dan memiliki efek menghambat pembentukan biofilm *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, dan *Staphylococcus aureus* (De Vuyst dan Leroy, 2007).

Bakteriosin yang diproduksi bakteri asam laktat mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen dengan konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan peptida antimikroba yang dihasilkan organisme eukaryotik, karena interaksinya dengan reseptor spesifik pada sel target. Bakteriosin diproduksi pada akhir fase log maupun awal fase stasioner dengan mekanisme quorum sensing dan memiliki kandungan peptida molekular yang berbeda dengan antibiotik, menjadikan bakteriosin mudah didegradasi enzim protease dalam saluran pencernaan (Martinez *et al.*, 2013).

Aktivitas penghambatan bakteriosin baik yang bersifat bakterisidal, bakteriostatik maupun bakteriolisis umumnya dirujukan terhadap dinding dan membran sel dan mikroorganisme target. Terhadap dinding sel, bakteriosin dapat menghambat biosintesis peptidoglikan sebagai penyusun utama dinding sel. Bakteriosin juga dapat mengganggu stabilitas membran sel dengan melakukan kontak langsung. Gangguan terhadap integritas dinding dan membran sel tersebut dapat menyebabkan terbentuknya lubang hingga sel mengalami kebocoran dan terjadi kehilangan *Proton Motive Force* (PMF).

Kebocoran mengakibatkan teriadinya difusi keluar dan masuk molekul-molekul seluler dan hilangnya PMF akan membawa pada penurunan pH gradient seluler. Efeknya menyebabkan pertumbuhan sel terhambat karena terhentinya biosintesis makromolekul seperti DXA, RXA, dan protein. Oleh karena itu, proses

tersebut akan menghasilkan kematian pada sel yang sensitif terhadap bakteriosin (Gonzales *et al.*, 1996)

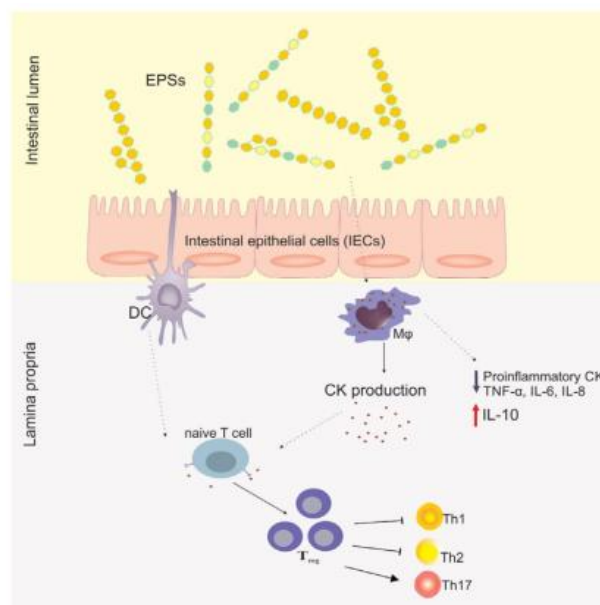
2.4.3 Aktivitas Imunomodulator dari Bakteri *Lactobacillus helveticus*

Molekul EPSs diketahui dapat memodulasi sistem kekebalan, baik respon bawaan maupun adaptif serta bertindak sebagai imunomodulator. Molekul EPSs ini dapat menekan infeksi, mencegah kanker saluran pencernaan dan penyakit yang disebabkan oleh imunodefisiensi, seperti penyakit radang usus. Imunomodulator mengubah aktivitas fungsi kekebalan tubuh dengan regulasi yang kuat dari sitokin (Saadat *et al.*, 2019).

EPS mengerahkan kemampuan imunomodulator melalui dua pola: Pertama, HePS asam, yang dicirikan memiliki fosfat. Penelitian lebih lanjut telah membuktikan bahwa fosfat merupakan molekul penginduksi respon imun yang baik dan mampu mengaktifkan sel-sel kekebalan yang berbeda seperti makrofag dan limfosit. Pola hubungan kedua yaitu HePS yang memiliki ukuran besar atau HMW, yang bertindak sebagai penekan respons imun (Hidalgo-Cantabrana *et al.*, 2012; Saadat *et al.*, 2019). Namun, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk memahami mekanisme imunostimulator/penekan ini (Ruas Madieto, 2014).

Aktivitas imunomodulator EPS merangsang *Antigen Presenting Cells* (APC), seperti sel dendritik (DC), melalui Toll-like receptors (TLRs) (terutama melalui pensinyalan TLR2 dan TLR4) (Jones, 2014; Liu *et al.*, 2011). Reseptor Pengenalan Pola Permukaan Sel (PRR) (seperti lektin tipe C) juga dapat berfungsi sebagai reseptor EPS yang berperan untuk mengubah faktor pensinyalan dan transkripsi sel serta berperan menginduksi atau meningkatkan produksi sitokin (Jones *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2011). Telah dilaporkan bahwa, EPS dapat secara efektif merangsang produksi sitokin oleh makrofag, terutama tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), IL-1b, dan IL-12 (Dilna *et al.*, 2015; Lynch *et al.*,

2018). EPS dapat menginduksi diferensiasi DC, yang jika berkombinasi dengan sitokin, dapat mendukung diferensiasi sel T naif menjadi sel T regulator (Treg) yang akan mendorong respon berlebihan sel T efektor (baik Th1, Th2 atau Th17) yang akhirnya menginduksi homeostasis imun. Singkatnya, EPS dapat memainkan peran yang relevan dalam pemeliharaan keseimbangan kekebalan dalam keadaan peradangan dan/atau infeksi (Gambar 2.10) (Madicdo, 2014).



Gambar 2.10. Aktivitas imunomodulator EPS. Struktur EPS dapat mempengaruhi tipe respon imun: HMW EPS dapat menginduksi aktivasi dan diferensiasi DC, yang mengarah ke produksi CK, kemudian dimediasi diferensiasi sel T naif menjadi Treg yang akan mengendalikan respon sel T yang berlebihan. Lebih lanjut, EPS secara efektif dapat merangsang produksi sitokin oleh makrofag yang dapat menginduksi homeostasis melalui pengurangan CK pro-inflamasi (Saadat *et al.*, 2019).

EPSs, exopolysaccharides; CK, sitokin; Treg, sel T regulator; DC, sel dendritik; MQ, makrofag; IL, interleukin; TH, T helper; EPS, exopolysaccharide; TNF- α , faktor alpha nekrosis tumor; HMW, berat molekul tinggi.

Salazar *et al.* menunjukkan bahwa, pemberian oral *B. animalis* subsp. strain *lactis* IPLA RI yang memproduksi EPS pada tikus sehat dikaitkan dengan pelindung kekebalan tubuh, karena galur penghasil EPS ini dapat menekan sitokin 1L-6 pro-inflamasi dan mensintesis sitokin pengatur TGF- β (Salazar *et al.*, 2014).

Hidalgo-Can-tabrana *et al.* menunjukkan bahwa *B. animatis* subsp. strain *lactis* yang memproduksi EPS mampu mengaktifkan limfosit T dan monosit, yang diisolasi dari darah tikus untuk menginduksi respon Th1 proinflamasi yang dominan (Hidalgo-Cantabrana *et al.*, 2014). Selain itu, Fanning *et al.* menunjukkan bahwa EPS dapat memberikan manfaat langsung untuk meningkatkan kesehatan melalui pengurangan kolonisasi patogen (Fanning *et al.*, 2012).

Sifat imunomodulasi lain yang diinduksi oleh BAL adalah stimulasi sistem imun mukosa melalui promosi sekresi imunoglobulin A (IgA) inang untuk memperkuat garis pertahanan pertama, seperti pelindung mukosa. IgA adalah isotype imunoglobulin paling melimpah di lendir epitel dan dapat menjebak antigen, sehingga mencegah mereka dari pengikatan ke reseptor permukaan sel. Gen IgA dalam jumlah besar sangat diperlukan untuk perlindungan mukosa. Telah dilaporkan bahwa beberapa jenis BAL efektif melawan infeksi patogen melalui kemampuan menginduksi IgA (Saadat *et al.*, 2019). Matsuzaki *et al.* menunjukkan bahwa EPS yang diekstraksi dari *L. mesenteroides* strain NTM048 memiliki kemampuan untuk menginduksi IgA. Sifat-sifat NTM048 EPS ini merupakan immunostimulan yang efektif yang berperan sebagai perlindungan dari patogen mukosa (Matsuzaki *et al.*, 2015).

2.5 METODE UJI AKTIVITAS ANTIADHESIN

2.5.1 Uji Aktivitas Antiadhesin Menggunakan Enterosit Tikus/Mencit

Metode ini paling umum di gunakan,karena mudah di lakukan dan murah.

Prinsip dari metode ini yaitu mengisolasi enterosit tikus/mencit (Nagayama, 1995) yang kemudian dicampurkan dengan pili dari isolat bakteri dengan berbagai konsentrasi. Untuk uji hambatan dilakukan dengan mencampurkan suspensi bakteri patogen yang selanjutnya ditanam pada media selektif untuk dihitung indeks adhesinnya. Indeks adhesi adalah jumlah rerata bakteri yang menempel

pada enterosit, dihitung untuk setiap pengamatan terhadap 100 enterosit (Santoso, 2002; Winarsih *et al.*, 1997).

2.5.2 Uji Aktivitas Antiadhesin Menggunakan Biakan Sel Epitel Ambing Sapi

Biakan sel epitel ambing telah dikembangkan dari sel asal jaringan kelenjar ambing manusia, mencit, tikus, anjing dan sapi untuk berbagai keperluan penelitian (Oakley and Wetsch, 1991; Yamaguchi and Uchida, 1995). Metoda biakan sel epitel ambing yang berasal dari kerokan sel epitel ambing maupun jaringan kelenjar ambing memiliki kelemahan karena sel epitel tumbuh bersama-sama dengan fibroblas, yang akan tumbuh lebih cepat dibandingkan dengan sel epitel ambing (Gibson *et al.*, 1991). Di samping itu, preparasi biakan sel asal jaringan memerlukan proses penguraian secara enzimatik yang membutuhkan waktu dan dana lebih banyak. Meskipun demikian, metode ini dapat menghasilkan biakan sel epitel lestari dalam jumlah banyak.

Biakan sel epitel ambing juga dapat dikembangkan dari reruntuhan sel epitel dalam susu dari hewan kambing dan sapi (Sailasuta *et al.*, 1990). Teknik pengembangan biakan sel epitel ambing dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu pemberian serum konsentrasi rendah dan faktor tumbuh (hormon, *feeder cells*) (Chambon *et al.*, 1984) atau pemberian serum konsentrasi tinggi (30%) (Sailasuta *et al.*, 1990). Umumnya biakan sel mencapai tingkat konfluen dalam waktu 3 minggu. Biakan sel primer ini dapat dipelihara dalam waktu yang cukup lama hingga 5-6 kali subkultur dan memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan sel lestari.

2.5.3 Uji Aktivitas Antiadhesin Menggunakan Protein Membran Luar Isolat Bakteri Sebagai Protein Adhesin

Metode ini dilakukan dengan mengisolasi protein Hemagglutinin *Outer Membran Protein* (omp) bakteri. Isolasi dilakukan dengan metode Evan's. Modifikasinya pada bagian sampel yang digunakan yaitu bagian endapan dari perlakuan pemotongan pili pada putaran yang terakhir, pelet disuspensi dengan PBS pH 7,4 sampai volumenya mencapai 15 kali, kemudian ditambahkan n-octyl B-D-glucopyranoside (NOG) konsentrasi mencapai 0,5%, lalu dihomogenkan menggunakan vortek dengan kecepatan penuh selama 1 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm suhu 4° C selama 30 menit. Cairan supernatan diambil, kemudian didialisis. Cairan yang digunakan untuk dialisis pada 24 jam pertama, yaitu d H₂O dan pada 24 jam kedua PBS pH 7,4. Selanjutnya dilakukan Monitoring berat molekul dikerjakan menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) (Mufida, 2010).

2.5.4 Uji Aktivitas Antiadhesin Menggunakan Sel Epitel Vesika Urinaria Kelinci

Kelinci yang dipergunakan adalah kelinci sehat dengan berat badan 1,5 kg. Kelinci dianestesi dengan menggunakan kloroform, kemudian diambil bagian vesika urinaria. Sel Epitel vesika urinaria diisolasi dengan melakukan suspensi pada jaringan dengan menggunakan PBS steril. Selanjutnya dilakukan penghitungan sel epitel vesika urinaria dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 560 nm sampai konsentrasi 10⁶ ml⁻¹. Epitel vesika urinaria ini kemudian dipergunakan untuk uji adhesi, uji hambat adhesi dan diambil bagian ECM (Mufida, 2010).

2.5.5 Uji Aktivitas Antiadhesin Menggunakan *Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)*

Metode ini membutuhkan waktu lebih lama, dana lebih banyak dan sedikit rumit dilakukan. Isolasi dan Pembuatan Kultur Sel Endotel dilakukan dengan cara umbilikus dibersihkan dari debris sel dengan *tissue*. Masing-masing ujung umbilikus dipotong transversal sehingga terlihat dua arteri dan vena (dinding yang lebih tebal, lebih besar dan lentur). Selanjutnya kanul dimasukkan pada satu ujung vena (klem) kemudian diikat dengan erat. Vena dibersihkan dengan PBS A melalui kanul yang terpasang dengan menggunakan *spuit* 20 cm. Ujung umbilikus yang tidak memiliki kanul diikat kuat. Selanjutnya kolagenase dimasukkan ke dalam vena seperti cara memasukkan kanul dan dibiarkan *spuit* terpasang pada kanul. Selanjutnya umbilikus didekap dengan tangan (agar suhu mencapai 37 °C) selama 8 menit.

Kolagenase (mengandung sel endotel) di-keluarkan dengan cara diambil dengan *spuit* yang masih terpasang dan dipindahkan pada tabung sentrifugasi steril. Cara seperti pemberian kolagenase diulang tetapi dengan menggunakan 8 ml PBS A. Larutan tersebut kemudian diambil kembali seperti pada cara sebelumnya. Larutan yang mengandung sel endotel disentrifugasi dengan kecepatan 1300 rpm selama 8 menit. Sentrifugasi diulang sebanyak dua kali dengan ditambahkan 2 ml media. Supernatan yang ter bentuk dipisahkan dan pelet diresuspensi dengan 4 ml media kultur. Supernatan yang diperoleh diinkubasi dalam inkubator (5% O₂ dan 95% CO₂). Pada hari berikutnya media diambil dan dicuci dengan menggunakan *serum free media*, kemudian diisi lagi dengan 4 ml media kultur. Setiap dua hari sekali setengah dari media diambil dan diganti dengan yang baru. Sel endotel akan berbentuk sebagai *monolayer* pada hari ke-3 dan selanjutnya di subkultur (Hidayati, 2010).

2.6 METODE PERHITUNGAN JUMLAH KOLONI BAKTERI

Perhitungan bakteri adalah suatu cara yang dilakukan untuk mengetahui berapa banyak sebaran bakteri yang tumbuh pada suatu media. Secara kuantitatif koloni sel bakteri dapat dihitung dengan cara menghitung populasinya secara umum atau juga dengan kata lain menghitung seluruh sel bakteri yang ada dalam media termasuk juga sel yang mati, dan menghitung sel bakteri hidup dengan menggunakan suatu teori pendekatan (Stainer, 1986).

Perhitungan bakteri merupakan salah satu cara yang juga dilakukan dengan tujuan untuk bisa mengetahui berapa banyak koloni bakteri yang terdapat pada suatu media, baik itu koloni sel bakteri yang hidup maupun koloni sel bakteri yang mati. Ada dua cara perhitungan bakteri, secara langsung dan perhitungan bakteri secara tidak langsung.

2.6.1 Perhitungan Secara Langsung

Perhitungan jumlah suatu bakteri secara langsung, biasa dipakai untuk menentukan jumlah bakteri keseluruhan baik yang mati maupun yang hidup. Ada beberapa cara perhitungan secara langsung, antara lain adalah dengan membuat preparat dari suatu bahan (preparat sederhana yang kemudian diwarnai atau tidak diwarnai) dan penggunaan ruang hitung atau disebut dengan sebutan sebagai (counting chamber).

2.6.2 Perhitungan Secara Tidak Langsung

Perhitungan secara tidak langsung hanya mengetahui jumlah mikroorganisme pada suatu bahan yang masih hidup saja (viable count). Untuk menentukan jumlah bakteri yang hidup dapat dilakukan setelah suspensi bahan atau biakan bakteri diencerkan dengan beberapa kali dan ditumbuhkan dalam medium dengan suatu cara tertentu tergantung dari macam bahan dan sifat bakterinya. (Bibiana, 1994). Dalam pelaksanaannya ada beberapa cara yaitu perhitungan pada cawan petri disebut (Viable Plate Count Method), serta

perhitungan melalui pengenceran, dan cara kekeruhan atau turbidimetri yaitu yang dengan menggunakan alat spektrofotometer (Wheeler, 1993).

Viable Plate Count Method

Viable plate count method adalah cara penghitungan bakteri secara tidak langsung yang dilakukan dengan menghitung koloni sel bakteri yang terdapat di media secara langsung. Tidak semua jumlah bakteri dapat dihitung. Ada juga beberapa syarat perhitungan yang harus untuk bisa dipenuhi seperti jumlah koloni tiap petridish antara 30-300 koloni, jika memang tidak ada yang memenuhi syarat, maka dipilih yang jumlahnya mendekati 300. Tidak ada koloni bakteri yang menutup lebih besar dari setengah luas petridish, koloni tersebut dikenal sebagai spreader. Koloni-koloni bakteri yang tumbuh tidak selalu berasal dari satu sel mikroorganisme karena beberapa mikroorganisme tertentu cenderung membentuk kelompok atau berantai. Berdasarkan hal tersebut digunakan, maka biasa disebut dengan istilah Koloni Forming Units (CFU's) per ml (Fardiaz, 1993).

Prinsip dari metode hitungan cawan adalah menumbuhkan sel-sel bakteri yang masih hidup dan tumbuh pada media agar, sehingga sel bakteri tersebut akan bisa untuk tumbuh dan juga berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dengan menggunakan mata tanpa menggunakan mikroskop. Metode hitung cawan ini dapat dibedakan atas dua cara yaitu: cara pertama yaitu metode tuang (pour plate) dan cara kedua yaitu dengan menggunakan metode permukaan/sebar atau biasa disebut (surface/spread plate) (Volk, 1989).

Pengenceran

Pengenceran merupakan suatu cara yang dilakukan untuk mengurangi kepadatan atau sebaran bakteri yang terdapat disuatu media. Pada metode perhitungan cawan dilakukan suatu pengenceran yang juga bertingkat yang ditujukan untuk membentuk konsentrasi dari suatu suspensi bakteri. Sampel yang telah di encerkan ini di hitung ke dalam cawan baru dan kemudian di tuang kedalam mediumnya (metode tuang). Kemudian setelah diinkubasi selama waktu 24-48 jam, amati koloni yang tumbuh dan koloni yang diamati hanyalah koloni yang berjumlah 25- 250 koloni (Pelczar, J, 1986).

Prinsip pengenceran bakteri adalah untuk menurunkan jumlah bakteri, sehingga semakin banyak jumlah pengenceran yang dilakukan, makin sedikit sedikit jumlah suatu bakteri, dimana suatu saat didapat hanya satu bakteri pada satu tabung. Inkubasi dilakukan selama 2x24 jam ,karena jumlah bakteri maksimal yang dapat dihitung. Selama masa inkubasi, sel yang masih hidup akan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung oleh mata (Dwidjoseputro, 1978).

Perbandingan jumlah bakteri dari hasil pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan suatu pengenceran yang sebelumnya, jika sama atau lebih kecil dari 2 hasilnya dirata-rata, tetapi jika lebih besar dari 2 yang dipakai jumlah mikrobial dari hasil pengenceran yang sebelumnya. Jika dengan ulangan setelah memenuhi syarat maka hasilnya juga dirata-rata (Schlegel, 1994).

Turbidimetri

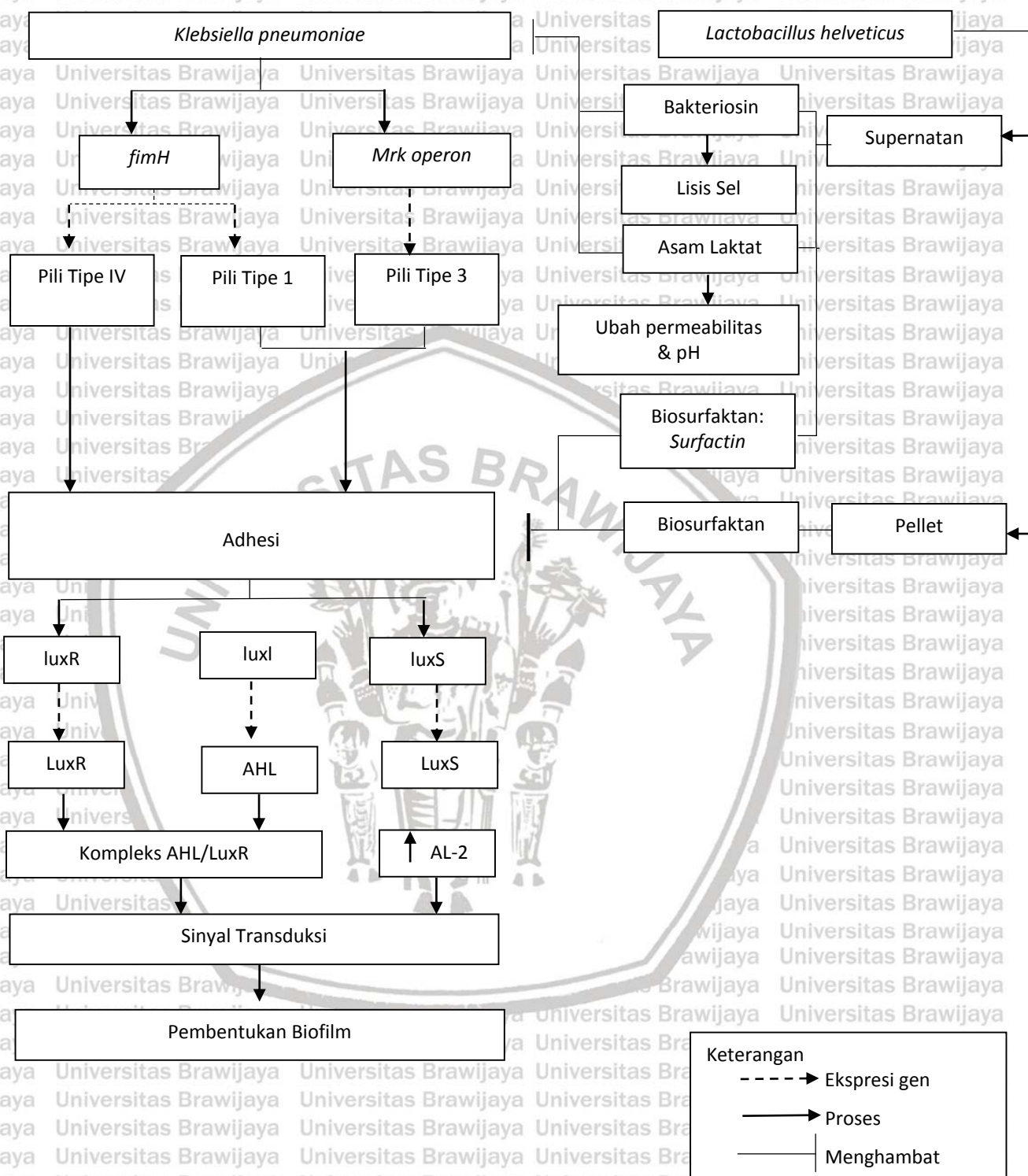
Bakteri yang berada didalam suatu bahan cair (media) dapat dihitung dan diketahui kepadatannya berdasarkan kekeruhannya. Pertumbuhan sel-sel bakteri didalam suatu media , maka akan meningkatkan kekeruhan suatu media, hal itu akan mempengaruhi jumlah sinar-sinar yang juga dapat ditransmisikan untuk juga

menembus medium, untuk menghitung koloni bakteri tersebut ,digunakan alat yang bernama “spektrofotometer”. Fungsi dari alat spektrofotometer ini adalah untuk mengukur transmitans atau absorbans dari suatu contoh yang dinyatakan dalam fungsi panjang gelombang (Brady, 1999).

Metode analisa spektrofotometer ini didasarkan kepada kekeruhan yang ditimbulkan oleh koloni bakteri yang tumbuh dan berkembang di suatu media. Prinsip kerja yang terdapat pada alat spektrofotometer ini adalah apabila ada cahaya (monokromatik maupun campuran) jatuh pada suatu medium yang homogen,dan sebagian dari sinar masuk akan dipantulkan, sebagian di serap dalam medium itu, dan sisanya diteruskan. Nilai yang keluar dari cahaya yang diteruskan dinyatakan dalam nilai absorbansi karena memiliki hubungan dengan konsentrasi sampel. Studi tentang spektrofotometri biasa dianggap juga sebagai perluasan suatu pemeriksaan visual yang lebih mendalam dari absorpsi energi (Gibsen, 1996).



2.7 Kerangka Teori



Gambar 2.11 Kerangka Teori

Proses pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae* diawali dengan ekspresi sejumlah kelompok gen seperti *fimH* dan *mrk* operon family untuk memproduksi protein pili tipe 1, 3 dan IV. Protein pili tipe tersebut bertanggung jawab pada proses perlekatan sel *Klebsiella pneumoniae* pada permukaan substrat. Proses perlekatan tersebut merupakan tahap awal pembentukan biofilm. Setelah berhasil menempel pada suatu permukaan, bakteri *Klebsiella pneumoniae* akan bermultiplikasi dan menciptakan suatu lingkungan tumbuh yang sesuai hingga membentuk *microcolony*. Pada tahapan ini bakteri berkomunikasi melalui suatu sistem yang disebut dengan *Quorum Sensing* (QS). QS melibatkan molekul intermediet yang disebut dengan *autoinducer* (AI). Berdasarkan molekul AI yang diproduksinya, mekanisme QS pada *Klebsiella pneumoniae* terdiri dari QS tipe-I dan QS tipe-II.

Pada QS tipe-I, AHL diproduksi oleh enzim AHL-synthase yang dikode oleh gen *luxI*. AHL yang berhasil disintesis kemudian ditangkap oleh LuxR, suatu protein reseptor yang produksinya dikode oleh gen *luxR*. AHL dan LuxR membentuk senyawa kompleks AHL/LuxR yang bekerja sebagai respon element untuk mempengaruhi perubahan tingkat seluler bakteri. Sedangkan pada QS tipe-II, molekul AI-2 disintesis dengan bantuan enzim LuxS, suatu protein produk transkripsi gen *luxS* sehingga mempengaruhi perubahan tingkat seluler bakteri. Kedua sistem QS tersebut berperan dalam proses transduksi sinyal untuk mempengaruhi respon tingkat seluler melalui ekspresi gen-gen yang bertanggung jawab pada pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae*, salah satunya adalah gen *lux* pengkode EPS.

Lactobacillus helveticus tergolong dalam kelompok BAL yang diketahui mampu menghambat pembentukan biofilm bakteri pathogen. Sel bakteri asam laktat mampu mensintesa biosurfaktan sebagai peptida aktif yang berpotensi sebagai bahan anti-adhesive untuk mencegah perlekatan bakteri pathogen pada

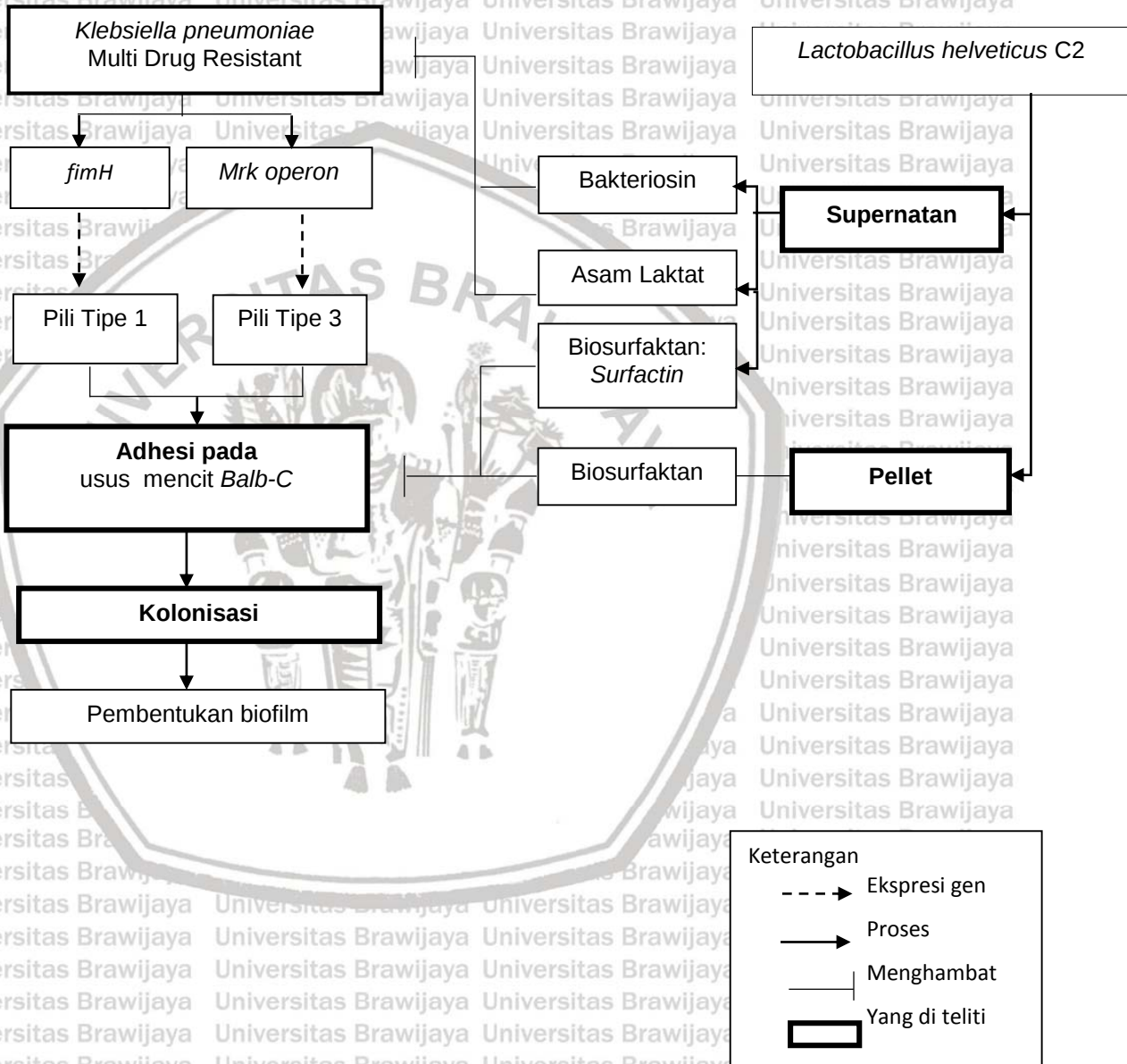
suatu substrat (Rodrigues *et al.*, 2006). Selain itu zat aktif bakteriosin yang terkandung dalam supernatan bakteri asam laktat dapat menyebabkan lisis sel dengan cara membentuk pori dan menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* (Da Silva Sabo, *et al.*, 2014). Asam organik seperti asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat mampu merubah permeabilitas membran luar *Klebsiella pneumoniae* yang tidak dapat dilalui bakteriosin dan antibiotik hidrofobik untuk menghambat viabilitas bakteri tersebut, serta merubah pH lingkungan sehingga mencegah pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* (Alakomi, *et al.*, 2000).



BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.2 Kerangka Konsep Penelitian

Klebsiella pneumoniae merupakan bagian dari flora normal yang menghuni intestin. Namun, *Klebsiella pneumoniae* dapat menjadi patogen jika mekanisme pertahanan tubuh menurun. Selain itu, *Klebsiella pneumoniae* diketahui sebagai penyebab infeksi pada manusia. Infeksi *Klebsiella pneumoniae* sebagian besar diawali oleh kolonisasi di saluran pencernaan yang melibatkan ekspresi gen *Mrk operon* untuk memproduksi protein pili tipe 3 dan ekspresi gen *fimH* untuk memproduksi protein pili tipe 1. Kedua protein pili bertanggung jawab pada proses perlekatan sel *Klebsiella pneumoniae* MDR di permukaan usus halus mencit *Balb-C*. Proses perlekatan tersebut merupakan tahap awal pembentukan biofilm.

Setelah berhasil menempel pada usus halus mencit *Balb-C*, bakteri *Klebsiella pneumoniae* akan bermultiplikasi dan menciptakan suatu lingkungan tumbuh yang sesuai hingga membentuk microcolony. Pada tahapan ini bakteri berkomunikasi melalui suatu sistem yang disebut dengan QS. QS tersebut berperan dalam proses transduksi sinyal untuk mempengaruhi respon tingkat seluler melalui ekspresi gen-gen *lux* yang bertanggung jawab pada pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae*.

Lactobacillus helveticus C2 merupakan BAL yang mampu menghambat pertumbuhan, adhesi dan kolonisasi *Klebsiella pneumoniae*. *Lactobacillus helveticus* C2 mensintesa biosurfaktan sebagai bahan antiadhesi yang secara kompetitif menghambat perlekatan bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada kolonisasi usus halus mencit *Balb-C* dan akan mempengaruhi proses pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae*.

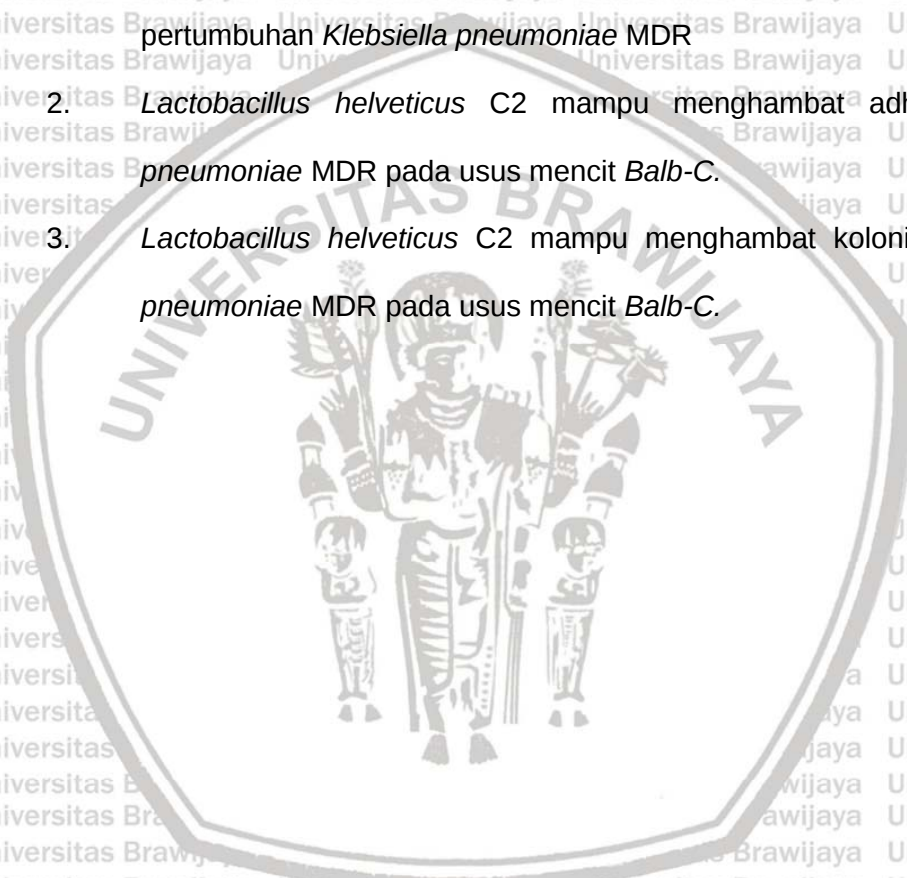
Selain itu zat aktif bakteriosin yang terkandung dalam supernatan bakteri asam laktat dapat menyebabkan lisis sel dengan cara membentuk pori dan menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*. Asam organik seperti asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat mampu merubah permeabilitas membran luar *Klebsiella pneumoniae* yang tidak dapat dilalui bakteriosin dan

antibiotik hidrofobik untuk menghambat viabilitas bakteri tersebut, serta merubah pH lingkungan sehingga mencegah pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*.

3.3 Hipotesis

Isolat *Lactobacillus helveticus* C2 dapat menghambat pertumbuhan, adhesi dan kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada usus mencit *Balb-C*.

1. Aktivitas anti bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 mampu menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* MDR
2. *Lactobacillus helveticus* C2 mampu menghambat adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada usus mencit *Balb-C*.
3. *Lactobacillus helveticus* C2 mampu menghambat kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada usus mencit *Balb-C*.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian analitik dan eksperimental.

Desain penelitian analitik digunakan untuk menguji kemampuan *Lactobacillus helveticus* C2 dalam menghambat adhesi dan kolonisasi *Klebsiella pneumoniae*

MDR. Penelitian eksperimental dengan *Randomized Posttest-Only Control Group*

Design digunakan untuk menguji kemampuan inhibisi *Lactobacillus helveticus* C2

terhadap adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada enterosit mencit *Balb-C*.

Penelitian yang dilakukan secara keseluruhan termasuk dalam penelitian eksperimental laboratorik.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Uji aktivitas antibakteri *Lactobacillus helveticus* C2 serta uji hambatan adhesi dan kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR dilakukan di Laboratorium

Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium

Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian dilakukan dari bulan Juli 2019 sampai dengan bulan September 2019.

4.3 Sampel dan Instrumen Penelitian

4.3.1 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR dan Bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 yang diisolasi dari grain kefir susu kambing pada panel sebelumnya (Raras et al., 2018).

4.3.2 Instrumen Penelitian

Pembagian kelompok perlakuan uji kolonisasi usus mencit *Balb-C* dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Kelompok perlakuan uji kolonisasi usus mencit *Balb-C*

Hari	Kelompok			
	<u>A</u> (Kontrol +): PBS	<u>B</u> (Pellet <i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i>)	<u>C</u> (CFS <i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i>)	<u>D</u> (Kontrol -)
1	Air minum + streptomisin	Air minum + streptomisin	Air minum + streptomisin	Air minum + streptomisin
2	Air minum + streptomisin	Air minum + streptomisin	Air minum + streptomisin	Air minum + streptomisin
3	Kpn 200uL	Kpn 200uL	Kpn 200uL	-
	Ambil Feses			
4	PBS 200uL	Pellet 200uL	CFS 200uL	-
	Ambil Feses			
5	PBS 200uL	Pellet 200uL	CFS 200uL	-
	Ambil Feses			
6	PBS 200uL	Pellet 200uL	CFS 200uL	-
	Ambil Feses			
7	PBS 200uL	Pellet 200uL	CFS 200uL	-
	Ambil Feses			
8	PBS 200uL	Pellet 200uL	CFS 200uL	-
	Ambil Feses			
9	Ambil Usus			

4.4 Definisi Operasional

4.4.1 *Klebsiella pneumoniae* MDR

Klebsiella pneumoniae MDR dalam penelitian ini merupakan bakteri Gram Negatif, nonmotil, memiliki kapsul, berbentuk batang dan resisten terhadap antibiotik ampicillin, sulbactam, cefazolin, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam, ciprofloxacin dan trimethoprim. Namun masih sensitif terhadap

antibiotik gentamicin, ertapenem, meropenem, amikacin, tigecycline, nitrofurantoin dan piperacillin/tazobactam.

4.4.2 *Lactobacillus helveticus* C2

Isolat *Lactobacillus helveticus* C2 yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari grain kefir susu kambing etawa pada penelitian sebelumnya (Raras *et al.*, 2018).

4.4.3 Mencit *Balb-C*

Mencit *Balb-C* yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mencit *Balb-C* jantan berusia 6 minggu.

4.4.4 Enterosit Mencit *Balb-C*

Enterosit mencit *Balb-C* diisolasi dari usus halus mencit *Balb-C*, dilakukan pewarnaan dan diamati dibawah mikroskop. Pengamatan enterosit mencit dibawah mikroskop akan terlihat seperti awan dengan warna ungu muda.

4.4.5 Uji Adhesi

uji adhesi dilakukan dengan menyalut protein pili dan protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2 pada sel enterosit dengan harapan dapat bereaksi dengan reseptor yang sesuai sehingga menghambat perlekatan sel bakteri.

4.4.6 Indeks Adhesi

Indeks adhesi adalah jumlah rerata bakteri yang menempel pada enterosit, dihitung untuk setiap pengamatan terhadap 100 enterosit dengan melakukan pewarnaan gram dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x (Santoso, 2002; Winarsih *et al.*, 1997).

4.4.7 Fimbrial Adhesin (FA)

Fimbrial adhesin adalah protein fimbriae/pili yang memperantarai perlekatan bakteri pada sel enterosit.

4.4.8 Afimbrial Adhesin (AFA)

Afimbrial adhesin adalah protein OMP yang memperantarai perlekatan bakteri pada sel enterosit.

4.4.9 Aktivitas Antibakteri

Kemampuan *Lactobacillus helveticus* C2 dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR yang dibandingkan dengan kontrol negatif.

4.4.10 Zona Hambat

Daerah jernih atau zona bening di sekitar lubang sumuran yang telah diberi perlakuan *Lactobacillus helveticus* C2 yang menandakan tidak terdapat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* MDR dan dinyatakan dalam milimeter (mm)

4.4.11 Uji Kolonisasi

Uji kolonisasi dilakukan secara in vivo menggunakan mencit *Balb-C* yang dipapar dengan bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR dan diinduksi bakteri *Lactobacillus helveticus* C2, feses dan usus mencit *Balb-C* dikultur pada media MacConkey Agar dan dihitung jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR yang tumbuh.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat dan Bahan Pembuatan Stok Kultur *Lactobacillus helveticus* C2

Alat: tabung reaksi, ose, inkubator CO₂, *laboratory autoclave*, *Laminar Airflow Biological Safety Cabinet (BSC)*, Mikropipet, tip, spektrofotometer lemari pendingin, tabung reaksi dan *Cryotube*.

Bahan: Kultur *Lactobacillus helveticus* C2, media De Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS-b), milk yeast extract (MYE) dan gliserol 10%.

4.5.2 Alat dan bahan Penyiapan Suspensi *Lactobacillus helveticus* C2

Alat: inkubator CO₂, *laboratory autoclave*, *Biological Safety Cabinet* (BSC), tabung reaksi, Mikropipet beserta tip.

Bahan: Kultur *Lactobacillus helveticus* C2, media De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS-a) dan media De Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS-b).

4.5.3 Alat dan Bahan Reidentifikasi *Lactobacillus helveticus* C2

Alat: ose, bunsen, preparat, kaca penutup, mikroskop.

Bahan: isolat bakteri *Lactobacillus helveticus* C2, kristal violet, air, lugol, alkohol 96%, safranin

4.5.4 Alat dan Bahan Pembuatan Stok Kultur *Klebsiella pneumoniae* MDR

Alat: tabung reaksi, ose, inkubator, *laboratory autoclave*, *Laminar Airflow* *Biological Safety Cabinet* (BSC), Mikropipet, tip, spektrofotometer, lemari pendingin, dan *Cryotube*.

Bahan: Kultur *Klebsiella pneumoniae* MDR, media cair Luria Bertani borth (LB-b), dan gliserol 10%.

4.5.5 Alat dan Bahan Penyiapan Suspensi *Klebsiella pneumoniae* MDR

Alat: spektrofotometer, ose, inkubator, *laboratory autoclave*, *Biological Safety Cabinet* (BSC), tabung reaksi.

Bahan: kultur *Klebsiella pneumoniae* MDR, Luria Bertani agar (LB-a), dan Luria Bertani borth (LB-b).

4.5.6 Alat dan Bahan Reidentifikasi *Klebsiella pneumoniae*

Alat: ose, bunsen, preparat, kaca penutup, mikroskop.

Bahan: isolat bakteri *Klebsiella pneumoniae*, kristal violet, air, lugol, alkohol 96%, safranin.

4.5.7 Alat dan Bahan Uji Aktivitas Anti Bakteri *Lactobacillus helveticus* C2

Alat: ose, bunsen, cawan petri, inkubator CO₂.

Bahan: kultur *Klebsiella pneumoniae* MDR, kultur *Lactobacillus helveticus* C2, Luria Bertani agar (LB-a), dan Luria Bertani broth (LB-b), media De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS-a) dan media De Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS-b) dan media Muller-Hinton agar.

4.5.8 Alat dan Bahan Isolasi Pili dan OMP *Lactobacillus helveticus* C2

Alat: *laboratory autoclave*, *Biological Safety Cabinet (BSC)*, tabung reaksi, pili cutter, vortex, tube, sentrifugator.

Bahan: biakan bakteri *Lactobacillus helveticus* C2, *tricoleric acid* (TCA), PBS pH 7,4 dan media De Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS-b), chaps.

4.5.9 Alat dan Bahan Isolasi Enterosit Mencit *Balb-C*

Alat: tabung reaksi, cawan petri, gunting, inkubator shaker, sentrifugator, mikropipet dan tip, tabung dan leucocyte counting chamber.

Bahan: Mencit *Balb-C*, kloroform dan larutan PBS.

4.5.10 Alat dan Bahan Uji Adhesi *Lactobacillus helveticus* C2 pada Enterosit Mencit *Balb-C*

Mencit *Balb-C*

5 Alat: inkubator shaker, sentrifugator, tabung reaksi, cawan petri, preparat.

6 Bahan: suspensi *Lactobacillus helveticus* C2, sel enterocyte.

4.5.11 Alat dan Bahan Uji Hambatan *Lactobacillus helveticus* C2 Terhadap Adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada Enterosit Mencit *Balb-C*

7 Alat: inkubator shaker, sentrifugator, tabung reaksi, cawan petri, preparat.

8 Bahan: suspensi *Lactobacillus helveticus* C2, suspensi *Klebsiella pneumoniae* MDR, sel enterocyte.

4.5.12 Alat dan Bahan Pewarnaan Gram

Alat: kaca benda, kaca penutup, mikroskop

Bahan: kristal violet, air, lugol, alkohol 96%, safranin.

4.5.13 Alat dan Bahan Uji Kolonisasi Usus Mencit *Balb-C*

Alat: tabung reaksi, cawan petri, endof, miropipet dan tip.

Bahan: Mencit *Balb-C* jantan berusia 6 minggu, suspensi *Klebsiella pneumoniae* MDR, pellet *Lactobacillus helveticus* C2, PBS, saline, streptomisin, spektinomisin dan LB.

4.5.14 Alat dan Bahan Uji Adhesi Mukosa Usus Mencit *Balb-C*

Alat: Satu set alat bedah, tabung reaksi, cawan petri, endof, miropipet dan tip.

Bahan: Mencit *Balb-C* jantan berusia 6 minggu, suspensi *Klebsiella pneumoniae* MDR, pellet *Lactobacillus helveticus* C2, PBS, saline, streptomisin, spektinomisin dan LB.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Pembuatan Stock Culture *Lactobacillus helveticus* C2

Media stock culture *Lactobacillus helveticus* C2 adalah *milk yeast extract* (MYE). MYE mengandung komposisi 10% susu skim, 15% glukosa, dan 0.5% *yeast extract* (Maldonado *et al.*, 2007). MYE dibuat dengan melarutkan 10 gram susu skim dan 0,5 gram *yeast extract* ke dalam 80 ml H₂O dalam tabung erlenmeyer. Larutan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, 15psi.

Glukosa sebanyak 15 gram ditimbang dan dilarutkan dengan 20 ml aquadest dalam tabung erlenmeyer secara terpisah, kemudian dipanaskan hingga larut.

Larutan glukosa yang telah larut difiltrasi menggunakan mikrofilter, kemudian dicampurkan ke dalam larutan susu skim dan *yeast extract* steril. Proses pencampuran dilakukan secara aseptis di dalam *Biological Safety Cabinet* (BSC).

Setelah homogen, sejumlah 1 ml MYE dimasukkan ke dalam *microtube* steril dan diberi tanda.

Isolat *Lactobacillus helveticus* C2 dalam media agar MRS diinokulasi ke dalam 3 ml MYE. *Microtube* diinkubasi dalam kondisi mikroaerofilik pada suhu 37°C selama satu malam. Sebanyak 1 ml *overnight culture* *Lactobacillus helveticus* C2 dipindahkan ke dalam *cryotube* volume 2 ml kemudian ditambahkan 1 ml gliserol 10% sehingga diperoleh konsentrasi akhir gliserol 5%. *Stock culture* *Lactobacillus helveticus* C2 disimpan pada suhu -20°C untuk keperluan penelitian berikutnya.

4.6.2 Penyiapan Suspensi *Lactobacillus helveticus* C2

Isolat *Lactobacillus helveticus* C2 dari *stock culture* MYE diinokulasi dalam tabung reaksi berisi 3ml media cair MRS kemudian diinkubasi selama 16 jam dalam kondisi mikroaerofilik pada suhu 37°C. Proses selanjutnya subkultur *Lactobacillus helveticus* C2 disentrifugasi pada 12.000 rpm 15 menit untuk memisahkan s dengan pellet BAL (Maldonado et al., 2007).

4.6.3 Reidentifikasi *Lactobacillus helveticus* C2

Isolat *Lactobacillus helveticus* dari media agar diinokulasi ke preparat kemudian dilakukan pewarnaan gram, selanjutnya diamati dengan mikroskop dengan pembesaran 1000 kali. Dilakukan identifikasi dengan cara mencocokkan pengamatan dengan gambar pewarnaan gram *Lactobacillus helveticus* pada teori. *Lactobacillus helveticus* merupakan bakteri gram positif yang akan berwarna biru/ungu ketika diamati.

4.6.4 Pembuatan Stock Kultur *Klebsiella pneumoniae* MDR

Isolat *Klebsiella pneumoniae* MDR ditumbuhkan dalam media cair *brain heart infusion* (BHI). Sebanyak 5 ml media cair BHI steril dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Isolat *Klebsiella pneumoniae* MDR dari media agar diinokulasi ke dalam media cair BHI kemudian diinkubasi pada suhu 37°C hingga dicapai nilai

OD pada 630 nm (OD_{630}) sebesar ~0,5. Sebanyak 1 ml *overnight culture Klebsiella pneumoniae* MDR dipindahkan ke dalam *cryotube* volume 2 ml dan ditambahkan sejumlah 1 ml gliserol 10% sehingga diperoleh konsentrasi akhir gliserol 5%. *Stock culture Klebsiella pneumoniae* MDR disimpan dalam lemari es pada suhu -20°C (Maldonado *et al.*, 2007).

4.6.5 Penyiapan Suspensi *Klebsiella pneumoniae* MDR

Satu ose kultur *Klebsiella pneumoniae* MDR diinokulasikan ke dalam 10 ml media LB-b, kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Kepadatan bakteri diukur menggunakan spektrofotometer pada 540 nm hingga diperoleh nilai OD 0,56-0,64 (setara 2×10^7 - 2×10^8 CFU/ml).

4.6.6 Reidentifikasi *Klebsiella pneumoniae*

Isolat *Klebsiella pneumoniae* dari media agar diinokulasi ke preparat kemudian dilakukan pewarnaan gram, selanjutnya diamati dengan mikroskop dengan pembesaran 1000 kali. Dilakukan identifikasi dengan cara mencocokkan pengamatan dengan gambar pewarnaan gram *Klebsiella pneumoniae* pada teori. *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri gram negatif yang akan berwarna merah ketika diamati.

4.6.7 Uji Aktivitas Anti Bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 Terhadap Bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR

Aktivitas antibakteri pelet *Lactobacillus helveticus* C2 dilakukan dengan metode overlay agar ganda (Aween *et al.*, 2012; Debashis dan Shyamapada *et al.*, 2016) terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR. Inokulasi pelet *Lactobacillus helveticus* C2 dalam sumur (diameter ≈6 mm) pada media MRS agar dan inkubasi dalam kondisi mikroaerofilik pada suhu 37°C selama 24 jam. Media MRS agar yang mengandung pertumbuhan *Lactobacillus helveticus* C2 dalam sumur kemudian dilapisi dengan media Muller-Hinton agar yang mengandung bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR (10^5 cfu/ml). Inkubasi dalam kondisi aerob pada suhu

37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi 24 jam, selanjutnya menghitung zona bening yang terbentuk. Tes dilakukan dengan dua kali pengulangan.

Aktivitas anti bakteri *Cell free supernatan* (CFS) and *neutralized* (NCFS) *Lactobacillus helveticus* C2 dilakukan dengan uji difusi sumur agar (Davoodabadi et al., 2015; Nikolova et al., 2009). *Klebsiella pneumoniae* MDR dikultur pada media luria bertani broth selama 24 jam. Inokulasi *Klebsiella pneumoniae* MDR (10^5 CFU/mL) pada media Muller-Hinton agar. Sementara isolat *Lactobacillus helveticus* C2 ditanam dalam MRS broth selama 24 jam. CFS *Lactobacillus helveticus* C2 diperoleh dengan melakukan sentrifugasi pada 6.000 rpm selama 10 menit. NCFS *Lactobacillus helveticus* C2 diperoleh dengan mengubah pH CFS menjadi 6,5. Selanjutnya 100 μ L CFS maupun NCFS diinokulasi ke dalam sumur luria bertani agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona bening yang terbentuk disekitar masing-masing sumur diukur. Aktivitas antibakteri *Lactobacillus helveticus* C2 dengan zona bening kurang dari 11 mm, 11 hingga 16 mm, 17 hingga 22 mm dan lebih dari 23 mm masing-masing dikelompokkan sebagai negatif (-), ringan (+), kuat (++), dan sangat kuat (+++).

4.6.8 Metode Isolasi Pili dan OMP *Lactobacillus helveticus* C2

Isolasi yang dikerjakan merujuk seperti penelitian Ehara (1988) dengan modifikasi menggunakan pili cutter desain Sumarno (2000). Pili yang dipanen dan dikoleksi berasal dari biakan bakteri yang tumbuh pada setiap tabung. Hasil koleksi bakteri di kumpulkan dalam satu tube steril yang kemudian ditambahkan *tricoleraetic acid* (TCA) hingga konsentrasinya mencapai 3%. Vortex untuk menghomogenisasikan, kemudian koleksi bakteri diletakkan pada suhu kamar selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan sebesar 6.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Pellet hasil sentrifugasi diambil dan disuspensikan dengan PBS pH 7,4 dengan perbandingan 1:10. Selanjutnya dilakukan pemotongan dengan menggunakan *pili cutter*. Kecepatan mencukur

bakteri tersebut dilakukan secara penuh selama 30 detik pada potongan ke-satu sampai ke-tiga dengan kecepatan 6.000 rpm, sedangkan potongan ke-empat sampai ke-enam dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit dan hasil cukuran dilakukan kembali sentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C.

Dari prosedur tersebut diperoleh supernatan yang mengandung protein pili dan endapan yang merupakan bagian sel bakteri. Bagian sel tersebut selanjutnya disuspensi dengan PBS pH 7,4 dan ditambahkan *chaps* (3-[(3 Cholanidopropyl) dimethylammonio]-1- propanesulfonate hydrate) sehingga diperoleh kadar 0,5% (b/v). Vortex selama 5 menit dan sentrifugasi dingin 4°C pada 12.000 rpm selama 15 menit. Filtrat diambil, dilakukan dialisis menggunakan PBS pH 7,4 untuk menghilangkan *chaps*. Hasil dialisis merupakan protein OMP.

4.6.9 Isolasi Enterosit Mencit *Balb-C*

Isolasi Enterosit dilakukan berdasarkan metode Weisler (Nagayama *et al.*, 1995). Mencit *Balb-C* di korbakan menggunakan kloroform dan direseksi. Usus dipisahkan dari organ tubuh lain, dikeluarkan, dibersihkan dan selanjutnya dipotong menjadi 5 cm. Lumen usus kemudian direseksi dan dibersihkan dengan menggunakan larutan PBS yang mengandung dithiotreitol 1 mM. Selanjutnya, lumen direndam pada larutan yang mengandung 1,5 mM KCl; 9,6 mM NaCl; 2,7 mM Na-sitrat; 8 mM KH₂PO₄ dan 5,6 mM Na₂PO₄, pH 7,3 dan kemudian diletakan di inkubator shaker dengan suhu 37 °C selama 30 menit. Supernatan di buang dan diganti dengan PBS dengan pH 7,4 yang mengandung 1,5 mM EDTA dan 0,5 mM dithiothreitol. Jaringan usus di letakan di inkubator shaker dengan suhu 37 °C selama 20 menit. Supernatan di buang dan usus dibersihkan menggunakan PBS dengan pH 7,4, kemudian sentrifugasi pada 1000 rpm, pada suhu 4°C selama 5 menit. Pembersihan dilakukan tiga kali menggunakan PBS dengan pH 7,4 dan di shaker. Larutan yang mengandung enterosit dicirikan oleh filtrat awan, diambil

dengan menggunakan pipet steril dan disimpan pada tabung steril, dihitung menggunakan leucocyte counting chamber dan konsentrasi terdiri dari 10^8 enterocyte/mL.

4.6.10 Uji Adhesi *Lactobacillus helveticus* C2 pada Enterosit Mencit Balb-C

Sebanyak 100 μ L suspensi *Lactobacillus helveticus* C2 dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml dicampur dengan 100 μ L sel-sel enterocyte 10^8 CFU/ml.

Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada inkubator shaker dengan suhu 37°C selama 30 menit. Sentrifugasi pada 3000 rpm selama 2 menit. Endapan kemudian digunakan untuk sapuan preparat dan pewarnaan gram. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x, untuk mendapatkan jenis dan indeks adhesi (Nagayama et al.,1995).

4.6.11 Uji Hambatan *Lactobacillus helveticus* C2 Terhadap Adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada Enterosit Mencit Balb-C

Dibuat preparasi dosis pili protein *Lactobacillus helveticus* C2 masing-masing sebanyak 0 μ g (kontrol), 25 μ g, 50 μ g, 100 μ g, 200 μ g, 400 μ g dan 800 μ g dalam 300 μ L PBS dalam ependorf. Selanjutnya terhadap masing-masing ependorf di tambahkan suspensi enterosit sebanyak 300 μ L dengan konsentrasi 10^8 /ml dan digoyang perlahan pada shaking waterbath pada suhu 37°C selama 30 menit.

Kemudian ke dalam setiap campuran tersebut ditambah suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR (10^8 /ml) sebanyak 300 μ L. Campuran diinkubasi pada shaking incubator selama 30 menit pada suhu 37°C . Selanjutnya disentrifugasi 1500 rpm, pada suhu 4°C selama 3 menit, kemudian endapan dicuci 2 kali dengan PBS. Endapan diambil, dibuat hapusan pada gelas objek dan dicat dengan pewarnaan Gram. Preparat diamati dibawah mikroskop pembesaran 1000 kali, dan dihitung jumlah rerata bakteri yang menempel pada enterosit. Indeks adhesi adalah jumlah rerata bakteri yang menempel pada enterosit, dihitung untuk setiap pengamatan terhadap 100 enterosit (Santoso, 2002; Winarsih et al., 1997).

4.6.12 Pewarnaan Gram

Sediaan dari uji adhesi dan uji hambat adhesi pada kaca benda difiksasi. Kemudian preparat dituangi dengan kristal violet selama satu menit, sisa cat dibuang dan dibilas dengan air. Selanjutnya dituangi lugol selama satu menit, sisa cat dibuang dan dibilas dengan air. Preparat dituangi alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai cat luntur, kemudian dibilas dengan air. Sampel ditetesi dengan safranin selama 30 detik kemudian dibilas dengan air. Sampel dikeringkan, selanjutnya diamati dengan mikroskop dengan pembesaran 1000 kali.

4.6.13 Uji Kolonisasi Usus Mencit *Balb-C*

Uji kolonisasi usus *Klebsiella pneumoniae* dilakukan menggunakan mencit *Balb-C* jantan berusia 6 minggu. Mencit *Balb-C* diberikan streptomisin (5 g/l dalam air minum) selama 48 jam. Setelah 48 jam, mencit *Balb-C* diinokulasi intragastrik dengan 200 μ l suspensi *Klebsiella pneumoniae* MDR ($3,0 \times 10^9$ CFU/ml). Setelah 24 jam selanjutnya mencit *Balb-C* diberi 200 μ l pellet *Lactobacillus helveticus* C2 ($1,9 \times 10^9$ CFU/ml), 200 μ l CFS *Lactobacillus helveticus* C2, dan 200 μ l PBS atau BHI sebagai kontrol. Kemudian feses mencit *Balb-C* diambil pada jam yang sama setiap hari selama 5 hari. Untuk mengukur jumlah total *Klebsiella pneumoniae* MDR CFU/g feses, feses dihomogenisasi dalam 1 ml saline, dan kemudian dilakukan pengenceran serial menggunakan media selektif (mengandung 50 mg/l streptomisin, 50 mg/l spektinomisin dan LB).

4.6.14 Uji Adhesi Mukosa Usus Mencit *Balb-C*

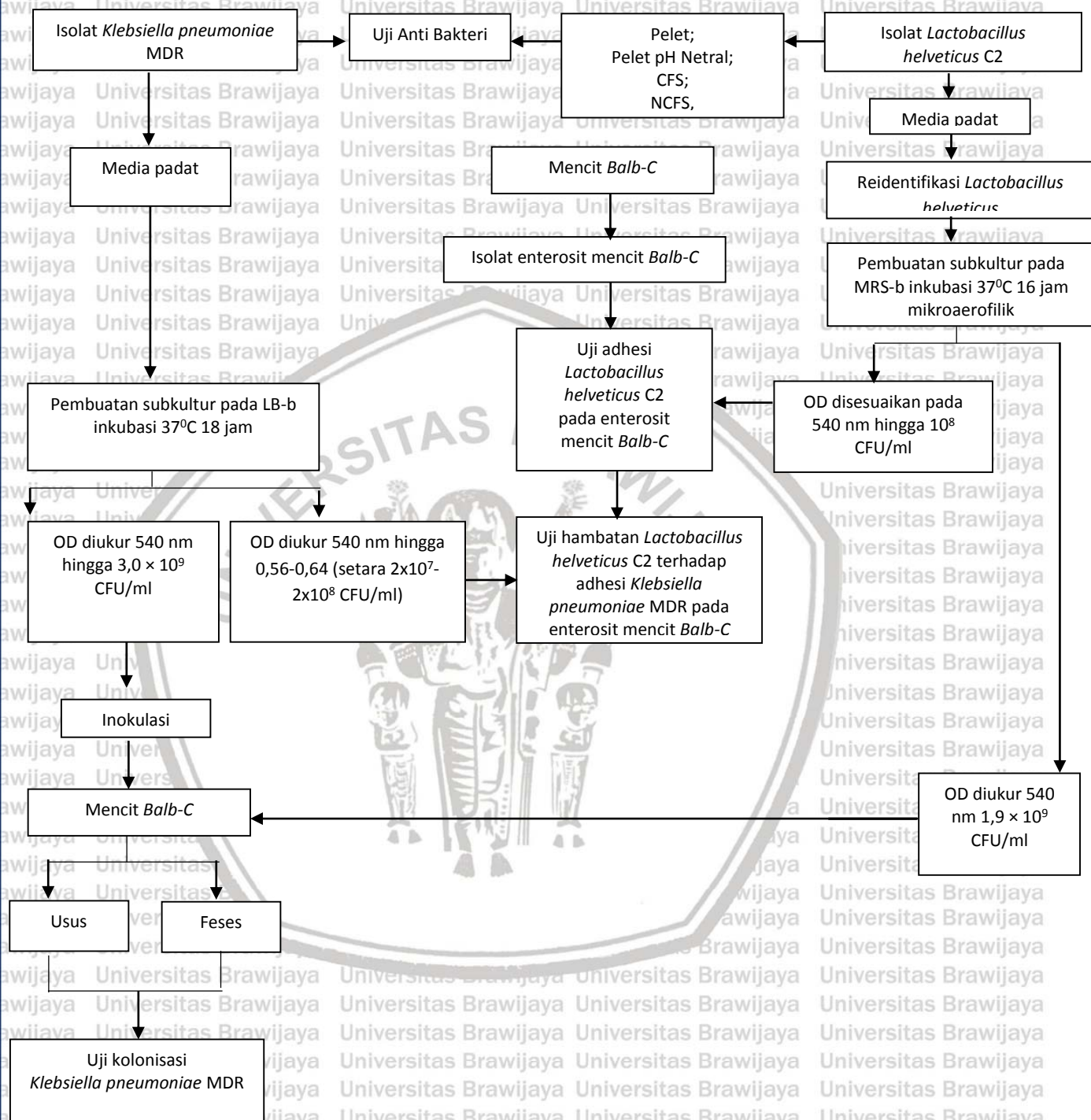
Untuk analisis adhesi mukosa, mencit-mencit *Balb-C* tersebut di korbakan pada hari ke-6, usus mencit *Balb-C* diambil dan dicuci dengan saline. Satu sentimeter panjang usus dari kolon distal ditimbang dan dihomogenisasi dalam 1 ml PBS (pH 6) untuk menentukan jumlah *Klebsiella pneumoniae* MDR yang melekat pada mukosa. Hasilnya dinyatakan dalam jumlah CFU/g jaringan (Lagrafeuille, 2017).

4.7 Analisis Statistika

Tahap pertama adalah uji normalitas data yang diperoleh dengan uji Kolmogorov-Smirnov dan homogenitas data menggunakan Levene. Untuk membuktikan apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan dengan kelompok control pada uji kolonisasi, dilakukan uji ANOVA (Dahlan, 2013). Selain itu, uji statistik antara perubahan indeks adhesi dan perubahan konsentrasi protein pili hemagglutinin, data dianalisis menggunakan analisis korelasi.



4.8 Alur Penelitian



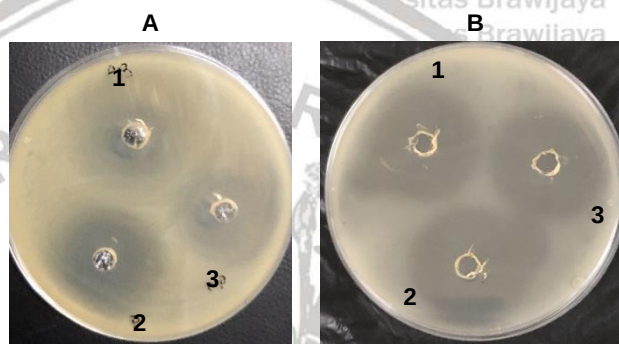
Gambar 4.1. Alur Penelitian

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Aktivitas Anti Bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 Terhadap Bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR

Penelitian ini menunjukkan adanya aktivitas anti bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR berdasarkan pengukuran diameter zona bening yang terbentuk (Gambar 5.1)



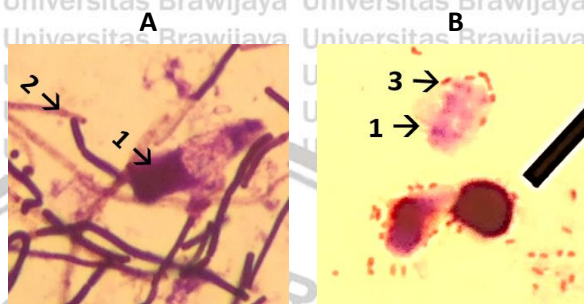
Gambar 5.1 Aktivitas anti bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR.

Antibiotik gentamicin sebagai kontrol (A1:B1) dan berbagai perlakuan *Lactobacillus helveticus* C2: pelet (A2), pelet pH netral (A3), CFS (B2) dan NCFS (B3).

Terdapat aktivitas anti bakteri yang sangat kuat pada isolat *Lactobacillus helveticus* C2 (Gambar 5.1) terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR, diamati dari diameter zona bening yang terbentuk. Diameter zona bening yang terbentuk pada perlakuan pemberian antibiotik gentamicin yaitu 44 mm (Gamar 5.1.A1 dan 5.1.B1). Pada perlakuan Pelet *Lactobacillus helveticus* C2 dan pelet *Lactobacillus helveticus* C2 dengan pH yang dinetralkan masing-masing membentuk zona bening dengan diameter sebesar 41 mm (Gamar 5.1.A2) dan 40 mm (Gamar 5.1.A3). Sementara perlakuan CFS dan NCFS *Lactobacillus helveticus* C2 masing-masing membentuk diameter zona bening 44 (Gamar 5.1.B2) dan 42 mm (Gamar 5.1.B3).

5.2 Kompetisi Adhesi Sel *Lactobacillus helveticus* C2 dan Sel *Klebsiella pneumoniae* MDR pada Enterosit Mencit BALB-C

Pertama-tama dilakukan observasi apakah bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 dan bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR dapat melakukan adhesi pada sel enterosit usus halus Mencit BALB-C.

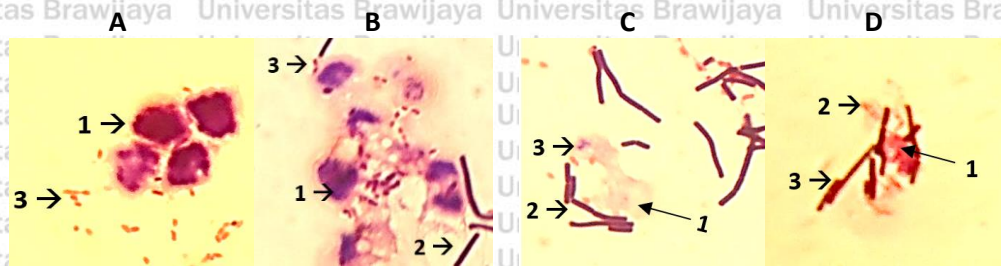


Gambar 5.2 Hasil pewarnaan gram adhesin *Lactobacillus helveticus* c2 dan bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C

Adhesin bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 (A); Adhesin bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR (B); Sel enterosit usus halus mencit BALB-C (1); Sel *Lactobacillus helveticus* C2 (2); Sel *Klebsiella pneumoniae* MDR (3). Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop merk Nikon dengan perbesaran 1000 X dan di foto menggunakan kamera iPhone 5.

Terlihat bahwa sel enterosit mencit BALB-C dikelilingi dan ditemplei oleh bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 yang berwarna ungu berbentuk batang gram positif (Gambar 5.2A) dan bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR yang berwarna merah berbentuk batang gram negatif (Gambar 5.2B).

Selanjutnya diamati apakah perlekatan sel *Lactobacillus helveticus* C2 dapat menghambat adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR. Hasil pengamatan dengan mikroskop memperlihatkan adhesi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C yang sebelumnya telah disalut sel bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 tidak terhambat (Gambar 5.3).



Gambar 5. 3 Hasil pewarnaan gram sel enterosit usus halus mencit BALB-C yang diberikan berbagai konsentrasi bakteri *Lactobacillus helveticus* dan diberikan bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR

Kontrol, sel enterosit yang diberikan sel *Klebsiella pneumoniae* MDR saja (A), dibandingkan dengan perlakuan pemberian berbagai konsentrasi sel bakteri *Lactobacillus helveticus* C2: 50 µg (B), 100 µg (C) dan 200 µg (D) tampak jelas tidak mampu menghambat adhesi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C.

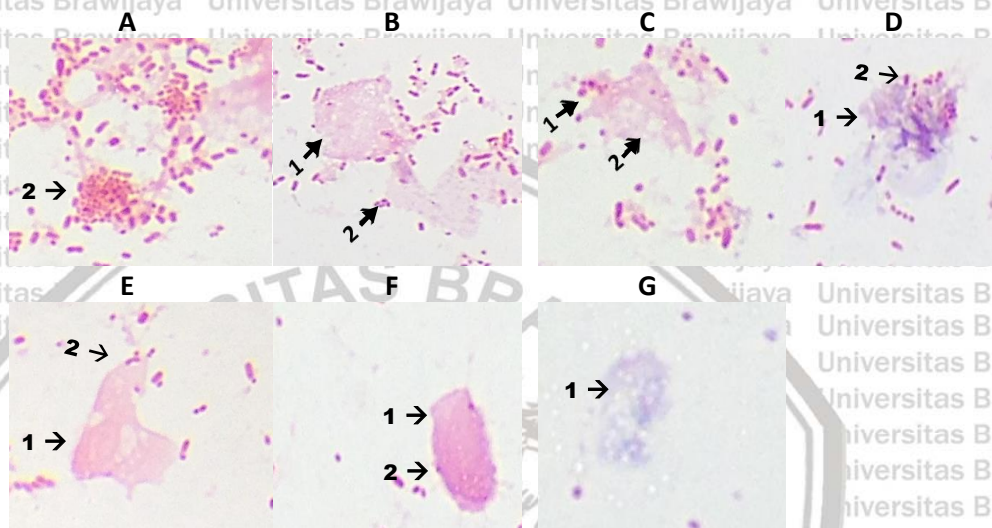
Sel enterosit usus halus mencit BALB-C (1); Sel *Lactobacillus helveticus* C2 (2); Sel *Klebsiella pneumoniae* MDR (3). Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop merk Nikon dengan perbesaran 1000 X dan di foto menggunakan kamera iPhone 5.

Uji adhesi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C yang sebelumnya telah dipapar berbagai konsentrasi sel bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 memperlihatkan bahwa dengan konsentrasi 50 µg, *Lactobacillus helveticus* C2 melekat pada sel enterosit di bagian tertentu (Gambar 5.3B). Bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR yang dipaparkan setelahnya tetap mampu melakukan perlekatan pada bagian-bagian sel enterosit yang masih kosong. Ketika konsentrasi sel bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 ditingkatkan menjadi 100 µg (Gambar 5.3C) dan 200 µg (Gambar 5.3D), tidak ada perubahan adhesi yang signifikan.

5.3 Efek Paparan Protein Pili *Lactobacillus helveticus* C2 Terhadap Adhesi Bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR pada Sel Enterosit Mencit BALB-C

Karena kompetisi langsung antara sel *Lactobacillus helveticus* C2 dan *Klebsiella pneumoniae* MDR tidak dapat dibuktikan, maka dilakukan eksperimen selanjutnya

untuk mengetahui efek penghambatan protein pili *Lactobacillus helveticus* C2 terhadap adhesi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR. Pada Gambar 5.4 tampak terjadi hambatan adhesi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit *BALB-C* yang sebelumnya telah dipapar berbagai konsentrasi protein pili *Lactobacillus helveticus* C2 yang tidak didapatkan pada kontrol.



Gambar 5.4 Hasil pewarnaan gram sel enterosit usus halus mencit *BALB-C* yang diberikan bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR saja (A) dan perlakuan pemberian berbagai konsentrasi protein pili *Lactobacillus helveticus* C2: 25 µg (B), 50 µg (C), 100 µg (D), 200 µg (E), 400 µg (F) dan 800 µg (G).

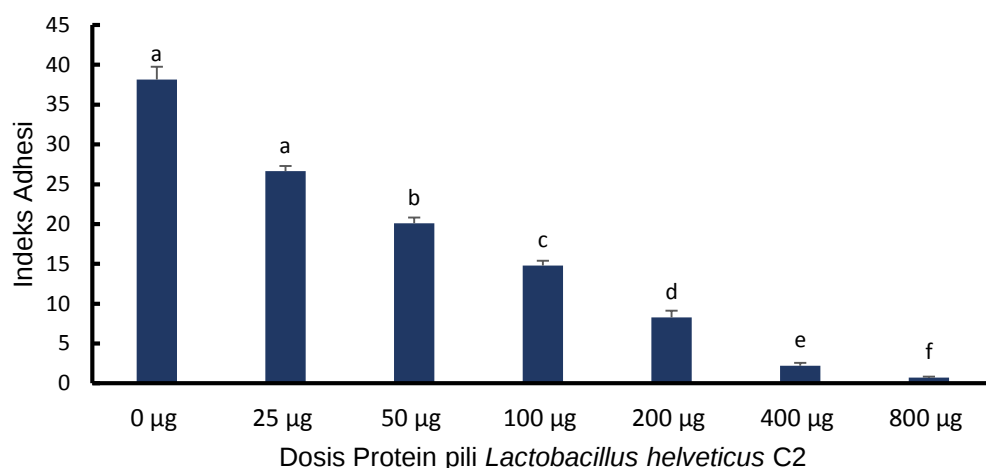
Sel enterosit usus halus mencit *BALB-C* (1); Sel *Klebsiella pneumoniae* MDR (2). Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop merk Nikon dengan perbesaran 1000 X dan di foto menggunakan kamera iPhone 5.

Protein pili *Lactobacillus helveticus* C2 mampu menghambat adhesi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR. Pada perlakuan paparan protein pili dosis 25 µg, terlihat sel enterosit usus halus mencit *BALB-C* masih banyak dikelilingi dan ditemplei oleh bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR, namun tidak sebanyak kontrol (Gambar 5.4B). Ketika dosis protein pili *Lactobacillus helveticus* C2 ditingkatkan menjadi 50 µg (Gambar 5.4C), 100 µg (Gambar 5.4D), 200 µg (Gambar 5.4E) dan 400 µg (Gambar 5.4F), bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR yang menempel pada sel enterosit tampak semakin berkurang. Sedangkan pada perlakuan paparan

protein pili dosis 800 μg (Gambar 5.4G), tampak hanya satu atau dua bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR yang menempel pada sel enterosit usus halus mencit *BALB-C*, bahkan dari 100 sel enterosit usus halus mencit *BALB-C* yang diamati, beberapa enterosit sama sekali tidak ditemplei oleh bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR.

Perhitungan nilai indeks adhesi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit *BALB-C* dari penelitian ini disajikan pada Gambar 5.5.

Sementara data lengkap dilampirkan pada Lampiran 1.



Gambar 5.5 Diagram indeks adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit *BALB-C* yang dipapar berbagai konsentrasi protein pili *Lactobacillus helveticus* C2. (Batang galat menunjukkan standar deviasi).

Analisis statistik yang pertama-tama dilakukan uji normalitas dan homogenitas sampel. Diperoleh hasil yaitu data terdistribusi normal, $df=4$, $N=7$, $P>0,05$ (Tabel 5.1 dan Lampiran 2), dan homogen, $df_1=6$, $df_2=21$, $P>0,05$ (Lampiran 2).

Tabel 5.1 Uji Statistik Normalitas Data

Dosis (µg)	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
0	.236	4	.	.942	4	.669
25	.328	4	.	.873	4	.308
50	.185	4	.	.993	4	.971
100	.187	4	.	.968	4	.827
200	.326	4	.	.870	4	.298
400	.294	4	.	.805	4	.111
800	.194	4	.	.989	4	.954

Setelah data terbukti berdistribusi normal dan homogen, karena penelitian ini dilakukan 2 ulasan maka selanjutnya dilakukan uji statistik T-Berpasangan. Uji T-Berpasangan dilakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan antara nilai indeks adhesi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR ulasan 1 dan ulasan 2. Hasil uji statistik uji T-Berpasangan dengan program SPSS menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nilai indeks adhesi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR ulasan 1 dan ulasan 2 pada perlakuan paparan dosis protein pili *Lactobacillus helveticus* C2, $t=1,001$, $df=6$, $N=7$, $P<0,05$ (Lampiran 2).

Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan pengaruh perlakuan paparan berbagai dosis protein pili *Lactobacillus helveticus* C2 terhadap nilai indeks adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C dilakukan uji statistik Anova Satu Arah. Hasil uji statistik Anova Satu Arah dengan program SPSS menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan pada perlakuan berbagai dosis protein pili *Lactobacillus helveticus* C2 terhadap nilai indeks adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR, $F=1.640E3$, $df=6$, $N=7$, $P<0,05$ (Lampiran 2).

Karena terdapat perbedaan nilai indeks adhesi yang signifikan pada perlakuan paparan berbagai dosis protein pili *Lactobacillus helveticus* C2 maka dilakukan uji lanjut yaitu uji statistik Tukey untuk mengetahui perbedaan antara masing-masing

perlakuan paparan dosis protein pili *Lactobacillus helveticus* C2 (Tabel 5.2 dan Lampiran 2).

Tabel 5.2 Uji Statistik SPSS Tukey dengan Perlakuan Paparan Berbagai Dosis Protein Pili *Lactobacillus helveticus* C2

Dosis	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
800 µg	4	.7300					
400 µg	4	2.2275					
200 µg	4		8.2725*				
100 µg	4			14.7900*			
50 µg	4				20.1100*		
25 µg	4					26.6325*	
0 µg	4						38.1600*
P		.060	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

* Terdapat perbedaan yang bermakna

Uji statistik Tukey menunjukkan bahwa perlakuan paparan berbagai dosis protein pili *Lactobacillus helveticus* C2 0 µg, 25 µg, 50 µg, 100, dan 200 µg berbeda bermakna dengan semua perlakuan. Sedangkan perlakuan dengan dosis 400 berbeda bermakna dengan dosis 0 µg, 25 µg, 50 µg, 100 µg, dan 200 µg, namun tidak berbeda bermakna dengan dosis 800 µg. Begitu pula perlakuan dengan dosis 800 berbeda bermakna dengan dosis 0 µg, 25 µg, 50 µg, 100 µg, dan 200 µg, namun tidak berbeda bermakna dengan dosis 400 µg.

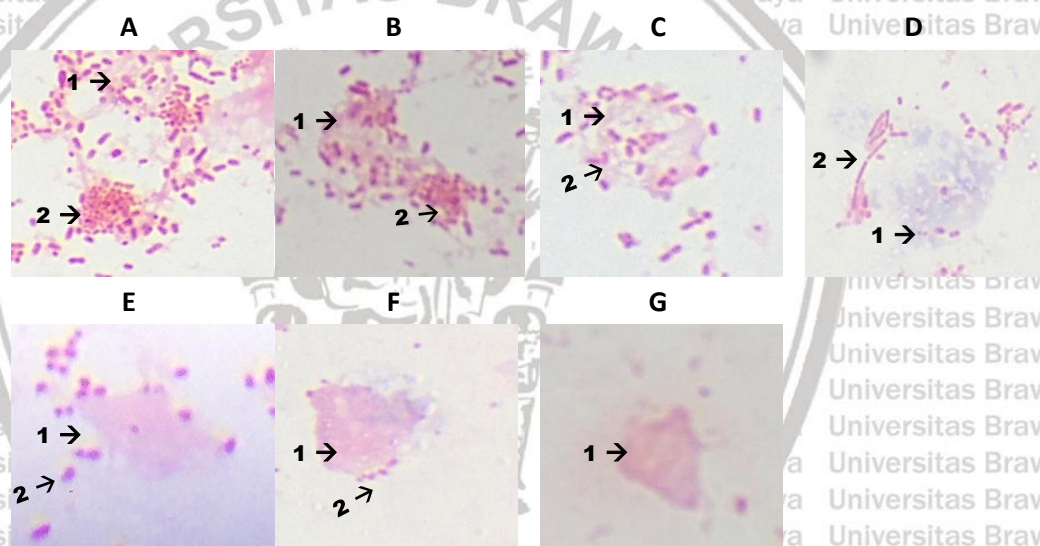
Secara umum paparan protein pili *Lactobacillus helveticus* C2 menurunkan nilai indeks adhesi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C. Terdapat hubungan yang nyata antara perlakuan pemberian dosis dengan nilai indeks adhesi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR yang di tunjukan dengan koefisien korelasi Pearson sebesar -0,983 dengan $p < 0,05$ (Lampiran 2).

Hasil uji statistik korelasi pearson menunjukkan bahwa perlakuan paparan dosis protein pili *Lactobacillus helveticus* C2 berkorelasi dengan nilai indeks adhesi dengan derajat korelasi sempurna yang berarti semakin tinggi dosis protein pili

Lactobacillus helveticus C2 maka semakin rendah indeks adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR.

5.4 Efek Paparan Protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2 Terhadap Adhesi Bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR pada Sel Enterosit Mencit BALB-C

Hambatan adhesi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit *Balb-C* dengan perlakuan paparan berbagai konsentrasi protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2 ditunjukkan pada gambar 5.6.



Gambar 5.6 Hasil pewarnaan gram sel enterosit usus halus mencit *BALB-C* yang diberikan bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR saja (A) dan perlakuan pemberian berbagai konsentrasi protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2: 25 µg (B), 50 µg (C), 100 µg (D), 200 µg (E), 400 µg (F) dan 800 µg (G).

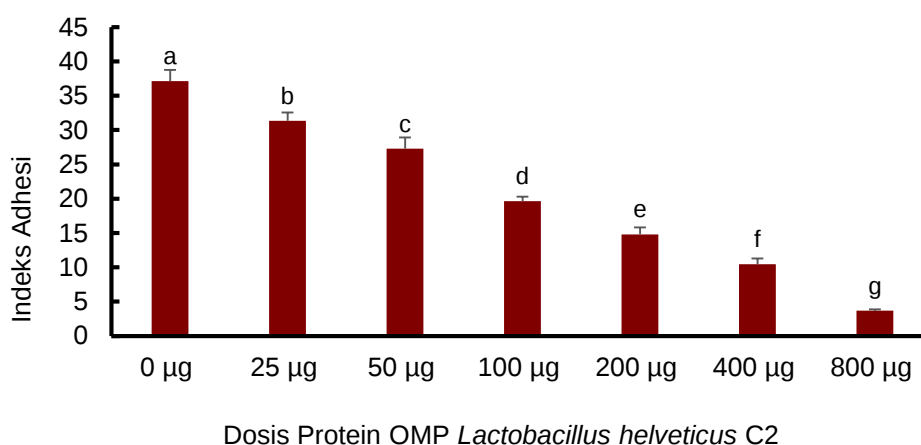
Sel enterosit usus halus mencit *BALB-C* (1); Sel *Klebsiella pneumoniae* MDR (2). Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop merk Nikon dengan perbesaran 1000 X dan di foto menggunakan kamera iPhone 5.

Protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2 mampu menghambat adhesi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR. Dengan paparan protein OMP dosis 25 µg, terlihat sel enterosit usus halus mencit *BALB-C* masih banyak dikelilingi dan ditemplei oleh

bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR, namun tidak sebanyak kontrol (Gambar 5.6B).

Selanjutnya, bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR yang menempel pada sel enterosit tampak semakin berkurang pada perlakuan paparan protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2 dosis 50 µg (Gambar 5.6C), dosis 100 µg (Gambar 5.6D), dosis 200 µg (Gambar 5.6E) dan dosis 400 µg (Gambar 5.6F), hingga pada perlakuan paparan protein OMP dosis 800 µg (Gambar 5.6G), tampak hanya satu atau dua bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR yang menempel pada sel enterosit usus halus mencit *BALB-C*.

Perhitungan nilai indeks adhesi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit *BALB-C* dari studi ini disajikan pada Gambar 5.7. Sementara data lengkap dilampirkan pada Lampiran 3.



Gambar 5.7 Diagram indeks adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit *BALB-C* yang dipapar berbagai konsentrasi protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2. (Batang galat menunjukkan standar deviasi).

Analisis statistik yang pertama-tama dilakukan uji normalitas dan homogenitas sampel. Diperoleh hasil yaitu data terdistribusi normal, $df=4$, $N=7$, $P>0,05$ (Tabel 5.3 dan Lampiran 7), dan homogen, $df_1=6$, $df_2=21$, $P>0,05$ (Lampiran 4).

Tabel 5.3 Uji Statistik Normalitas Data

Dosis (μ g)	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
0	.252	4	.	.947	4	.696
25	.247	4	.	.916	4	.516
50	.190	4	.	.978	4	.891
100	.242	4	.	.920	4	.535
200	.274	4	.	.880	4	.337
400	.342	4	.	.847	4	.215
800	.250	4	.	.903	4	.447

Pada studi ini dilakukan 2 ulasan, maka dilakukan uji statistik T-Berpasangan.

Hasil uji statistik uji T-Berpasangan menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nilai indeks adhesi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR ulasan 1 dan ulasan 2, $t=1,487$, $df=6$, $N=7$, $P<0,05$ (Lampiran 4).

Selanjutnya dilakukan uji statistik Anova Satu Arah dan diketahui bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada perlakuan berbagai dosis protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2 terhadap nilai indeks adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR, $F=632.352$, $df=6$, $N=7$, $P<0,05$ (Lampiran 4). Karena terdapat perbedaan yang signifikan, maka dilakukan uji lanjut yaitu uji statistik Tukey (Tabel 5.4 dan Lampiran 4).

Tabel 5.4 Uji Statistik SPSS Tukey dengan Perlakuan Paparan Berbagai Dosis Protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2

Dosis (μ g)	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
800	4	3.6700*						
400	4		10.4350*					
200	4			14.7975*				
100	4				19.6375*			
50	4					27.2950*		
25	4						31.3400*	
0	4							38.1600*
P		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

* Terdapat perbedaan yang bermakna

Uji statistik Tukey dengan perlakuan berbagai dosis protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2 menunjukkan bahwa perlakuan dengan dosis 0 µg, 25 µg, 50 µg, 100, dan 200 µg, 400 µg dan 800 µg berbeda bermakna pada semua perlakuan.

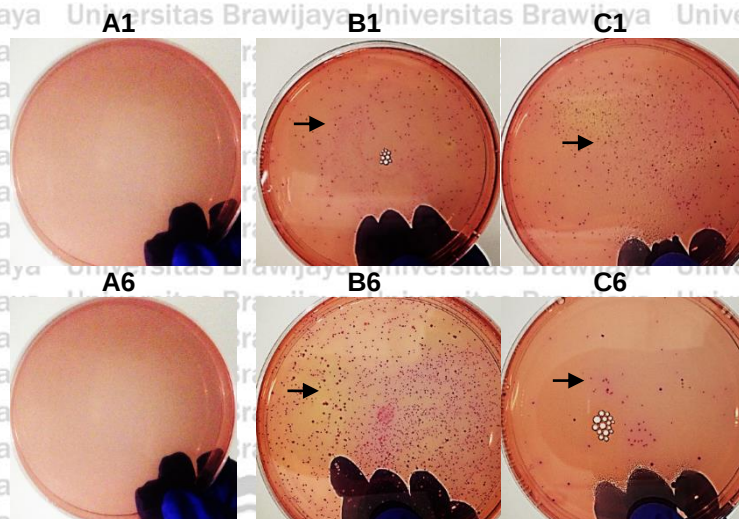
Terdapat hubungan yang nyata antara perlakuan pemberian dosis dengan nilai indeks adhesi bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR yang di tunjukan dengan koefisien korelasi Pearson sebesar -0,998 dengan $p < 0,05$ (Lampiran 4). Hasil uji statistik korelasi pearson menunjukkan bahwa perlakuan paparan dosis berkorelasi dengan nilai indeks adhesi dengan derajat korelasi sempurna yang berarti semakin tinggi dosis protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2 maka semakin rendah indeks adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR.

5.5 Pengaruh Pelet *Lactobacillus helveticus* C2 Terhadap Jumlah Koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR pada Mencit BALB-C

Untuk mengetahui apakah pelet berpengaruh secara langsung pada jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR, maka dilakukan perhitungan koloni dari feses mencit BALB-C selama 6 hari (Gambar 5.8).

Hasil biakan feses mencit BALB-C, memperlihatkan bahwa pada kontrol positif, tampak pertumbuhan koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR yang padat dari hari pertama (Gambar 5.8B1) dan semakin padat pada hari keenam (Gambar 5.8B6).

Sementara pada perlakuan mencit BALB-C yang diberikan *Klebsiella pneumoniae* MDR dan diberikan pelet *Lactobacillus helveticus* C2, hari pertama sebelum mencit BALB-C diberikan pelet *Lactobacillus helveticus* C2 tampak pertumbuhan koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR yang padat, namun pada hari keenam setelah mencit BALB-C diberikan Pelet *Lactobacillus helveticus* C2 terjadi penurunan jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR.



Gambar 5.8 Biakan feses mencit *BALB-C* pada media *MacConkey* Agar: tanpa diberikan apapun pada hari pertama (A1); mencit *BALB-C* yang diberikan *Klebsiella pneumoniae* MDR saja pada hari pertama (B1); mencit *BALB-C* yang diberikan *Klebsiella pneumoniae* MDR + pelet *Lactobacillus helveticus* C2 pada hari pertama (C1); mencit *BALB-C* tanpa diberikan apapun pada hari keenam (A6); mencit *BALB-C* yang diberikan *Klebsiella pneumoniae* MDR saja pada hari keenam (B6); mencit *BALB-C* yang diberikan *Klebsiella pneumoniae* MDR + pelet *Lactobacillus helveticus* C2 pada hari keenam (C6).

Tanda panah menunjukan koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR.

Pengaruh pelet *Lactobacillus helveticus* C2 terhadap jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR pada mencit *BALB-C* secara in vivo ini dianalisis menggunakan *Completely Randomized Design* dengan empat ulangan. Hasil rata-ratanya disajikan pada Tabel 5.5 dan disajikan secara lengkap pada Lampiran 5.

Tabel 5.5 Hasil Perhitungan Jumlah Koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR pada Feses Mencit *BALB-C* yang diberikan dengan *Klebsiella pneumoniae* MDR dan diberi pelet *Lactobacillus helveticus* C2 setiap hari

Hari	Jumlah Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> pada <i>MacConkey</i> Agar Per 1cc Homogenat Feses Mencit <i>BALB-C</i>		
	K (-)	K (+)	Pelet (200 µg)
1	0	471,75x10 ⁶	470,25x10 ⁶
2	0	498,50x10 ⁶	76,15x10 ⁶
3	0	545,25x10 ⁶	5,77x10 ⁶
4	0	690,00x10 ⁶	1,91x10 ⁶
5	0	727,50x10 ⁶	0,04x10 ⁶
6	0	877,50x10 ⁶	0,008x10 ⁶

Angka yang terdapat pada Tabel 5.5 di atas merupakan angka akhir dari hasil perhitungan jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR per lempeng MacConkey agar, per ml homogenat feses mencit BALB-C. Terdapat angka 0 pada perlakuan kontrol negatif dari hari pertama hingga hari ke enam yang menunjukkan tidak ada sama sekali pertumbuhan koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR. Sebaliknya pada perlakuan kontrol positif terdapat jutaan koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR dan terus meningkat setiap harinya. Pada perlakuan kelompok mencit BALB-C yang diberikan pelet *Lactobacillus helveticus* C2 terdapat pertumbuhan koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR namun setiap harinya berkurang setelah diberikan pelet *Lactobacillus helveticus* C2.

Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan terhadap jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR. Dilakukan uji normalitas data dan hasilnya menunjukkan data tidak berdistribusi normal, $df=24$, $N=72$, $P<0,05$ meskipun telah dilakukan transformasi data (Lampiran 6).

Karena data tidak memenuhi asumsi normalitas maka uji statistik yang di gunakan adalah uji statistik non parametrik yaitu uji Kruskal-Wallis. Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan perlakuan terhadap jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR. Uji Kruskal-Wallis memperlihatkan perbedaan yang signifikan antara perlakuan terhadap jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR, $\chi^2=61,908$, $df=3$, $N=72$, $P<0,05$ (Lampiran 6).

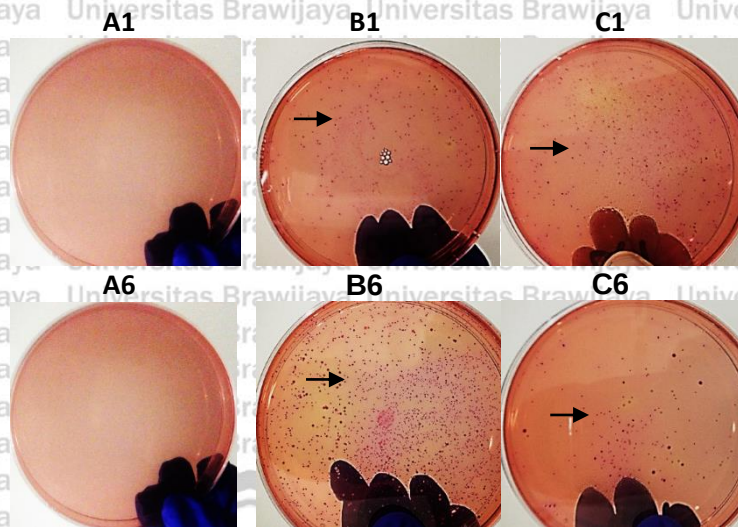
Selanjutnya dilakukan uji statistik Tukey non parametrik karena terdapat perbedaan yang signifikan perlakuan terhadap jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR. Uji statistik Tukey non parametrik ini dilakukan sebagai uji lanjutan untuk mengetahui perbedaan antara masing-masing perlakuan (Lampiran 6). Diketahui perlakuan kelompok mencit BALB-C kontrol negatif tidak berbeda bermakna dengan perlakuan kelompok mencit BALB-C yang diberikan pelet *Lactobacillus helveticus* C2, namun berbeda bermakna dengan perlakuan

kelompok mencit *BALB-C* kontrol positif. Perlakuan kelompok mencit *BALB-C* yang diberikan pelet *Lactobacillus helveticus* C2 tidak berbeda bermakna dengan perlakuan kontrol negatif, namun berbeda bermakna dengan perlakuan kelompok mencit *BALB-C* kontrol positif. Sementara perlakuan kelompok mencit *BALB-C* kontrol positif berbeda bermakna dengan semua perlakuan.

Selanjutnya dilakukan pula uji statistik non parametrik Kruskal-Wallis untuk mengetahui apakah terdapat perubahan yang signifikan pada perlakuan tiap kelompok mencit *BALB-C* terhadap jumlah pertumbuhan koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR dari hari pertama hingga hari ke enam. Adapun hasil uji statistik untuk perlakuan kelompok mencit *BALB-C* kontrol positif: $\chi^2=5.382$, $df=5$, $N=4$, $P>0,05$ (Lampiran 6), mengindikasikan bahwa tidak terdapat perubahan yang signifikan terhadap jumlah pertumbuhan koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR dari hari pertama hingga hari ke enam. Sementara perlakuan kelompok mencit *BALB-C* yang diberikan pelet *Lactobacillus helveticus* C2: $\chi^2=21,790$, $df=5$, $N=4$, $P<0,05$ (Lampiran 6) menunjukkan bahwa terdapat perubahan yang signifikan terhadap jumlah pertumbuhan koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR dari hari pertama hingga hari ke enam. Untuk perlakuan kelompok mencit *BALB-C* kontrol negatif tidak dilakukan uji statistik karena tidak ada pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* MDR sejak hari pertama hingga hari ke enam.

5.6 Pengaruh Cell Free Supernatan (CFS) *Lactobacillus helveticus* C2 Terhadap Jumlah Koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR pada Mencit *BALB-C*

Untuk membuktikan CFS berpengaruh secara langsung pada jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR, maka dilakukan perhitungan koloni dari feses mencit *BALB-C* selama 6 hari (Gambar 5.9).



Gambar 5.9 Biakan feses mencit *BALB-C* pada media *MacConkey Agar*: tanpa diberikan apapun pada hari pertama (A1); mencit *BALB-C* yang diberikan *Klebsiella pneumoniae* MDR saja pada hari pertama (B1); mencit *BALB-C* yang diberikan *Klebsiella pneumoniae* MDR + CFS *Lactobacillus helveticus* C2 pada hari pertama (C1); mencit *BALB-C* tanpa diberikan apapun pada hari keenam (A6); mencit *BALB-C* yang diberikan *Klebsiella pneumoniae* MDR saja pada hari keenam (B6); mencit *BALB-C* yang diberikan *Klebsiella pneumoniae* MDR + CFS *Lactobacillus helveticus* C2 pada hari keenam (C6).

Tanda panah menunjukan koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR.

Hasil biakan mendemonstrasikan bahwa pada perlakuan kontrol positif, tampak pertumbuhan koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR yang padat dari hari pertama (Gambar 5.9B1) dan semakin padat pada hari keenam (Gambar 5.9B6).

Sementara pada kelompok mencit *BALB-C* yang diberikan *Klebsiella pneumoniae* MDR dan diberikan CFS *Lactobacillus helveticus* C2, tampak pertumbuhan koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR yang padat pada hari pertama, namun pada hari keenam setelah mencit *BALB-C* diberikan CFS *Lactobacillus helveticus* C2 terjadi penurunan drastis jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR walaupun tidak sebanyak penurunan ketika perlakuan dengan diberikan pelet *Lactobacillus helveticus* C2.

Eksperimen dilakukan dengan empat ulangan. Hasil rata-ratanya disajikan pada Tabel 5.6 dan disajikan secara lengkap pada Lampiran 7.

Tabel 5.6 Hasil Perhitungan Jumlah Koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR pada Feses Mencit BALB-C diberikan dengan *Klebsiella pneumoniae* MDR dan diberi CFS *Lactobacillus helveticus* C2 setiap hari

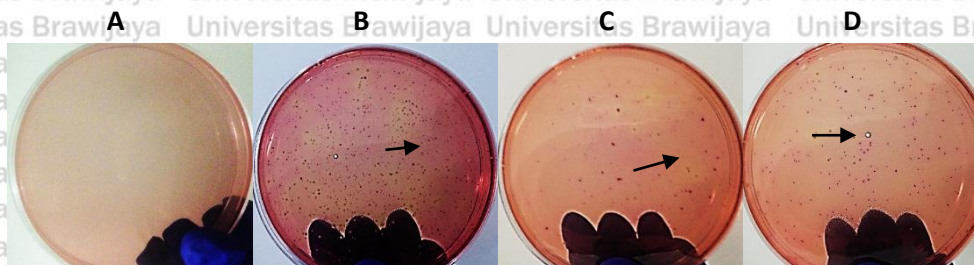
Hari	Jumlah Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> pada MacConkey Agar Per 1cc Homogenat Feses Mencit BALB-C		
	K (-)	K (+)	CFS (200 µg)
1	0	471,75x10 ⁶	470,00x10 ⁶
2	0	498,50x10 ⁶	275,00x10 ⁶
3	0	545,25x10 ⁶	190,75x10 ⁶
4	0	690,00x10 ⁶	140,25x10 ⁶
5	0	727,50x10 ⁶	111,75x10 ⁶
6	0	877,50x10 ⁶	18,07x10 ⁶

Uji statistik dilakukan dengan uji normalitas data dan di peroleh hasil data tidak normal, df=24, N=72, P<0,05 meskipun telah dilakukan transformasi data (Tabel 5.6 dan Lampiran 8). Karena data tidak normal, maka dilakukan uji statistik Kruskal-Wallis. Hasil uji statistik Kruskal-Wallis menunjukan bahwa ada perbedaan yang signifikan perlakuan terhadap jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR, $\chi^2=60,927$, df=24, N=72, P<0,05 (Lampiran 8). Selanjutnya dilakukan uji statistik Tukey non parametrik sebagai uji lanjutan. Hasil uji statisti Tukey perlakuan kelompok mencit BALB-C kontrol negatif, kelompok mencit BALB-C kontrol positif dan kelompok mencit BALB-C yang diberikan CFS *Lactobacillus helveticus* C2 berbeda bermakna pada semua perlakuan (Lampiran 8).

5.7 Perbandingan Pengaruh Pelet dan Cell Free Supernatan (CFS) *Lactobacillus helveticus* C2 Terhadap Jumlah Koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR pada kolon Mencit BALB-C

Untuk membandingkan apakah apakah pelet atau CFS *Lactobacillus helveticus* C2 yang lebih besar pengaruhnya terhadap penurunan jumlah koloni *Klebsiella*

pneumoniae MDR, maka dilakukan perhitungan jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR dari kolon mencit BALB-C (Gambar 5.10).



Gambar 5.10 Biakan kolon mencit BALB-C pada media MacConkey Agar: tanpa diberikan apapun (A); mencit BALB-C yang diberikan *Klebsiella pneumoniae* MDR saja (B); mencit BALB-C yang diberikan *Klebsiella pneumoniae* MDR + pelet *Lactobacillus helveticus* C2 (C); mencit BALB-C yang diberikan *Klebsiella pneumoniae* MDR + CFS *Lactobacillus helveticus* C2 (D).

Tanda panah menunjukan koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR.

Pengamatan biakan kolon mencit BALB-C, memperlihatkan bahwa pada perlakuan kelompok mencit BALB-C kontrol positif, tampak pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* MDR yang padat. Hasil ini menunjukkan bahwa bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR dapat melakukan adhesi dan kolonisasi dengan baik pada kolon mencit BALB-C. Pada perlakuan kelompok mencit BALB-C yang diberikan CFS *Lactobacillus helveticus* C2 terdapat pertumbuhan koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR namun tidak sepadat pada kontrol positif. Sedangkan pada perlakuan kelompok mencit BALB-C yang diberikan pelet *Lactobacillus helveticus* C2 terlihat bahwa pertumbuhan koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR paling sedikit jika dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Penelitian ini dilakukan dengan empat ulangan. Hasil rata-ratanya disajikan pada Tabel 5.7 dan disajikan secara lengkap pada Lampiran 9.

Tabel 5.7 Hasil Perhitungan Jumlah Koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR pada Usus Mencit *BALB-C* diberikan dengan *Klebsiella pneumoniae* MDR dan diberi Pelet atau CFS *Lactobacillus helveticus* C2 setiap hari

Replikasi	Jumlah Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> pada MacConkey Agar Per 1cc Homogenat Usus Mencit <i>BALB-C</i>			
	K (-)	K (+)	Pelet	CFS
1	0	128000,00x10 ⁴	0,30x10 ⁴	910,00x10 ⁴
2	0	86000,00x10 ⁴	0,21x10 ⁴	28,50x10 ⁴
3	0	209000,00x10 ⁴	0,54x10 ⁴	10,60x10 ⁴
4	0	73000,00x10 ⁴	0,05x10 ⁴	80,00x10 ⁴
Rata-rata	0	124000,00x10 ⁴	0,27x10 ⁴	257,27x10 ⁴

Beberapa data terdapat nilai 0, maka langkah pertama yaitu dilakukan transformasi data, hasil transformasi data kemudian di lakukan uji normalitas dan homogenitas dan di peroleh hasil uji statistik dengan program SPSS yaitu data berdistribusi normal $df=4$, $N=16$, $P>0,05$ dan homogen, $df_1=3$, $df_2=12$, $P>0,05$ (Lampiran 10).

Karena data berdistribusi normal dan homogen, maka uji statistik yang di gunakan adalah uji statistik parametrik Anova Satu Arah. Uji statistik Anova Satu Arah dilakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan berbagai perlakuan terhadap jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR. Berdasarkan hasil uji statistik Anova Satu Arah diketahui bahwa terdapat perbedaan yang signifikan perlakuan terhadap jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR, $F=109.857$, $df=15$, $N=16$, $P<0,05$ (Lampiran 10).

Selanjutnya dilakukan uji statistik Tukey karena terdapat perbedaan yang signifikan perlakuan terhadap jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae*. Uji statistik Tukey dilakukan sebagai uji lanjutan untuk mengetahui perbedaan antara masing-masing perlakuan (Lampiran 10). Uji statistik Tukey menunjukan bahwa perlakuan kelompok mencit *BALB-C* kontrol negatif berbeda bermakna dengan semua perlakuan. Sementara perlakuan kelompok mencit *BALB-C* yang diberikan pelet *Lactobacillus helveticus* C2, perlakuan kelompok mencit *BALB-C* yang diberikan

CFS *Lactobacillus helveticus* C2 dan kelompok mencit BALB-C kontrol positif tidak berbeda bermakna.



BAB VI

PEMBAHASAN

Pada studi sebelumnya ditemukan bahwa *Lactobacillus helveticus* C2 dapat menghambat biofilm serta agregasi dari *Klebsiella pneumoniae* MDR (Raras, et al., 2019). Pada studi ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas anti bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 terhadap *Klebsiella pneumoniae* MDR serta potensi *Lactobacillus helveticus* C2 dalam menghambat adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR secara *in-vitro* dan kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR secara *in-vivo* pada mencit Balb-C.

6.1 Aktivitas Anti Bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 terhadap Bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR

Penelitian ini berhasil membuktikan adanya aktivitas antibakteri *Lactobacillus helveticus* C2 yang kuat terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR baik pada pelet, pelet dengan pH netral, CFS dan NCFS *Lactobacillus helveticus* C2. Seperti yang telah diketahui, *Lactobacillus* mampu memproduksi asam laktat sebagai metabolit primer hasil dari fermentasi karbohidrat. Asam laktat yang dihasilkan mampu mempengaruhi permeabilitas membran sel bakteri Gram negatif dan memfasilitasi masuknya senyawa-senyawa bakterisidal lainnya sehingga menginduksi kematian bakteri patogen (Atassi dan Servin, 2010). Maldonado et al. (2007) menemukan fakta bahwa kultur sel dan supernatan asam dari *Lactobacillus fermentum* menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*, sedangkan supernatan yang bersifat netral memiliki efek yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan kultur whole sel dan supernatan asam. Hal tersebut menunjukkan bahwa sejumlah besar asam laktat yang dihasilkan oleh

Lactobacillus secara langsung memiliki efek yang signifikan terhadap penghambatan proliferasi bakteri pathogen.

Selain mampu menghasilkan asam laktat, Lactobacillus juga dapat menghasilkan asam laktat, asam asetat, asam format dan asam lainnya untuk mengurangi pH usus, yang mungkin merupakan mekanisme yang paling penting.

Bakteri ini juga dapat mengeluarkan molekul antimikroba tertentu, seperti etanol, asam lemak, hidrogen peroksida dan bakteriosin untuk mengeradikasi bakteri (Georgieva et al., 2015; Raras et al., 2019).

Etanol merupakan produk antara yang selanjutnya dapat dikonversi menjadi CO₂ dan H₂ sebagai produk akhirnya. CO₂ mampu merusak membran sel bakteri patogen dengan menurunkan level pH di bagian luar dan dalam membrane sel. Senyawa lainnya yang diproduksi oleh Lactobacillus adalah senyawa diacetyl yang merupakan produk dari metabolisme asam sitrat. Senyawa diacetyl diketahui mampu berinteraksi dengan bagian guanida arginin pada enzim-enzim mikroba patogen sehingga enzim tersebut menjadi inaktif akibat *blocking* diacetyl pada bagian katalitik enzim (Russel dan Gould, 2012). Peroksida bekerja dengan cara mengoksidasi membran lipid serta protein-protein yang ada dalam sel bakteri patogen (Choffnes et al., 2012; Kasra-Kermanshahi dan Mobarak-Qamsari, 2015).

Bakteriosin adalah metabolit sekunder dari bakteri yang memiliki sifat antimikroba bagi bakteri lainnya. Bakteriosin dapat dihasilkan oleh berbagai macam bakteri dalam kondisi tertentu, namun bakteriosin yang diproduksi oleh Lactobacillus diketahui telah terbukti aman bagi manusia apabila dikonsumsi karena telah banyak digunakan dalam industri makanan/minuman dan termasuk ke dalam kategori GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (Garcia-Fruitos, 2012).

Pada penelitian lain diketahui bahwa *Lactobacillus* memiliki aktivitas anti bakteri dan mampu menghambat beberapa patogen bakteri, diantaranya *Escherichia coli* (Davoodabadi et al., 2015), *Helicobacter pylori* (Zou et al., 2009), *Salmonella* spp. (Singh et al., 2011), *Shigella* spp. (Mirnejad et al., 2013), *Streptococcus mutans* (Ahn et al., 2018) dan *Pseudomonas aeruginosa* (Aminnezhad et al., 2015).

6.2 Hambatan Adhesi Bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada Sel Enterosit

Usus Halus Mencit *BALB-C* oleh *Lactobacillus helveticus* C2 Secara

In vitro

Penelitian ini juga dilakukan dengan tujuan untuk mengobservasi lebih lanjut apakah bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 dan *Klebsiella pneumoniae* MDR dapat melakukan kompetisi penempelan pada sel enterosit usus halus mencit *BALB-C*. Akan tetapi karna ukuran *Lactobacillus helveticus* C2 ($0,5-1,2 \times 1-10 \mu\text{m}$) yang jauh lebih besar dari *Klebsiella pneumoniae* MDR ($0,5 \times 1,2 \mu\text{m}$), maka *Klebsiella pneumoniae* MDR masih dengan mudah menempel pada sel enterosit usus halus mencit *BALB-C*.

Penemuan yang menarik adalah ketika adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit *BALB-C* dapat dihambat dengan menyalut protein pili dan protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2 terlebih dahulu pada sel enterosit usus halus mencit *BALB-C*. Protein adhesi bakteri secara umum dikelompokkan menjadi protein adhesi fimbrial/pili atau *Fimbrial Adhesin* (FA) dan protein adhesi OMP atau *Afimbrial Adhesin* (AFA). Kedua protein adhesin ini berperan sebagai faktor virulensi pada proses adhesi dan kolonisasi (Salysers and Whit, 2002). Penyalutan protein pili dan protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2

ini dimaksudkan untuk menjenuhi reseptor yang terlibat pada proses adhesi sehingga dapat menghambat penempelan *Klebsiella pneumoniae* MDR.

Interaksi protein spesifik pada permukaan mikroba (adhesi) dengan rantai karbohidrat dan glikokonjugat (reseptor) pada sel hospes merupakan tahap awal suatu infeksi (Agustina et al., 2012; Mufida et al., 2018). Pada studi ini diperlihatkan bahwa penyalutan protein pili maupun protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2 dapat menurunkan jumlah *Klebsiella pneumoniae* MDR yang melekat pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C secara signifikan ($p < 0,05$) serta berkorelasi negatif dengan nilai korelasi pearson untuk protein pili *Lactobacillus helveticus* C2 ($r = -0,998$; $p < 0,05$) dan protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2 ($r = -0,983$; $p < 0,05$). Dosis 800 μg merupakan dosis protein pili maupun protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2 terbaik yang mampu menurunkan indeks adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR. Hal ini membuktikan bahwa protein pili maupun protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2 adalah protein yang mampu menghambat perlekatan bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR pada enterosit mencit BALB-C. Dengan demikian jelas bahwa terdapat reseptor yang sama pada sel enterosit mencit dengan protein pili maupun protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2.

Apabila dibandingkan antara protein pili dan protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2 terhadap indeks adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR tampak bahwa protein pili *Lactobacillus helveticus* C2 lebih kuat dalam menurunkan nilai indeks adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR di bandingkan protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2. Hal ini dapat terjadi karena kebanyakan bakteri menggunakan dua proses adhesi, tahap pertama melalui pili (fimbriae) dengan ikatan yang longgar kemudian baru diikuti tahap kedua oleh protein permukaan atau afimbrial adhesin untuk mempererat perlekatan (Salysers and Whitt, 2002). Dengan demikian apabila

reseptor pada sel enterosit telah terjenuhi oleh protein adhesin pili (pada perlakuan pemberian protein pili *Lactobacillus helveticus* C2) maka fimbrial adhesin *Klebsiella pneumoniae* MDR menjadi tidak berfungsi dengan baik, namun tidak mudah digantikan oleh afimbrial adhesin karena fungsinya baru pada tahap kedua. Keadaan ini berbeda apabila reseptor enterosit dijenuhi oleh protein adhesin OMP (Pada perlakuan pemberian protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2) maka fimbrial adhesin tetap berfungsi dengan baik, karena berperan pada tahap awal proses adhesi. Hal ini juga dapat terjadi terutama apabila reseptor kedua protein tersebut berbeda (Khater et al., 2015; Salyers and Whitt, 2002).

Saat ini, indeks adhesi lebih dari 100 bakteri patogen baik pada manusia maupun hewan telah diteliti. Terdapat tiga tipe interaksi adhesin-reseptor yang dapat dijelaskan. Tipe pertama yang mungkin terjadi pada kebanyakan bakteri patogen, berdasarkan pengenalan *lectin*-karbohidrat, dimana *lectin* ini bisa berada pada bakteri maupun pada permukaan mukosa. Tipe kedua, melibatkan interaksi protein-protein, antara protein yang terdapat pada bakteri dan protein pasangannya yang terdapat pada permukaan mukosa. Tipe ketiga, melibatkan interaksi antara protein dan lipid, dimana lipid bisa berada pada sel hospes atau pada permukaan sel bakteri (Abraham et al., 1999; Khater et al., 2015).

Faktor adhesin berkaitan dengan pili atau fimbriae yang terdapat pada bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR. Salah satu tahap utama dalam proses menginfeksi adalah mikroorganisme patogen harus dapat mendekat dan melekat pada permukaan mukosa dari sel inang. Sifat perekat pada bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR pada umumnya dimediasi oleh beberapa jenis pili (Li et al., 2014). Pada *Klebsiella pneumoniae* MDR terdapat dua pili yang memiliki morfologi dan fungsional yang berbeda yaitu pili tipe 1 dan pili tipe 3. Pili Tipe 1 dikode oleh gen fimABCDEFHGHIK, dengan fimA mengkode subunit struktural utama

sementara fimH mengkode subunit perekat. FimH berfungsi memediasi adhesi pada struktur yang mengandung manosa yang ada pada permukaan jaringan host dan matriks ekstraseluler (Alcántar-Curiel MD, et al., 2013). Pili Tipe 3 dikode oleh *mrk operon family*. Pili tipe 3 memiliki protein adhesin yang memainkan peran utama dalam virulensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan cara melekat pada sel inang, seperti pada urogenital, pernapasan, dan pada saluran usus (Bandeira et al., 2017; Liang, 2016; Yu et al., 2011). Namun pada studi ini tidak dilakukan pengecekan apakah aktivitas anti adhesi bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR melalui ekspresi pili tipe 1 atau pili tipe 3. Oleh karena itu diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai ini.

Penjelasan lain mengenai aktivitas anti adhesin dan kolonisasi bakteri *Lactobacillus helveticus* C2, menurut Reid et al. (1999), aktivitas *Lactobacillus* dalam menghambat proses adhesi bakteri patogen berkaitan dengan kemampuannya memproduksi biosurfaktan. Bakteri *Lactobacillus* mampu mensekresikan biosurfaktan seperti *surlactin* yang berpotensi sebagai bahan anti-adhesin untuk mencegah perlekatan bakteri patogen pada suatu substrat sebagai tahap awal proses pembentukan biofilm (Rodrigues et al., 2006). Penelitian lain yang dilakukan oleh Shokouhfard et al. (2015) membuktikan bahwa aktifitas anti-adhesin oleh biosurfaktan dari *Lactobacillus acidophilus* terhadap patogen pembentuk biofilm *Serratia marcescens*. Biosurfaktan tersebut mempengaruhi interaksi antar sel bakteri melalui perubahan tegangan permukaan dan muatan dinding sel, kedua faktor tersebut dibutuhkan untuk perlekatan sel bakteri dengan permukaan substrat maupun antar sel bakteri (Shokouhfard et al. 2015).

6.3 Hambatan Kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR oleh Bakteri *Lactobacillus helveticus* C2 Secara In vivo

Meskipun *Klebsiella pneumoniae* adalah flora normal yang berada di saluran pencernaan manusia, namun juga merupakan patogen umum yang dapat menyebabkan infeksi (Toh et al., 2012; Lai et al., 2014; Jean et al., 2018). Munculnya *Klebsiella pneumoniae* yang resisten terhadap berbagai antibiotik menjadi masalah besar karena terbatasnya pilihan terapi yang tersedia serta morbiditas dan mortalitas yang signifikan disebabkan infeksi *Klebsiella pneumoniae* MDR (Tang et al., 2016; Rodriguez-Bano et al., 2018). Oleh karena itu, dibutuhkan strategi baru untuk perawatan pada individu yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae* MDR ini.

Penghitungan koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR dari feses dan kolon mencit BALB-C pada media agar MacConkey menunjukkan bahwa pada studi ini, mencit BALB-C tanpa diinduksi apapun, tidak memperlihatkan adanya koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR sejak hari pertama hingga hari keenam kultur feses mencit BALB-C pada media agar MacConkey. Hal ini bertentangan dengan pernyataan Brabb et al., (2012) yang menyatakan bahwa terdapat sekitar 5% bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada usus dan saluran pencernaan sebagai flora normal. Tidak ditemukannya koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR sejak hari pertama hingga hari keenam kultur feses mencit BALB-C karena sebelumnya mencit telah dipapar dengan antibiotik streptomisin selama 48 jam, sehingga mengeradikasi flora normal *Klebsiella pneumoniae*. Sementara itu, kelompok mencit BALB-C yang di induksi dengan *Klebsiella pneumoniae* MDR namun tanpa perlakuan pemberian pelet maupun CFS *Lactobacillus helveticus* C2, menunjukkan padatnya koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR pada media agar MacConkey. Hasil ini menunjukkan bahwa bakteri *Klebsiella pneumoniae* MDR dapat melakukan

adhesi dan kolonisasi dengan baik pada usus mencit BALB-C. Ketika masuk kedalam tubuh, *Klebsiella pneumoniae* MDR langsung melekat atau menempel pada sel epitel. Setelah menempati tempat infeksi primer, bakteri memperbanyak diri dan menyebar secara langsung ke aliran darah melalui jaringan atau sistem limfatik. Proses infeksi memungkinkan bakteri menyebar luas dalam tubuh dan mencapai jaringan yang cocok untuk multiplikasinya (Brooks et al., 2007).

Lactobacillus helveticus C2 menunjukkan aktivitas penghambatan adhesi dan kolonisasi yang baik terhadap *Klebsiella pneumoniae* MDR. Efek penghambatan ini ditunjukkan melalui penurunan jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR pada mencit BALB-C yang di induksi pelet dan CFS *Lactobacillus helveticus* C2.

Temuan ini menunjukkan peran yang menjanjikan untuk strain *Lactobacillus helveticus* C2 dalam pencegahan dan pengobatan infeksi *Klebsiella pneumoniae* MDR. *Lactobacillus* adalah salah satu dari sejumlah probiotik yang dianggap aman sebagai terapi yang memodulasi kekebalan tubuh. Bakteri probiotik memiliki peran perlindungan potensial terhadap patogen melalui mekanisme yang berbeda termasuk produksi senyawa antimikroba, penghambatan adhesi bakteri patogen pada reseptor epitel, stimulasi kekebalan tubuh dan kompetisi dalam mengikat inang. Selain itu, *Lactobacillus* dapat menghasilkan asam laktat, asam asetat, asam format dan asam lainnya untuk mengurangi pH usus, yang mungkin merupakan mekanisme yang paling penting. Bakteri ini juga dapat mengeluarkan molekul antimikroba tertentu, seperti etanol, asam lemak, hidrogen peroksida, dan bakteriosin untuk mengeradikasi bakteri (Georgieva et al., 2015; Raras et al., 2019).

Pada penelitian lain diketahui bahwa *Lactobacillus* memiliki kemampuan untuk menghambat beberapa patogen bakteri, termasuk *Clostridium difficile* (McFarland, 2015), *Escherichia coli* (Kumar et al., 2016), *Shigella* spp. (Mirnejad et al., 2013), *Streptococcus mutans* (Ahn et al., 2018) dan *Pseudomonas aeruginosa* (Jamalifar et al., 2011). Dua laporan telah menyajikan bukti untuk mekanisme spesifik yang dikembangkan oleh strain *Lactobacillus* probiotik, dimana strain probiotik dapat bersaing melawan patogen bakteri dalam ekologi usus (Deriu et al. 2013).



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

8. Isolat *Lactobacillus helveticus* C2 dapat menghambat pertumbuhan, adhesi dan kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada usus mencit *Balb-C*.

1. *Lactobacillus helveticus* C2 mampu menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* MDR melalui aktivitas anti bakteri yang sangat kuat.
2. *Lactobacillus helveticus* C2 mampu menghambat adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada usus mencit *Balb-C*.
3. *Lactobacillus helveticus* C2 mampu menghambat kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada usus mencit *Balb-C*.

8.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji western blot yang bertujuan untuk mengkonfirmasi adanya represi pada ekspresi pili tipe 3 yang berperan pada pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae* MDR.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan yang bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa atau bioaktif dari isolat *Lactobacillus helveticus* C2 yang dapat menghambat adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah pemberian *Lactobacillus helveticus* C2 dapat mempengaruhi fungsi mikrobiota normal pada saluran pencernaan?

4. Belum diteliti gen-gen apa saja pada pembentukan biofilm yang terhambat (represi) akibat paparan *Lactobacillus helveticus* C2 yang akan sangat menarik bila dilakukan pengukuran ekspresi dalam level transkripsi dari gen-gen yang berperan dalam pembentukan biofilm.



DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, S.M., Sharon N., Ofek I. 1999. *Adhesion of Bacteria to Mucosal Surface*, in Ogra PL, Lamm ME, Bienenstock, Mestecky J., Strber W, McGhee JR, *Mucosal Immunology*, 2nd ed, Academic Press: 31-42.
- Agustina W., Loeki E.F., Tri Y.M.R., Budi S., Sumarno R.P. 2012. Antibody Protein Hemagglutinin Subunit Pili with MW 49,8 kDa *Shigella dysenteriae* can inhibit *Shigella dysenteriae* adhesion on Mice Enterocyte. *Journal of Pharmacy*, 2(5):13-20.
- Ahmed Z., Wang Y., Ahmad A., Khan S.T., Nisa M., Ahmad H. 2013. Kefir and Health: A Contemporary Perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5):422-434.
- Ahn K.B., Baik J.E., Park O.J., Yun C.H., Han S.H. 2018. Lactobacillus plantarum lipoteichoic acid inhibits biofilm formation of Streptococcus mutans. *PLoS One*, 8;13(2).
- Alakomi, H.L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K., Helander I.M. 2000. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5):2001-2005.
- Alcántar-Curiel M.D., Blackburn D., Saldaña Z., Gayosso-Vázquez C., Iovine N.M., De la Cruz M.A., Girón J.A. 2013. Multi-functional analysis of Klebsiella pneumoniae fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence*, 4(2):129-38.
- Alexander, B.D., Johnson M.D., Pfeiffer C.D., Jiménez-Ortigosa C., Catania J., Booker R. Increasing Echinocandin Resistance in Candida Glabrata: Clinical Failure Correlates with Presence of FKS Mutations and Elevated Minimum Inhibitory Concentrations. *Clin Infect Dis*, 56:1724–32.
- Aminnezhad S., Kermanshahi R.K., Ranjbar R. 2015. Evaluation of synergistic interactions between cell-free supernatant of Lactobacillus strains and amikacin and genetamicin against Pseudomonas aeruginosa. *Jundishapur J Microbiol*, 8: e16592.

- Anderson, K. F., D. R. Lonsway, J. K. Rasheed, J. Biddle, B. Jensen, L. K. McDougal, R. B. Carey, A. Thompson, S. Stocker, B. Limbago, J. B. Patel. 2007. Evaluation of Methods To Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8): 2723–2725.
- Atassi, F. dan Servin, A.L. 2010. Individual and co- operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric, uropathogenic and vaginosis- associated pathogens. *FEMS Microbiol Lett* 304: 29-38.
- Atassi, F., Brassart, D., Grob, P., Graf, F., Sevin, A.L. 2006. *In Vitro* Antibacterial Activity of *Lactobacillus helveticus* Strain KS300 against Diarrhoeagenic, Uropathogenic and Vaginosis-Associated Bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 101:647-654.
- Bandeira, M., Borges, V., Gomes, J.P., Duarte, A., Jordan, L. 2017. Insight on *Klebsiella pneumoniae* Biofilms Assembled on Different Surfaces Using Phenotypic and Genotypic Approaches. *Microorganisms*, 5(16):e5020016.
- Bellifa, S., Hassaine H., Balestrino D., Charbonnel N., M'hamedi I., Terki I.K., et al. 2013. Evaluation of Biofilm Formation of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Medical Devices at the University Hospital of Tlemcen, Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 7(49) : 5558-5564.
- Bennett, J.W., Robertson J.L., Hospenthal D.R., Wolf S.E., Chung K.K., Mende K. 2010. Impact of Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* Infections in Severely Burned Patients. *J Am Coll Surg.*, 3(30).
- Bosch, M., Rodriguez M., Garcia F., Fernández E., Fuentes M. C., Cuñé J. 2011. Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 and CECT 7316 Isolated from Faeces of Healthy Children. *Letters in Applied Microbiology*, 54:240–246.
- Brabb T., Denise N., Andrew B., and Martha H. 2012. *Infectious Diseases. The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*: American College of Laboratory Animal Medicine; 637-683.

Brooks B.W., Foran C.M., Richards S., Weston J., Turner P.K., Stanley J.K., Solomon K., Slattery M., Point L. 2007. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. Ed 25. San Francisco: McGraw Hill.

Chen, V., Li H., Fane A.G. 2004. Noninvasive Observation of Synthetic Membrane Processes – A Review of Methods. *J Membrane Sci.*, 241:23–44.

Chen, Y-P. dan Chen, M-J. 2013. Effects of *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 Isolated from Kefir Grains on Germ-Free Mice. *PLoS One* 8(11):e78789.

Choffnes, E.R., Relman, D.A., Olsen, L., Hutton, R., Mack, A. 2012. *Improving Food Safety Through a One Health Approach: Workshop Summary*. National Academies Press: USA.

Clegg, S., Murphy, C.N. 2016. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Spectrum*, 4(1):1-17.

Codex Alimentarius Commission (CODEX). 2003. Codex Standard for Fermented Milks: Codex STAN 243. FAO/WHO Food Standards. www.fao.org/input/download/standards/400/CXS_243e.pdf. Diakses pada tanggal 11 Juli 2018 Pukul 21:13.

Craig, C.R. and Stitzel, R.E. 2005. *Modern Pharmacology with Clinical Applications*. Lippincott Williams & Wilkins.

Crouzet, M., Senechal, C.L., Brozel, V.S., Costaglioli, P., Barthe, C., Bonneau, M., Garbay, B., Vilain, S. 2014. Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies. *BMC Microbiology* 14:253.

Da Silva, S., Vitolo M., González J.M.D., Oliveira R.P.S. 2014. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Res Int*, 64:527-536.

Dahlan, M.S. 2013. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Edisi 5. Samleba Medika. Jakarta. p. 46-48.

Davoodabadi A., Dallal M.M.S., Lashani E., Ebrahimi M.T. 2015. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal flora of healthy breast-fed infants against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Jundishapur J Microbiol*, 8: e27852.

De Roos N.M., Katan M.B. 2000. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr*, 71(2): 405-11.

De Vuyst, L., dan Leroy, F. 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification And Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13:194–199.

Delcenserie, V., Martel, D., Lamoureux, M., Amiot, J., Boutin, Y. & Roy, D. 2005 Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current Issues in Molecular Biology*, 10: 37–54.

Deriu E., Liu J.Z., Pezeshki M., Edwards R.A., Ochoa R.J., Contreras H., Libby S.J., Fang F.C., Raffatellu M. 2013. Probiotic bacteria reduce salmonella typhimurium intestinal colonization by competing for iron. *Cell Host Microbe*, 14(1):26-37.

Dufour D., Leung V., Levesque C.M. 2012. Bacterial Biofilm: Structure, Function, And Antimicrobial Resistance. *Endodontic Topics*, 22: 2–16.

Ekundayo, F.O. 2014. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Rhizosphere Soils of Three Fruit Trees, Fish and Ogi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(3): 991-998.

Farida, H., Gasem, M.H., Suryanto, A., Keuter, M., Zulkarnain, N., Satoto, B., van der Eijk, A.A., Djokomoeljanto, R., Wahyono, H., Verburgh, H.A., Severin, J.A., van den Broek, P.J. 2015. Viruses and Gram-negative Bacilli Dominate the Etiology of Community-acquired Pneumonia in Indonesia, a Cohort Study. *International Journal of Infectious Diseases* 38:101-107.

Fink M., D. Imholz, and F. Thoma. 2007 Contribution of the Serine 129 of Histone H2A to Chromatin Structure. *Mol Cell Biol*, 27(10):3589-600.

Fish, D. N. 2009. Urinary Tract Infection, in Koda Kimble, M.A. et al., (Eds), *Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs*, 9th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, USA, pp. 64.1-64.4.

Flemming, H.C. and Wingender, J. 2010. The Biofilm Matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8(9): 623-633.

Fung, C.P., Lin Y.T., Lin J.C., Chen T.L., Yeh K.M., Chang F.Y. 2012. *Klebsiella pneumoniae* in Gastrointestinal Tract and Pyogenic Liver Abscess. *Emerging Infectious Diseases*, 18:8.

Garcia-Fruitos, E. 2012. Lactic Acid Bacteria: A Promising Alternative for Recombinant Protein Production. *Microb Cell Fact* 11:157.

Garrett T.R., Bhakoo M., Zhang Z. 2008. Bacterial Adhesion and Biofilms on Surfaces. *Prog Nat Sci*, 18(9):1049–1056.

Georgieva R., Lilia Z.T., Lyubomira Y., Galina Z. 2015. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. Intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(1):84-91.

Gharrah, M.M., El Mahdy A.M., Barwa R.F. 2017. Association between Virulence Factors and Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* Compared to Nonproducing Isolates. *Hindawi Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 7279830.

Ghasemlou M., Khodaiyan F., Jahanbin K., Mohammad S., Gharibzadeh T., Taheri S. 2012. Structural Investigation and Response Surface Optimisation for Improvement of Kefiran Production Yield from A Low-Cost Culture Medium. *FoodChem.*, 133, 383–389.

Gonzalez, R., Diaz C., Mairao M., Clorak R., Pequenezze M., Perez-Schael I. 1997. Age-Specific Prevalence of *Escherichia coli* with Acute Diarrhea. *J of Clin Microbiology*, 35: 1103-1107.

Gorrie, C.L., Mirceta M., Wick R.R., Edwards D.J., Thomson N.R., Strugnell R.A. 2017. Gastrointestinal Carriage is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clinical Infectious Disease*, 2017:65.

Gray, D. dan Zar, H.J. 2010. Childhood Pneumonia in Low and Middle Income Countries: Burden, Prevention and Management. *The Open Infectious Diseases Journal.*, 4:74-84.

Guarner, F., Malagelada J. R. 2003. Gut Flora in Health and Disease. *Lancet*, 361(9356): 512-9.

Gupta A., Ampofo A., Rubenstein D., Saiman L. 2003. Extended Spectrum β Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Infections: a Review of the Literature. *Journal of Perinatology*, 23: 439–443.

Gupta V. dan Garg R. 2009. Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(3): 202-9.

Halasz, A. 2005. Lactic Acid Bacteria, *Food Quality and Standards* III. Encyclopedia of Life Support Systems.

Hart, D. O., M. K. Santra, T. Raha, M. R. Green. 2009. Selective interaction between Trf3 and Taf3 required for early development and hematopoiesis. *Developmental Dynamics*, 238:2540–2549.

Hammond J.F., Stewart E.J., Younger J. G., Solomond M.J., Bortz D.M. 2013. Spatially Heterogeneous Biofilm Simulations using an Immersed Boundary Method with Lagrangian Nodes Defined by Bacterial Locations. *Arxiv*: 1302.3663.

Hertzler, S.R. dan Shannon, M.C. 2003. Kefir Improves Lactose Digestion And Tolerance In Adults With Lactose Maldigestion. *J. Am. Diet. Assoc.*, 103:582–587.

Hong, Wei-Sheng, H. Chen, Y. Chen, M. Chen. 2009. Effects of Kefir Supernatant and Lactic Acid Bacteria Isolated from Kefir Grain on Cytokine Production By Macrophage. *International Dairy Journal*, 19(4):244-251.

Hsu, C.R., Pan Y.J., Liu J.Y., Chen, C.T., Lin T.L., Wang J.T. 2015. *Klebsiella pneumoniae* Translocates across the Intestinal Epithelium via Rho GTPase- and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Dependent Cell Invasion. *Infect Immun.*, 83 (2):769 –779.

Hsu C. R., Lin T. L., Chen Y. C., Chou H. C., Wang J. T. 2011. The Role of *Klebsiella pneumoniae* rmpA in Capsular Polysaccharide Synthesis and Virulence Revisited. *Microbiology*, 157(12):3446–3457.

Hunt, J. J., Wang J. T., Callegan M. C. Contribution of Mucoviscosity-Associated Gene A (magA) to Virulence in Experimental *Klebsiella pneumoniae* Endophthalmitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 52(9):6860–6866.

Ishikawa, H., Akedo I., Otani T., Suzuki T., Nakamura T., Takeyama I., Ishiguro S., Miyaoka E., Sobue T., Kakizoe T. 2005. Randomized Trial of Dietary Fiber and Lactobacillus Casei Administration for Prevention of Colorectal Tumors. *Int J Cancer*, 116(5):762-7.

Jagnow, J., Clegg S. 2003. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated Biofilm Formation on Extracellular Matrix- and Collagen-Coated Surfaces. *Microbiology* 149:2397-2405.

Jalilsood, T., Baradan, A., Song, A.A., Foo, H.L., Mustafa, S., Saad, W.Z., Yusoff, K., Rahim, R.A. 2015. Inhibition of Pathogenic and Spoilage Bacteria by A Novel Biofilm-Forming *Lactobacillus* Isolate: A Potential Host for the Expression of Heterologous Proteins. *Microb Cell Fact*, 14:96.

Jamalifar H., Rahimi H., Samadi N., Shahverdi A., Sharifian Z. 2011. Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against multi-drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Microbiol*, 3: 21-25.

Jean, S., Nan-Yao L., Hung-Jen T., Min-Chi Lu., Wen-Chien Ko., Po-Ren H. 2018. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: Taiwan Aspects. *Front Microbiol*, 9: 2888.

Kasra-Kermanshahi, R., Mobarak-Qamsari, E. 2015. Inhibition Effect of Lactic Acid Bacteria against Food Born Pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Appl Food Biotechnol.*, 2(4):11-19.

Khater FD, Balestrino D, Charbonnel , Dufayard JF, Brisse S, dan Forestier C. 2015. In silico analysis of usher encoding genes in *Klebsiella pneumoniae* and characterization of their role in adhesion and colonization. *PLoS ONE*. 10(3):1–24.

Khiralla, G.M., Mohamed, E.A.H., Farag, A.G., Elhariry, H. 2015. Antibiofilm Effect of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* Cell-free Supernatants against Some Bacterial Pathogens. *Journal of Biotech Research*, 6:86-95.

Klemm, Shelley A., Richard D. G., Terry J. T., Wendy L. F. 1990. Biochemical Correction in the Syndrome of Hypertension and Hyperkalaemia by Severe Dietary Salt Restriction Suggests Renin-Aldosterone Suppression Critical

in Pathophysiology. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 17(3):191-195.

Kostakioti, M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S.J. 2013. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Post Antibiotic Era. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 3(4): 1–23.

Krogfelt, K. A., Bergmans, H., Klemm, P. 1990. Direct Evidence That the Fimh Protein Is the Mannose Specific Adhesin of *Escherichia Coli* Type 1 Fimbriae. *Infect. Immun.*, 58:1995-1998.

Kumar, N., Attri, P., Yadav, D.K., Choi, J., Choi, E.H., Uhm, H.S. 2014. Induced apoptosis in melanocytes cancer cell and oxidation in biomolecules through deuterium oxide generated from atmospheric pressure non-thermal plasma jet. *Sci Rep.* 4:7589.

Lagrafeuille R., Miquel S., Balestrino D., Vareille-Delarbre M, Chain F., Langella P., Forestier C. 2017. Opposing effect of *Lactobacillus* on *in vitro* *Klebsiella pneumoniae* in biofilm and in an *in vivo* intestinal colonisation model, *Beneficial Microbes*, 9(1):87-100.

Lai Y-C, Lin A-C, Chiang M-K, Dai Y-H, Hsu C-C, Lu M-C. 2014. Genotoxic *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS ONE*, 9(5): e96292.

Li, B., Y. Zhao, C. Liu, Z. Chen, D. Zhou. 2014. Molecular Pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.*, 9(9), 1071-1081.

Liang, C, Xing B., Yang X., Fu Y., Feng Y., Zhang Y. 2015. Molecular Epidemiology of Aminoglycosides Resistance on *Klebsiella pneumonia* in A Hospital in China. *Int J Clin Exp Med.*, 8(1): 1381-385.

Luna J.M., Sarubbo L.A., Campos-Takaki G.M. 2009. A new Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52:785-793.

Magill S. S., Jonathan R. E., Wendy B., Zintars G. Beldavs, M.S., Ghinwa D., Marion A. K., Ruth L., Meghan M., Laura M.H., Joelle N., Susan M. R., Deborah L. T., Lucy E. W., and Scott K. F. 2014. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med.*, 370(13): 1198–1208.

Maldonado, N.C., Silva De R., Cecilia M., Nader-Macias M.E. 2007. A Simple Technique to Detect *Klebsiella* Biofilm Forming Strains- Inhibitory Potential of *Lactobacillus fermentum* CRL 1058 Whole Cells and Products. *Commun Curr. Res. Educ. Top. Trends. Appl. Microbiol.*, 52–59.

Martin, R. M. and M. A. Bachman. 2018. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Cellular Infection Microbiology*, 8(4):1-15.

Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Converti, A., Cotter, P. D., Oliveira, R. P. S. 2013. Bacteriocin Production by *Bifidobacterium* spp.: A review. *Biotechnology Advances*, 31:482–488.

Matsubara, V. H., Wang Y., Bandara H. M., Mayer M. P., Samaranayake L. P. 2016. Probiotic Lactobacilli Inhibit Early Stages of *Candida albicans* Biofilm Development by Reducing Their Growth, Cell Adhesion, and Filamentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100(14): 6415–6426.

McFarland L.V. 2015. Probiotics for the Primary and Secondary Prevention of *C. difficile* Infections: A Meta-analysis and Systematic Review. *Antibiotics (Basel)*, 4(2):160-78.

Melot, B., Colot, J., Guerrier, G. 2015. Bacteremic Community-Acquired Infections Due to *Klebsiella Pneumoniae*: Clinical and Microbiological Presentation in New Caledonia, 2008–2013. *J. Ijid*, 41:29-31.

Mirnejad, R., Jamal R., Ali R.V., Mohammad E. 2013. The Antimicrobial Effect of *Lactobacillus Casei* Culture Supernatant Against Multiple Drug Resistant Clinical Isolates of *Shigella Sonnei* and *Shigella Flexneri* in Vitro. *Iran Red Cres Med J.*, 2013; 15(2):122-6.

Mufida D.C., Kusworini H., Sumarno R.P., Sanarto S. 2018. Identification of Hemagglutinin Protein from *Streptococcus pneumoniae* Pili as a Vaccine Candidate by Proteomic Analysis. *Turk J Immunol.*, 6(1):8-15.

Nagayama, K., Oguchi T., Arita M., Honda T. 1995. Purification, and Characterization of A Cell Associated Hemagglutinin of *Vibrio Parahaemolyticus*. *Infec. Immun.*, 63(5) :1987-1992.

Naparstek, L., Carmeli Y., Navon-Venezia S., Banin E. 2014. Biofilm Formation and Susceptibility to Gentamicin and Colistin Of Extremely Drug-Resistant KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 69:1027–1034.

Ngeow, Y.F., Cheng, H.J., Chen, J.W., Yin, W-F., Chan, K-G. 2013. Short Chain N-Acylhomoserine Lactone Production by Clinical Multidrug Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain CSG20. *Sensors*, 13:15242-15251.

Onori, R., Galarsa, S., Comandatore, F., Pongolini, S., Brisse, S., Colombo, A., Cassani, G., Marone, P., Grossi, P., Minoja, G., Bandi, C., Sasser, D., Toniolo, A. 2015. Tracking Nosocomial *Klebsiella pneumoniae* Infections and Outbreaks by Whole-Genome Analysis: Small-Scale Italian Scenario within a Single Hospital. *JCM*, 53(9):2861-2868.

Pamer, E.G. 2016. Resurrecting the Intestinal Microbiota to Combat Antibiotic-Resistant Pathogens. *Science*, 352: 535-538.

Pan, Y. J., Lin T. L., Chen Y. H. 2013. Capsular Types of *Klebsiella pneumoniae* Revisited by wzc Sequencing. *PLoS ONE*, 8(12):e80670.

Parsek, M.R., Greenberg, E.P. 2000. Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria: A Signaling Mechanism Involved in Associations with Higher Organisms. *PNAS*, 97(16):8789-8793.

Paterson, D.L., Ko, W., Gottberg, A., Mohapatra, S., Casellas, J.M., Goossens, H., Mulazimoglu, L., Trenholme, G., Klugman, K.P., Bonomo, R.A., Rice, L.B., Wagener, M.M., McCormack, J.G., Yu, V.L. 2004. Antibiotic Therapy for *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Implications of Production of Extended-Spectrum B-Lactamases. *CID*, 39:31-37.

Peleg, A.Y., Hooper D.C. 2010. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N. Engl. J. Med.*, 362(19):1804-13.

Plessas, S., Nouska C., Mantzourani I., Koukoutsas Y., Alexopoulos A., Bezirtzoglou E. 2017. Microbiological Exploration of Different Types of Kefir Grains. *Fermentation*, 3(1).

Podschun, R., Ullmann, U. 1998. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin. Microbiol Rev.*, 4:589-603.

Prado, M., Boller C., Zibetti R., de Souza D., Pedroso L., Soccol C. 2016. Anti-Inflammatory and Angiogenic Activity of Polysaccharide Extract Obtained from Tibetan Kefir. *Microvascular Research*, 108: 29–33.

Rachmilewitz, D., Katakura K., Karmeli F., Hayashi T., Reinus C., Rudensky B., Akira S., Takeda K., Lee J., Takabayashi K., Raz E. 2004. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology*, 126(2):520-8.

Raras, T. Y. M., Alif F. F., Intan R. K., and Noorhamdani N. 2019. Anti-Biofilm Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kefir Against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J. Pure Appl. Microbiol.*, 13 (2): 983-992.

Rawat, D. and D. Nair. 2010. Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(3):263–274.

Regueiro, V., Moranta D., Frank C.G. 2011. *Klebsiella pneumoniae* Subverts the Activation of Inflammatory Responses in a NOD1-Dependent Manner. *Cell Microbiol.*, 13(1):135–153.

Reid, G., Heinemann, C., Velraeds, M., van der Mei, H.C., Busscher, J. 1999. Biosurfactants Produced by *Lactobacillus*. *Methods in Enzymology*. 310(31): 426-433.

Rizzello, V., Bonaccorsi, I., Dongarra, M.L., Fink, L.N. and Ferlazzo, G. 2011. Role of Natural Killer and Dendritic Cell Crosstalk in Immunomodulation by Commensal Bacteria Probiotics. *J. Biomed. Biotechnol.*, 473097.

Rodrigues L., Banat I., Teixeira J., Oliveira R. 2006. Biosurfactants: Potential Applications in Medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57:609–618.

Roy, V., Adams, B.L., Bentley, W.E. 2011. Developing Next Generation Antimicrobials by Intercepting AI-2 Mediated Quorum Sensing. *Enzyme Microb. Technol.*, 49: 113-123.

Royston, C. Clowes. 1972. Molecular Structure of Bacterial Plasmids. *Bacteriological Review*. ASM, 36(3):361-405

Russel, N.J., Gould, G.W. 2012. *Food Preservatives*. p294. Springer Science & Business Media: New York.

Salyers A.A and Whitt D.D. 2002. *Bacterial Pathogenesis: a molecular approach*. Washington DC: American Society for Microbiology Press.

Sambanthamoorthy, K., Feng X., Patel R., Patel S., Parnavitana C. 2014. Antimicrobial and Antibiofilm Potential of Biosurfactants Isolated from *Lactobacilli* Against Multi-Drug-Resistant Pathogens. *BMC Microbiology*, 14:197.

Santoso, S. 2002. *Protein Adhesin Salmonella typhi Sebagai Faktor Virulensi Berpotensi Immunogenik Terhadap Produksi S-IgA Protektif*. [Disertasi] Surabaya: Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.

Santoso, A. A., Kurniawan K., Mustofa Y., Haris A. Teguh S. R., Yani J. S. 2019. *Pola Kuman Pneumonia*. Malang: Program Pendidikan Spesialis I Pulmonologi dan Kedokteran, Universitas Brawijaya.

Sarah, C., Michelle T., and Gregor R. 2008. Vaginal Microbiota and the Use of Probiotics. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2008(56490):1-9.

Satpathy, S., Sen, S.K., Pattanaik, S., Raut, S. 2016. Review on Bacterial Biofilm: a Universal cause of contamination. *J. bcab*, 16:30093-7.

Schroll, C, Barken K, Krogfelt K, Struve C. 2010. Role of Type 1 and Type 3 Fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Formation. *BMC Microbiology*, 10(1):179.

Setyawardani, T. dan Sumarmono J. 2015. Chemical and Microbiological Characteristics of Goat Milk Kefir During Storage Under Different Temperatures, *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 40(3):183-188.

Setyawardani, T., Rahardjo A., Sulistyowati M., Wasito S. 2014. Physiochemical and Organoleptic Features of Goat Milk Kefir Made of Different Kefir Grain Concentration on Controlled Fermentation. *Animal production*, 16(1).

Sharma, D., dan Saharan, B.S. 2016. Functional Characterization of Biomedical Potential of Biosurfactant Produced by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnology reports*, 11:27-35.

Sharma, D., Saharan, B.S., Nikhil C., Anshul B., Suresh P. 2014. Production and Structural Characterization of *Lactobacillus helveticus* Derived Biosurfactant. *The Scientific World Journal*, 2014, Article ID 493548, 9 pages

Shears, P. 2001. Antibiotic Resistance in the Tropics. Epidemiology and Surveillance of Antimicrobial Resistance in the Tropics. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 95(2):127-30.

Shokouhfar, M., Kermanshahi R.K., Shahandashti R.V., Feizabadi M.M., Teimourian S. 2015. The Inhibitory Effect of A *Lactobacillus acidophilus* Derived Biosurfactant on Biofilm Producer *Serratia marcescens*. *Iran. J. Basic Med. Sci.*, 18:1001-1007.

Shon, A.S., Bajwa R.P.S., Russo, T.A. 2014. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A New and Dangerous Breed. *Virulence*, 4(2):107–118.

Silva, K.R., Rodrigues S.A., Filho L.X., Lima A.S. 2009. Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kefir Grains. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 152:316–325.

Sikorska, H. And W. Smoragiewicz. 2013. Role of Probiotics in the Prevention and Treatment of Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(6):475-481.

Singh A.P., Preet S., Rishi P. 2011. Augmentation of antimicrobial activity of conventional antibiotics by cell-free extract of *L. plantarum*. *J Antibiotics*. 64: 795-798.

Siu, L.K., Yeh K.M., Lin J.C., Fung C.P., Chang F.Y. 2012. *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess: A New Invasive Syndrome. *Lancet Infect. Dis.*, 12(11):881–887.

Steindler, L., Venturi, V. 2006. Detection of Quorum-Sensing N-acyl Homoserine Lactone Signal Molecules by Bacterial Biosensors. *Microbiol Lett.*, 266:1-9.

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. *Infect Immun*, 76(9):4055-65.

Tang, Hui-Ling L., Yi-Chyi C., Chien-Shun L., Po-yu W., Ling-Ling H., Wen C., Ken-Sheng T., Kwong-Chung L., Min-Chi. 2014. Liver abscess caused by *Klebsiella pneumoniae* in a red-footed tortoise. *Journal of microbiology, immunology, and infection*, 2014:48.

Vading, M., P. Naucler, M. Kalin and C. G. Giske. 2018. Invasive Infection Caused by *Klebsiella pneumoniae* is A Disease Affecting Patients with High Comorbidity and Associated with High Long-Term Mortality. *PLoS ONE*, 13(4):1-13.

Vinderola, G., Matar, C., Perdigon, G. 2007. Milk Fermentation Products of *L. helveticus* R389 Activate Calcineurin as A Signal to Promote Gut Mucosal Immunity. *BMC immunology*, 8:19.

Vuotto, C., Longo F., Balice M.P., Donelli G., Varaldo P.E. 2014. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*, 3:743-758.

Wakai, T. and Naoyuki Y. 2011. Antihypertensive Peptides Specific to *Lactobacillus helveticus* Fermented Milk. *Biotechnology-Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life*, 159-173.

Wang, Y., Ahmed Z., Feng W., Li C., Song S. 2010. Physicochemical Properties of Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 Isolated from Tibet Kefir. *Int. J. Biol. Macromol.*, 43:283-288.

Wang, Y., Ahmed Z., Feng W., Li C., Song S. 2008. Physicochemical Properties of Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 Isolated from Tibet Kefir. *Int. J. Biol. Macromol.*, 43:283-288.

Williamson, T. 2012. Exploring the Genetic Control of Glycolytic Oscillations in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Syst Biol*, 6:108.

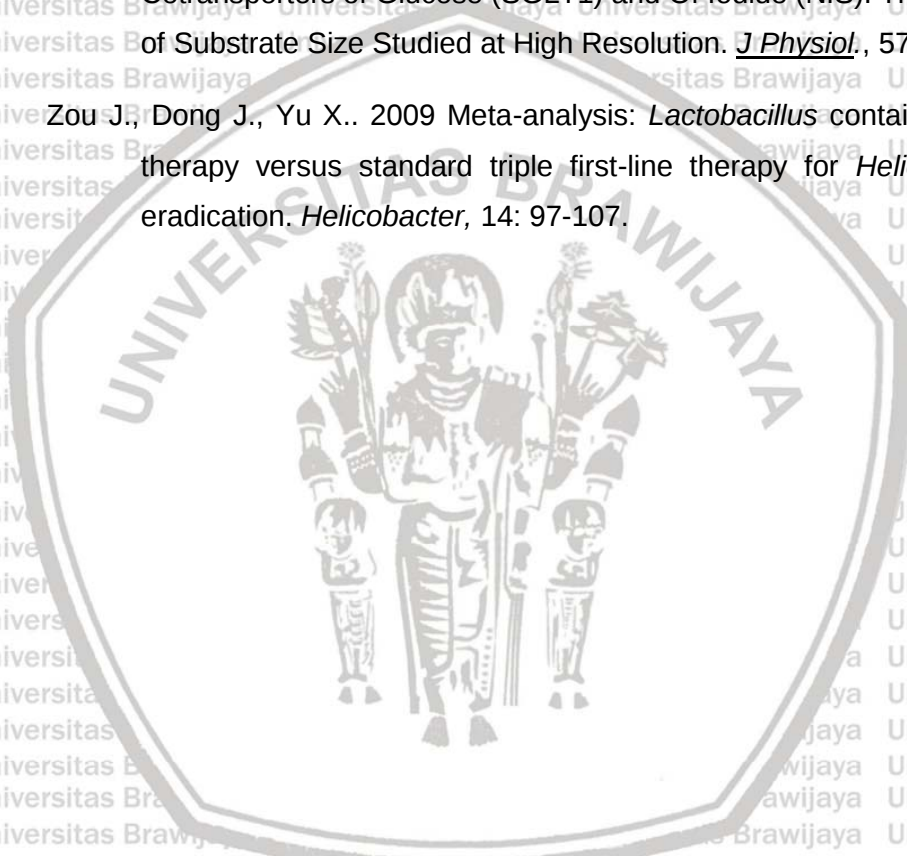
Winarsih, S., Sumarno dan Roekistiningsih. 1997. *Kajian Fungsi dan Sifat Immunogenitas Protein Hemagglutinin 32kD dan 20kD pada Helicobacter pylori*. Majalah Kedokteran Universitas Brawijaya 1997(13): 135-141.

Wu, M-C., Lin, T-L., Hsieh, P-F., Yang, H-C., Wang, J-T. 2011. Isolation of Genes Involved in Biofilm Formation of a *Klebsiella pneumoniae* Strain Causing Pyogenic Liver Abscess. *PLoS ONE*, 6(8):e23500.

Yu, W-L., Chuang, Y-C., Calderwood, S.B., Baron, E.L. 2011. Microbiology and Pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* infection. <http://cursoenarm.net/UPTODATE/contents/mobipreview.htm?34/21/35152?view=print>. Diakses pada 28 Juli 2018.

Zeuthen, T., Bo B., and Emil Z. 2006. Water Transport by Na⁺-Coupled Cotransporters of Glucose (SGLT1) and Of Iodide (NIS). The Dependence of Substrate Size Studied at High Resolution. *J Physiol.*, 570(3):485–499.

Zou J., Dong J., Yu X.. 2009 Meta-analysis: *Lactobacillus* containing quadruple therapy versus standard triple first-line therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter*, 14: 97-107.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Indeks adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit *BALB-C* yang dipapar berbagai konsentrasi protein pili *Lactobacillus helveticus* C2

Dosis (µg)	Slide	Ulasan 1 (Per 100 Sel)	Ulasan 2 (Per 100 Sel)	Rata-Rata Per 100 Sel	Rata-Rata Per 1 Sel
0	1	3988	3690	3839	38,39
	2	3727	3793	3760	37,6
	3	3856	3914	3885	38,85
	4	3708	3852	3780	37,8
				rata-rata	38,16
25	1	2738	2646	2692	26,92
	2	2602	2756	2679	26,79
	3	2689	2779	2734	27,34
	4	2483	2613	2548	25,48
				rata-rata	26,6325
50	1	2108	1956	2032	20,32
	2	2174	1802	1988	19,88
	3	1973	2043	2008	20,08
	4	2039	1993	2016	20,16
				rata-rata	20,11
100	1	1564	1494	1529	15,29
	2	1490	1684	1587	15,87
	3	1529	1395	1462	14,62
	4	1298	1378	1338	13,38
				rata-rata	14,79
200	1	852	742	797	7,97
	2	951	933	942	9,42
	3	795	721	758	7,58
	4	689	935	812	8,12
				rata-rata	8,2725
400	1	145	193	169	1,69
	2	162	186	174	1,74
	3	237	325	281	2,81
	4	328	206	267	2,67
				rata-rata	2,2275
800	1	74	90	82	0,82
	2	86	62	74	0,74
	3	66	64	65	0,65
	4	56	86	71	0,71
				rata-rata	0,73

Lampiran 2. Analisis statistik indeks adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit *BALB-C* yang dipapar berbagai konsentrasi protein pili *Lactobacillus helveticus* C2

2.1 Uji Normalitas

Dosis	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Dosis 0 µg	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Dosis 25 µg	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Dosis 50 µg	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Dosis 100 µg	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Dosis 200 µg	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Dosis 400 µg	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Dosis 800 µg	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%

Tests of Normality

Dosis	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Dosis 0 µg	.236	4	.	.942	4	.669
Dosis 25 µg	.328	4	.	.873	4	.308
Dosis 50 µg	.185	4	.	.993	4	.971
Dosis 100 µg	.187	4	.	.968	4	.827
Dosis 200 µg	.326	4	.	.870	4	.298
Dosis 400 µg	.294	4	.	.805	4	.111
Dosis 800 µg	.194	4	.	.989	4	.954

2.2 Uji Homogenitas

Dosis (µg)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
0	4	38.1600	.56927	.28463	37.60	38.85
225	4	26.6325	.80338	.40169	25.48	27.34
50	4	20.1100	.18294	.09147	19.88	20.32
100	4	14.7900	1.06980	.53490	13.38	15.87
200	4	8.2725	.79814	.39907	7.58	9.42
400	4	2.2275	.59489	.29744	1.69	2.81
800	4	.7300	.07071	.03536	.65	.82
Total	28	15.8461	12.80759	2.42041	.65	38.85

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Pili	2.497	6	21	.055

2.3 T-Test

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 Ulasan 1	1.5860E3	7	1358.84140	513.59377
Ulasan 2	1.4404E3	7	1112.69288	420.55838

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 Ulasan 1 & Ulasan 2	7	.971	.000

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Ulasan 1 - Ulasan 2	1.45571E2	384.67664	145.39410	-210.19513	501.33799	1.001	6	.355

2.4 Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4419.500	6	736.583	1.640E3	.000
Within Groups	9.430	21	.449		
Total	4428.930	27			

2.5 Tukey

Dosis	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Dosis 800 µg	4	.7300					
Dosis 400 µg	4	2.2275					
Dosis 200 µg	4		8.2725				
Dosis 100 µg	4			14.7900			
Dosis 50 µg	4				20.1100		
Dosis 25 µg	4					26.6325	
Dosis 0 µg	4						38.1600
Sig.		.060	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000



Multiple Comparisons

Tukey HSD

(I) Dosis	(J) Dosis	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	Dosis 25 µg	11.52750*	.47384	.000	9.9871	13.0679
	Dosis 50 µg	18.05000*	.47384	.000	16.5096	19.5904
	Dosis 100 µg	23.37000*	.47384	.000	21.8296	24.9104
	Dosis 200 µg	29.88750*	.47384	.000	28.3471	31.4279
	Dosis 400 µg	35.93250*	.47384	.000	34.3921	37.4729
	Dosis 800 µg	37.43000*	.47384	.000	35.8896	38.9704
25	Dosis 0 µg	-11.52750*	.47384	.000	-13.0679	-9.9871
	Dosis 50 µg	6.52250*	.47384	.000	4.9821	8.0629
	Dosis 100 µg	11.84250*	.47384	.000	10.3021	13.3829
	Dosis 200 µg	18.36000*	.47384	.000	16.8196	19.9004
	Dosis 400 µg	24.40500*	.47384	.000	22.8646	25.9454
	Dosis 800 µg	25.90250*	.47384	.000	24.3621	27.4429
50	Dosis 0 µg	-18.05000*	.47384	.000	-19.5904	-16.5096
	Dosis 25 µg	-6.52250*	.47384	.000	-8.0629	-4.9821
	Dosis 100 µg	5.32000*	.47384	.000	3.7796	6.8604
	Dosis 200 µg	11.83750*	.47384	.000	10.2971	13.3779
	Dosis 400 µg	17.88250*	.47384	.000	16.3421	19.4229
	Dosis 800 µg	19.38000*	.47384	.000	17.8396	20.9204
100	Dosis 0 µg	-23.37000*	.47384	.000	-24.9104	-21.8296
	Dosis 25 µg	-11.84250*	.47384	.000	-13.3829	-10.3021
	Dosis 50 µg	-5.32000*	.47384	.000	-6.8604	-3.7796
	Dosis 200 µg	6.51750*	.47384	.000	4.9771	8.0579
	Dosis 400 µg	12.56250*	.47384	.000	11.0221	14.1029
	Dosis 800 µg	14.06000*	.47384	.000	12.5196	15.6004
200	Dosis 0 µg	-29.88750*	.47384	.000	-31.4279	-28.3471
	Dosis 25 µg	-18.36000*	.47384	.000	-19.9004	-16.8196
	Dosis 50 µg	-11.83750*	.47384	.000	-13.3779	-10.2971
	Dosis 100 µg	-6.51750*	.47384	.000	-8.0579	-4.9771
	Dosis 400 µg	6.04500*	.47384	.000	4.5046	7.5854
	Dosis 800 µg	7.54250*	.47384	.000	6.0021	9.0829
400	Dosis 0 µg	-35.93250*	.47384	.000	-37.4729	-34.3921
	Dosis 25 µg	-24.40500*	.47384	.000	-25.9454	-22.8646
	Dosis 50 µg	-17.88250*	.47384	.000	-19.4229	-16.3421
	Dosis 100 µg	-12.56250*	.47384	.000	-14.1029	-11.0221
	Dosis 200 µg	-6.04500*	.47384	.000	-7.5854	-4.5046
	Dosis 800 µg	1.49750	.47384	.060	-.0429	3.0379

800	Dosis 0 µg	-37.43000*	.47384	.000	-38.9704	-35.8896
	Dosis 25 µg	-25.90250*	.47384	.000	-27.4429	-24.3621
	Dosis 50 µg	-19.38000*	.47384	.000	-20.9204	-17.8396
	Dosis 100 µg	-14.06000*	.47384	.000	-15.6004	-12.5196
	Dosis 200 µg	-7.54250*	.47384	.000	-9.0829	-6.0021
	Dosis 400 µg	-1.49750	.47384	.060	-3.0379	.0429

2.6 Korelasi Pearson

		Indeks Adhesin Pili	Dosis
Indeks Adhesin Pili	Pearson Correlation	1	-.983**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	7	7
Dosis	Pearson Correlation	-.983**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	7	7



Lampiran 3. Indeks adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit BALB-C yang dipapar berbagai konsentrasi protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2

Dosis (µg)	Slide	Ulasan 1 (Per 100 Sel)	Ulasan 2 (Per 100 Sel)	Rata-Rata Per 100 Sel	Rata-Rata Per 1 Sel
0	1	3546	3476	3511	35,11
	2	3857	3965	3911	39,11
	3	3789	3643	3716	37,16
	4	3794	3634	3714	37,14
				rata-rata	37,13
25	1	3190	2956	3073	30,73
	2	3009	3045	3027	30,27
	3	3143	3127	3135	31,35
	4	3312	3290	3301	33,01
				rata-rata	31,34
50	1	2562	2512	2537	25,37
	2	2585	2745	2665	26,65
	3	2967	2653	2810	28,1
	4	2866	2946	2906	29,06
				rata-rata	27,295
100	1	1975	1865	1920	19,2
	2	2028	1928	1978	19,78
	3	2105	2001	2053	20,53
	4	1943	1865	1904	19,04
				rata-rata	19,6375
200	1	1432	1376	1404	14,04
	2	1533	1479	1506	15,06
	3	1583	1639	1611	16,11
	4	1264	1532	1398	13,98
				rata-rata	14,7975
400	1	1177	1153	1165	11,65
	2	1052	896	974	9,74
	3	976	1046	1011	10,11
	4	1068	980	1024	10,24
				rata-rata	10,435
800	1	589	165	377	3,77
	2	467	215	341	3,41
	3	588	178	383	3,83
	4	313	421	367	3,67
				rata-rata	3,67

Lampiran 4. Analisis statistik indeks adhesi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada sel enterosit usus halus mencit *BALB-C* yang dipapar berbagai konsentrasi protein OMP *Lactobacillus helveticus* C2

4.1 Uji Normalitas

Dosis	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Dosis 0 µg	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Dosis 25 µg	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Dosis 50 µg	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Dosis 100 µg	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Dosis 200 µg	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Dosis 400 µg	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Dosis 800 µg	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%

Tests of Normality

Dosis	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Dosis 0 µg	.252	4	.	.947	4	.696
Dosis 25 µg	.247	4	.	.916	4	.516
Dosis 50 µg	.190	4	.	.978	4	.891
Dosis 100 µg	.242	4	.	.920	4	.535
Dosis 200 µg	.274	4	.	.880	4	.337
Dosis 400 µg	.342	4	.	.847	4	.215
Dosis 800 µg	.250	4	.	.903	4	.447

4.2 Uji Homogenitas

Dosis (µg)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
0	4	38.1600	.56927	.28463	37.60	38.85
25	4	31.3400	1.19805	.59903	30.27	33.01
50	4	27.2950	1.62120	.81060	25.37	29.06
100	4	19.6375	.67460	.33730	19.04	20.53
200	4	14.7975	1.00560	.50280	13.98	16.11
400	4	10.4350	.83724	.41862	9.74	11.65
800	4	3.6700	.18547	.09274	3.41	3.83
Total	28	20.7621	11.53307	2.17955	3.41	38.85

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.493	6	21	.056

4.3 T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Ulasan 1	2.1074E3	7	1196.48538	452.22897
	Ulasan 2	1.9022E3	7	1050.16633	396.92556

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Ulasan 1 & Ulasan 2	7	.955	.001

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Ulasan 1 - Ulasan 2	2.05143E2	365.05932	137.97945	-132.48071	542.76642	1.487	6	.188

4.4 Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3571.551	6	595.258	632.352	.000
Within Groups	19.768	21	.941		
Total	3591.319	27			

4.5 Tukey

Dosis	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
800 µg	4	3.6700						
400 µg	4		10.4350					
200 µg	4			14.7975				
100 µg	4				19.6375			
50 µg	4					27.2950		
25 µg	4						31.3400	
0 µg	4							38.1600
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Multiple Comparisons

Tukey HSD

(I) Dosis	(J) Dosis	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	Dosis 25 µg	6.82000*	.68605	.000	4.5898	9.0502
	Dosis 50 µg	10.86500*	.68605	.000	8.6348	13.0952
	Dosis 100 µg	18.52250*	.68605	.000	16.2923	20.7527
	Dosis 200 µg	23.36250*	.68605	.000	21.1323	25.5927
	Dosis 400 µg	27.72500*	.68605	.000	25.4948	29.9552
	Dosis 800 µg	34.49000*	.68605	.000	32.2598	36.7202
25	Dosis 0 µg	-6.82000*	.68605	.000	-9.0502	-4.5898
	Dosis 50 µg	4.04500*	.68605	.000	1.8148	6.2752
	Dosis 100 µg	11.70250*	.68605	.000	9.4723	13.9327
	Dosis 200 µg	16.54250*	.68605	.000	14.3123	18.7727
	Dosis 400 µg	20.90500*	.68605	.000	18.6748	23.1352
	Dosis 800 µg	27.67000*	.68605	.000	25.4398	29.9002
50	Dosis 0 µg	-10.86500*	.68605	.000	-13.0952	-8.6348
	Dosis 25 µg	-4.04500*	.68605	.000	-6.2752	-1.8148
	Dosis 100 µg	7.65750*	.68605	.000	5.4273	9.8877
	Dosis 200 µg	12.49750*	.68605	.000	10.2673	14.7277
	Dosis 400 µg	16.86000*	.68605	.000	14.6298	19.0902
	Dosis 800 µg	23.62500*	.68605	.000	21.3948	25.8552
100	Dosis 0 µg	-18.52250*	.68605	.000	-20.7527	-16.2923
	Dosis 25 µg	-11.70250*	.68605	.000	-13.9327	-9.4723
	Dosis 50 µg	-7.65750*	.68605	.000	-9.8877	-5.4273
	Dosis 200 µg	4.84000*	.68605	.000	2.6098	7.0702
	Dosis 400 µg	9.20250*	.68605	.000	6.9723	11.4327
	Dosis 800 µg	15.96750*	.68605	.000	13.7373	18.1977
200	Dosis 0 µg	-23.36250*	.68605	.000	-25.5927	-21.1323
	Dosis 25 µg	-16.54250*	.68605	.000	-18.7727	-14.3123
	Dosis 50 µg	-12.49750*	.68605	.000	-14.7277	-10.2673
	Dosis 100 µg	-4.84000*	.68605	.000	-7.0702	-2.6098
	Dosis 400 µg	4.36250*	.68605	.000	2.1323	6.5927
	Dosis 800 µg	11.12750*	.68605	.000	8.8973	13.3577
400	Dosis 0 µg	-27.72500*	.68605	.000	-29.9552	-25.4948
	Dosis 25 µg	-20.90500*	.68605	.000	-23.1352	-18.6748
	Dosis 50 µg	-16.86000*	.68605	.000	-19.0902	-14.6298
	Dosis 100 µg	-9.20250*	.68605	.000	-11.4327	-6.9723
	Dosis 200 µg	-4.36250*	.68605	.000	-6.5927	-2.1323
	Dosis 800 µg	6.76500*	.68605	.000	4.5348	8.9952

800	Dosis 0 µg	-34.49000*	.68605	.000	-36.7202	-32.2598
	Dosis 25 µg	-27.67000*	.68605	.000	-29.9002	-25.4398
	Dosis 50 µg	-23.62500*	.68605	.000	-25.8552	-21.3948
	Dosis 100 µg	-15.96750*	.68605	.000	-18.1977	-13.7373
	Dosis 200 µg	-11.12750*	.68605	.000	-13.3577	-8.8973
	Dosis 400 µg	-6.76500*	.68605	.000	-8.9952	-4.5348

4.6 Korelasi Pearson

		Dosis	Indeks Adhesin OMP
Dosis	Pearson Correlation	1	-.998**
	Sig. (2-tailed)		.000
	Sum of Squares and Cross-products	28.000	-157.790
	Covariance	4.667	-26.298
	N	7	7
Indeks Adhesin OMP	Pearson Correlation	-.998**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	Sum of Squares and Cross-products	-157.790	893.032
	Covariance	-26.298	148.839
	N	7	7



Lampiran 5. Jumlah Koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR pada Feses Mencit BALB-C yang diinduksi dengan *Klebsiella pneumoniae* MDR dan diberi pelet *Lactobacillus helveticus* C2 setiap hari

Hari	Replikasi	Jumlah koloni pada medium Macckonkey per 1 cc		
		Homogenat Feses		Pelet
		K (-)	K (+)	
1	1	0	690000000	294000000
	2	0	228000000	780000000
	3	0	690000000	540000000
	4	0	279000000	267000000
	Rata-rata	0	471750000	470250000
2	1	0	710000000	89000000
	2	0	261000000	29600000
	3	0	730000000	90000000
	4	0	293000000	96000000
	Rata-rata	0	498500000	76150000
3	1	0	840000000	9800000
	2	0	291000000	3000000
	3	0	750000000	2580000
	4	0	300000000	7700000
	Rata-rata	0	545250000	5770000
4	1	0	960000000	1820000
	2	0	490000000	167000
	3	0	880000000	1650000
	4	0	430000000	4000000
	Rata-rata	0	690000000	1909250
5	1	0	980000000	98000
	2	0	520000000	20500
	3	0	910000000	10000
	4	0	500000000	14900
	Rata-rata	0	727500000	35850
6	1	0	1010000000	10200
	2	0	610000000	8340
	3	0	1250000000	8540
	4	0	640000000	5710
	Rata-rata	0	877500000	8197,5

Lampiran 6. Analisis statistik Kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada Feses Mencit BALB-C yang diinduksi dengan *Klebsiella pneumoniae* MDR dan diberi pelet *Lactobacillus helveticus* C2 setiap hari

6.1 Uji Normalitas

Case Processing Summary

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
kolonisasi	Kontrol (-)	24	100.0%	0	.0%	24	100.0%
	Kontrol (+)	24	100.0%	0	.0%	24	100.0%
	Pelet	24	100.0%	0	.0%	24	100.0%

Tests of Normality^b

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kolonisasi	Kontrol (+)	.133	24	.200*	.953	24	.321
	Pelet	.334	24	.000	.551	24	.000

6.2 Kruskal-Wallis

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kolonisasi	72	2.42E8	3.432E8	0	1.E9
Perlakuan	72	2.00	.822	1	3

Ranks

		N	Mean Rank
Kolonisasi	Kontrol (-)	24	12.50
	Kontrol (+)	24	59.08
	Pelet	24	37.92
	Total	72	

Test Statistics^{a,b}

	kolonisasi
Chi-Square	61.908
df	2
Asymp. Sig.	.000

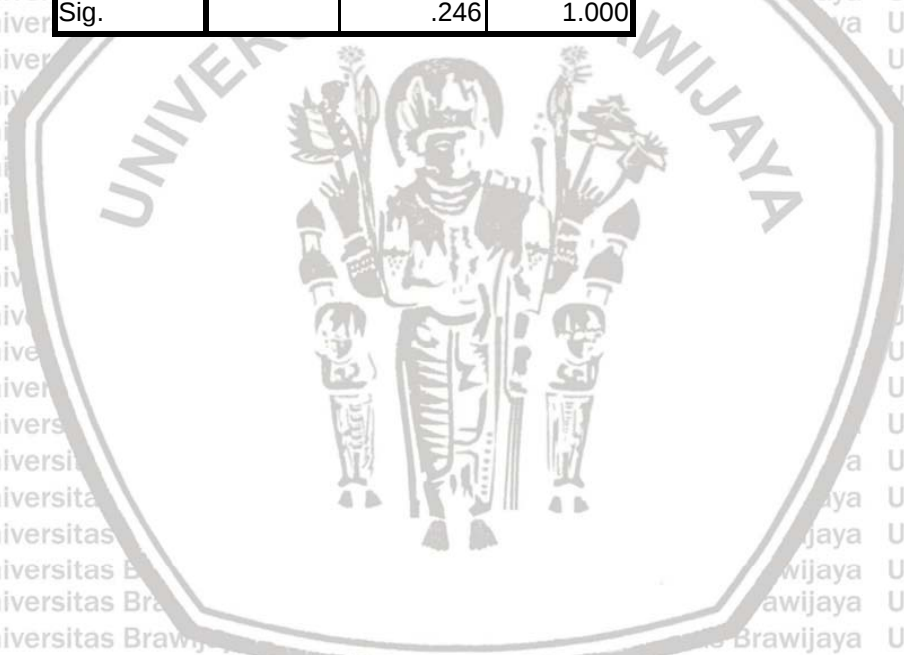
6.3 Tukey

Multiple Comparisons

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol (-)	Kontrol (+)	-6.351E8*	5.720E7	.000	-7.72E8	-4.98E8
	Pelet	-9.235E7	5.720E7	.246	-2.29E8	44669717.55
Kontrol (+)	Kontrol (-)	6.351E8*	5.720E7	.000	4.98E8	7.72E8
	Pelet	5.427E8*	5.720E7	.000	4.06E8	6.80E8
Pelet	Kontrol (-)	9.235E7	5.720E7	.246	-4.47E7	2.29E8
	Kontrol (+)	-5.427E8*	5.720E7	.000	-6.80E8	-4.06E8

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Kontrol (-)	24	.00	
Pelet	24	9.23E7	
Kontrol (+)	24		6.35E8
Sig.		.246	1.000



Lampiran 7. Jumlah Koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR pada Feses Mencit BALB-C yang diinduksi dengan *Klebsiella pneumoniae* MDR dan diberi CFS *Lactobacillus helveticus* C2 setiap hari

Hari	Replikasi	Jumlah koloni pada medium Macckonkey per 1 cc		
		Homogenat Feses		CFS
		K (-)	K (+)	
1	1	0	690000000	630000000
	2	0	228000000	660000000
	3	0	690000000	291000000
	4	0	279000000	299000000
	Rata-rata	0	471750000	470000000
2	1	0	710000000	245000000
	2	0	261000000	500000000
	3	0	730000000	148000000
	4	0	293000000	207000000
	Rata-rata	0	498500000	275000000
3	1	0	840000000	204000000
	2	0	291000000	283000000
	3	0	750000000	104000000
	4	0	300000000	172000000
	Rata-rata	0	545250000	190750000
4	1	0	960000000	194000000
	2	0	490000000	113000000
	3	0	880000000	96000000
	4	0	430000000	158000000
	Rata-rata	0	690000000	140250000
5	1	0	980000000	163000000
	2	0	520000000	97000000
	3	0	910000000	74000000
	4	0	500000000	113000000
	Rata-rata	0	727500000	111750000
6	1	0	1010000000	14700000
	2	0	610000000	2680000
	3	0	1250000000	5000000
	4	0	640000000	9900000
	Rata-rata	0	877500000	8070000

Lampiran 8. Analisis statistik Kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada Feses Mencit BALB-C yang diinduksi dengan *Klebsiella pneumoniae* MDR dan diberi CFS *Lactobacillus helveticus* C2 setiap hari

8.1 Uji Normalitas

Case Processing Summary

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
kolonisasi	Kontrol (-)	24	100.0%	0	.0%	24	100.0%
	Kontrol (+)	24	100.0%	0	.0%	24	100.0%
	Supernatan	24	100.0%	0	.0%	24	100.0%

Tests of Normality^b

perlakuan		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kolonisasi	Kontrol (+)	.133	24	.200 [*]	.953	24	.321
	Supernatan	.191	24	.024	.843	24	.002

8.2 Kruskal-Wallis

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
kolonisasi	72	2.78E8	3.277E8	0	1.E9
perlakuan	72	2.33	1.256	1	4

Ranks

perlakuan		N	Mean Rank
kolonisasi	Kontrol (-)	24	12.50
	Kontrol (+)	24	58.67
	Supernatan	24	38.33
	Total	72	

Test Statistics^{a,b}

	kolonisasi
Chi-Square	60.927
df	2
Asymp. Sig.	.000

8.3 Tukey

Multiple Comparisons
Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol (-)	Kontrol (+)	-6.351E8*	5.560E7	.000	-7.68E8	-5.02E8
	Supernatan	-1.993E8*	5.560E7	.002	-3.32E8	-6.61E7
Kontrol (+)	Kontrol (-)	6.351E8*	5.560E7	.000	5.02E8	7.68E8
	Supernatan	4.358E8*	5.560E7	.000	3.03E8	5.69E8
Supernatan	Kontrol (-)	1.993E8*	5.560E7	.002	66132175.36	3.32E8
	Kontrol (+)	-4.358E8*	5.560E7	.000	-5.69E8	-3.03E8

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol (-)	24	.00		
Supernatan	24		1.99E8	
Kontrol (+)	24			6.35E8
Sig.		1.000	1.000	1.000



Lampiran 9. Jumlah Koloni *Klebsiella pneumoniae* MDR pada Usus Mencit BALB-C diinduksi dengan *Klebsiella pneumoniae* MDR dan diberi Pelet atau CFS *Lactobacillus helveticus* C2 setiap hari

Replikasi	Jumlah koloni pada medium Macckonkey per 1 cc Homogenat Feses			
	K (-)	K (+)	Pelet	Supernatan
1	0	1280000000	3000	9100000
2	0	860000000	2100	285000
3	0	2090000000	5400	106000
4	0	730000000	510	800000
Rata-rata	0	1240000000	2752,5	2572750



Lampiran 10. Analisis statistik Kolonisasi *Klebsiella pneumoniae* MDR pada Usus Mencit *BALB-C* diinduksi dengan *Klebsiella pneumoniae* MDR dan diberi Pelet atau CFS *Lactobacillus helveticus* C2 setiap hari

10.1 Uji Normalitas

Case Processing Summary

Perlakuan	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Kontrol (-)	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Kontrol (+)	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Pelet	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Supernatan	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%

Tests of Normality^b

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kontrol (+)	.236	4	.	.958	4	.767
Pelet	.210	4	.	.964	4	.803
Supernatan	.341	4	.	.831	4	.169

10.2 Uji Homogenitas

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Kontrol (-)	4	1.0000	.00000	.00000	1.00	1.00
Kontrol (+)	4	2.2474E4	3196.78941	1.59839E3	18574.18	26400.76
Pelet	4	2.1604E4	1745.65098	8.72825E2	19849.43	23811.76
Supernatan	4	2.1857E4	2083.12324	1.04156E3	20223.75	24899.80
Total	16	1.6484E4	10011.44206	2.50286E3	1.00	26400.76

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.798	3	12	.201

10.3 Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.451E9	3	4.835E8	109.857	.000
Within Groups	5.282E7	12	4401540.582		
Total	1.503E9	15			

10.4 Tukey

Multiple Comparisons

		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) perlakuan	(J) perlakuan				Lower Bound	Upper Bound
Kontrol (-)	Kontrol (+)	-2.24731E4*	1.48350E3	.000	-26877.4680	-18068.7423
	Pelet	-2.16026E4*	1.48350E3	.000	-26006.9396	-17198.2139
	Supernatan	-2.18564E4*	1.48350E3	.000	-26260.7517	-17452.0260
Kontrol (+)	Kontrol (-)	22473.10519*	1.48350E3	.000	18068.7423	26877.4680
	Pelet	870.52845	1.48350E3	.934	-3533.8344	5274.8913
	Supernatan	616.71630	1.48350E3	.975	-3787.6466	5021.0792
Pelet	Kontrol (-)	21602.57674*	1.48350E3	.000	17198.2139	26006.9396
	Kontrol (+)	-870.52845	1.48350E3	.934	-5274.8913	3533.8344
	Supernatan	-253.81215	1.48350E3	.998	-4658.1750	4150.5507
Supernatan	Kontrol (-)	21856.38889*	1.48350E3	.000	17452.0260	26260.7517
	Kontrol (+)	-616.71630	1.48350E3	.975	-5021.0792	3787.6466
	Pelet	253.81215	1.48350E3	.998	-4150.5507	4658.1750

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Kontrol (-)	4	1.0000	
Pelet	4		2.1604E4
Supernatan	4		2.1857E4
Kontrol (+)	4		2.2474E4
Sig.		1.000	.934