

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bisa Ular

Antimicrobial peptides (AMP) merupakan komponen esensial pada *innate immune system* hewan dan merupakan lini pertama pertahanan imun pada berbagai macam organisme, termasuk tanaman, insekta, bakteri dan vertebrata (Sachidananda *et al.*, 2007). Konsentrasi AMP paling tinggi ditemukan pada jaringan sel hewan yang terekspos oleh mikroba atau tipe sel yang berperan sebagai *host defence* (Ganz, 2003). AMP memiliki kemampuan untuk membunuh bakteri Gram positif dan negatif, fungi, parasit, sel kanker dan virus berenvelop seperti HIV dan HSV (Sachidananda *et al.*, 2007). Diduga ular pemakan tikus akan cenderung terinfeksi bakteri patogen pada tikus sehingga akan memiliki AMP pada tubuhnya, tak terkecuali pada bisa (Sagheer *et al.*, 2014).

Berbagai penelitian telah membuktikan adanya sifat antimikroba pada beberapa jenis bisa ular. Pada sebuah penelitian tahun 1986 oleh Stocker dan Traynor, didapatkan efek antimikroba pada bisa ular *Naja sputatrix* dan *Vipera russelli* terhadap *E. coli* dengan cara mengubah permeabilitas sel bakteri dan menyebabkan lisis. Pada penelitian lain ditemukan bahwa bisa ular *Naja sumatrana* memiliki efek antimikroba pada *S. aureus* dan *E. coli* sementara

Indian cobra (Naja naja naja) dan *Bungarus candidus* atau ular weling memiliki efek antimikroba pada *S. aureus* (Samy *et al.*, 2006). Pada tahun 2014 Sagheer dan kawan-kawan menemukan efek antimikroba pada bisa ular *Naja naja karachiensis* terhadap *E. coli*, MRSA, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* dan *F. solani*. Pada tahun 2005, Lima dan kawan-kawan menyebutkan bisa ular *Naja melanoleuca*, *Naja annulifera* dan *Naja mossambica* sensitif terhadap bakteri *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *Bacterioides fragilis*, *Bacterioides intermedius*, *Clostridium sordellii* dan *Clostridium perfringes*.

Phospholipase A₂ (PLA₂) merupakan enzim yang ditemukan pada berbagai jenis bisa ular. PLA₂ menyebabkan timbulnya berbagai gejala dalam kasus gigitan ular dengan mengganggu sistem homeostasis dengan sifat antikoagulan dan antiplatelet, selain itu PLA₂ juga memiliki efek myotoksik dan menginduksi inflamasi (Lima *et al.*, 2005). PLA₂ juga mengekspresikan sifat neurotoksin dengan cara mengganggu pelepasan *acetylcholine* yang menyebabkan gangguan pada fungsi sinaps (Hong, 2004). Selain memiliki efek toksik, PLA₂ diduga memiliki efek antimikroba yang dapat menghidrolisa membran *phospholipid* bakteri (Lima *et al.*, 2005). Interaksi elektrostatis antara PLA₂ dengan membran bakteri menyebabkan lubang bermuatan negatif pada *peptidoglycan* membran sel bakteri (Barbosa *et al.*, 2005). Selain itu dalam bisa ular juga terdapat *metalloproteinase* dan *L-amino acid oxidase* (LAAO) yang juga memiliki sifat antimikroba (Junior *et al.*, 2013). Aktivitas bakteriosidal pada LAAO berhubungan dengan produksi hidrogen peroksida yang dapat merusak membran plasma dan sitoplasma target (Izidoro, 2014). *Metalloproteinase* merupakan komponen utama pada kebanyakan bisa ular *viripid* dan *crotalid* (Kamiguti *et al.*, 1998). Pada sebuah penelitian mengenai efek

metalloproteinase bisa ular *Agkistrodon halys* ditemukan efek antimikroba dengan mengubah membran sel bakteri (Samy *et al.*, 2008).

Pada sebuah studi mengenai *Chinese cobra (Naja atra)* ditemukan sebuah peptida bernama *cathelacidin* yang memiliki sifat antimikroba dan antifungi yang berpotensi digunakan sebagai obat (Hoek, 2014). Bisa ular *Oxyuranus microlepidotus* dari Australia memiliki sebuah peptida bernama *omwaprin* yang memiliki efek antimikroba dengan cara merusak membran sel bakteri dan terbukti tidak toksik pada pemberian dosis 10 mg/kg secara intraperitoneal pada mencit *swiss albino* (Nair *et al.*, 2007).

Sebuah penelitian menemukan bahwa bisa ular *Naja naja* memiliki efek hemolisis yang signifikan, namun sebuah peptida bernama *naja antibacterial peptide* (NAP) yang terdapat pada bisa ular tersebut tidak menunjukkan efek hemolisis dan memiliki efek antimikroba pada bakteri *E. coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus pyogenes*. NAP bekerja pada kation membran luar bakteri yang menyebabkan perubahan dari membran bilayer luar dari bakteri (Sachidananda *et al.*, 2007).

Peptida dan protein dari bisa berbagai jenis ular memiliki efek terapi langsung yang dibatasi oleh sifat antigenik dari bisa tersebut, akan tetapi bisa ular dapat di degradasi oleh sistem digestif manusia dan dapat berguna untuk mengatasi kontaminasi bakteri pada makanan (Lima *et al.*, 2005).

2.2 *Naja sputatrix*

2.2.1 Ular *Naja sputatrix*

Naja Sputatrix atau biasa dikenal sebagai ular sendok atau ular kobra merupakan salah satu spesies ular berbisa yang penting secara medis dan terdapat di Indonesia. *Naja Sputatrix* dapat ditemukan di berbagai pulau di Indonesia, antara lain di Pulau Jawa, Bali, Lombok, Sumbawa, Padar, Rinca, Komodo, Flores, Adonara, Lombok dan Alor (IUCN, 2012). Ular ini dikenal dengan ciri khas dapat melebarkan bagian kepalanya dan berdiri saat merasa terancam, *Naja Sputatrix* juga dapat menyemburkan bisanya sebagai pertahanan dan termasuk binatang nocturnal yang hidup di darat (afpmb, 2015). Ular ini biasa hidup di dataran rendah hingga ketinggian sekitar 600 meter dari permukaan laut (IUCN, 2012). Ular ini berasal dari family *Elipidae*, *Subfamily Elapinae* dan *Genus Naja Species sputatrix* dengan panjang ular dewasa kurang lebih adalah 1,3 meter dan dapat tumbuh maksimal sampai 1,85 meter (The University of Adelaide, 2014). Pada umumnya ular dari *family Elapidae* memiliki tubuh yang relatif panjang, tipis atau kurus serta bersisik simetris dan besar (WHO, 2010). Spesies *Naja naja* sendiri dibagi lagi ke dalam 10 subspecies (Lachumanan *et al.*, 1999).

Kelenjar bisa dari *family Elapidae* terdapat pada bagian di belakang mata dan dikelilingi oleh otot yang berfungsi saat injeksi bisa, gigi taring *Elipidae* terdapat pada *maxilla* di daerah depan dari mulut ular yang dapat meinginjeksikan bisa ke dalam mangsa alami ular tersebut secara efisien, *Naja sputatrix* yang merupakan salah satu dari *spitting cobras* dapat menyemburkan

bisanya dengan tujuan untuk menyerang mata dari organisme yang dianggap mengancam (WHO, 2010).

Ular berbisa menyimpan bisa mereka dalam jangka waktu yang lama seperti saat hibernasi dan tetap siap digunakan saat ada mangsa atau untuk keperluan perlindungan diri. Apabila terjadi deplesi manual seperti di ambil oleh manusia, epitel sekretori akan segera mensintesis protein yang akan selesai dalam jangka waktu enam belas hari (Weinstein *et al.*, 2009). Karena akumulasi bisa yang cepat dan proses adaptasi, ular ini dapat menyemprotkan bisanya (Lachumanan *et al.*, 1999).



Gambar 2.1 Ular *Naja sputatrix* (VenomStreet., 2016)

2.2.2 Bisa Ular *Naja sputatrix*

Terdapat berbagai enzim pada bisa ular *Naja sputatrix* yang menyebabkan bisa ini sangat berbahaya. Menurut sebuah penelitian oleh Tan dan Tan pada tahun 1987 pada bisa ular *Naja sputatrix* terdapat enzim *L-amino acid oxidase* (LAAO), *alkaline phosphomonoesterase*, *acetylcholinesterase*, *phospholipase A₂* (PLA₂), *5'-nucleotidase* dan *hyaluronidase*.

Naja sputatrix memiliki bisa yang bersifat neurotoksin yang memiliki potensi sangat tinggi, sehingga hanya dalam dosis kecil sudah dapat menyebabkan paralisis dengan target spesifik reseptor acetylcholine pada membrane postsinaps yang menyebabkan inhibisi dari transmisi impuls dari saraf (Lachumanan *et al.*, 1999). Enam puluh persen dari total bisa *Naja sputatrix* adalah bisa yang bersifat kardiotoxin yang dapat menimbulkan efek lisis secara langsung pada eritrosit dan induksi edema yang kuat pada manusia (Hong, 2004). Kardiotoxin dan neurotoksin dari *Naja sputatrix* memiliki kemiripan protein di mana terdapat 60-65 residu asam amino pada kedua protein tersebut (Donghui *et al.*, 2002). Pada bisa ini juga terdapat enzim PLA₂ yang dapat menyebabkan edema dan memiliki efek antikoagulan (Hong, 2004). Aksi nekrosis lokal dari bisa *Naja sputatrix* diduga merupakan aksi sinergis dari kardiotoxin dan enzim *phospholipase* (Lachumanan *et al.*, 1999). Pada kasus gigitan *Naja* pada umumnya, toksin dapat menyebabkan penghancuran protein dan jaringan ikat yang menjadi faktor penyebab aritmia dan disfungsi ventrikel (Richard dan Daly, 2004). Efek lain dari bisa *Naja sputatrix* adalah turunnya tekanan darah serta depresi pada saraf otot, detak jantung dan laju pernafasan (Yee *et al.*, 2010).

Selain memiliki efek toksik, PLA₂ diduga memiliki efek antimikroba yang dapat menghidrolisa membran *phospholipid* bakteri. Interaksi elektrostatis antara PLA₂ dengan membran bakteri menyebabkan lubang bermuatan negatif pada *peptidoglycan* membran sel bakteri (Barbosa *et al.*, 2005). L-amino acid oxidase (LAAO) juga memiliki sifat antimikroba (Lima *et al.*, 2005). Aktivitas bakteriosidal pada LAAO berhubungan dengan produksi hidrogen peroksida yang dapat merusak membran plasma dan sitoplasma target (Izidoro, 2014).

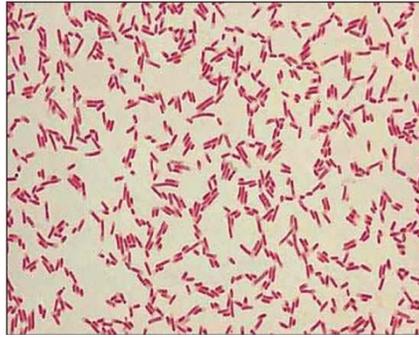
Pada sebuah penelitian tahun 1986 oleh Stocker dan Traynor, didapatkan efek antimikroba pada bisa ular *Naja sputatrix* dan *Vipera russelli* terhadap *E. coli* dengan cara mengubah permeabilitas sel bakteri dan menyebabkan lisis (Junior *et al.*, 2013). Protein dengan berat molekul rendah pada *Naja sp* terbukti dapat merusak membran *phospholipid Staphylococcus aureus* dan *E.coli* (Lima *et al.*, 2005).

Peptida dan protein dari bisa berbagai jenis ular memiliki efek terapi langsung yang dibatasi oleh sifat antigenik dari bisa tersebut, akan tetapi bisa ular dapat di degradasi oleh sistem digestif manusia dan dapat berguna untuk mengatasi kontaminasi bakteri pada makanan (Lima *et al.*, 2005).

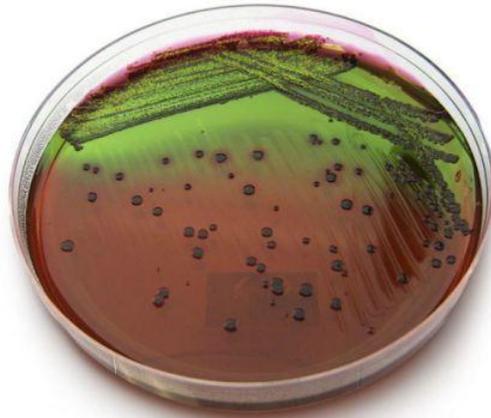
2.3 *Escherichia coli*

2.3.1. Karakteristik dan Morfologi

Escherichia coli (*E. coli*) merupakan bagian dari *kingdom Bacteria*, *phylum Proteobacteria*, *class Gamma Proteobacteria*, *order Enterobacteriales*, *family Enterobacteriaceae*, *genus Escherichia*, dan *species E. coli* (Todar, 2012). Pada pengecatan Gram, *E. coli* akan terlihat berwarna pink dengan bentuk batang yang menandakan *E. coli* adalah bakteri batang Gram negatif (Zinnah *et al.*, 2007). *E. coli* adalah bakteri fakultatif anaerob yang memfermentasikan glukosa dan memproduksi energi dengan mereduksi nitrate dan nitrite (Harvey, 2007). Gambar *E. coli* pada pengecatan Gram dan pembiakan pada media EMB dapat dilihat pada gambar 2.2 dan 2.3.



Gambar 2.2 *E. coli* pada pewarnaan Gram, berbentuk batang, Gram negatif (Thairu et al., 2014)



Gambar 2.3 *E. coli* pada media EMB, gambaran metallic sheen (Acharya., 2013)

E. coli merupakan organisme *peritrichous*, yaitu memiliki *flagella* di banyak tempat pada permukaan selnya (Guentzel, 1996). Flagela yang menonjol dari permukaan sel bakteri dapat menimbulkan gaya gerak (Wang et al., 2003). *E. coli* memiliki pili yang dibagi menjadi 2 tipe, yaitu *common pili* yang berjumlah banyak dan pendek serta *sex pili* yang panjang dan berjumlah sedikit, *sex pili* akan menempelkan bakteri jantan dan betina saat konjugasi (Salton dan Kim, 1996). Isolat *E. coli* dapat membentuk koloni berwarna merah muda atau *pink* pada *MacConkey agar*, koloni berwarna hijau kekuningan pada *Brilliant*

Green agar dan koloni berwarna *metallic sheen* pada EMB agar (Zinnah *et al.*, 2007). Tes motilitas, katalase, *indole*, *lysine decarboxylase* dan fermentasi mannitol akan positif pada *E. coli* (Kadhim, 2011).

Terdapat 6 *pathotype* yang merupakan strain *E. coli* patogen yang dibedakan berdasarkan virulensinya, yaitu *Shiga toxin-producing E. coli* (STEC) atau biasa juga disebut enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC), *Enteropathogenic E. coli* (EPEC), *Enteroaggregative E. coli* (EAEC), *Enteroinvasive E. coli* (EIEC) dan *Diffusely adherent E. coli* (DAEC) (CDC, 2014). Tidak seperti strain *E. coli* yang lain, EHEC dapat memfermentasikan sorbitol dengan lambat dan strain EIEC biasanya tidak memfermentasikan laktosa (Harvey, 2007).

2.3.2. Struktur dan Antigen

Escherichia coli merupakan flora normal *colon* pada manusia yang biasanya tidak patogen (Stenutz *et.al.*, 2006). Terdapat berbagai macam struktur antigen pada *E. coli* yang berperan dalam proses pathogenesis. Strain *E. coli* patogen memiliki faktor adhesin spesifik yang menyebabkan *E. coli* dapat membentuk koloni di tempat yang tidak biasa ia tempati seperti usus halus dan uretra (Kaper *et al.*, 2004).

Serotipe *E. coli* dibagi berdasarkan antigen *somatic* (O), *flagellar* (H) dan *capsular polysaccharide* (K) (Stenutz *et.al.*, 2006). Antigen O dan H merupakan antigen sangat *polymorphic* (Wang *et al.*, 2003). Spesifitas serologis pada antigen O didasarkan pada perbedaan komponen gula, ikatan dan ada tidaknya substitusi grup *acetyl* (Guentzel, 1996). Hilangnya antigen O karena mutasi

biasanya disertai perubahan tipe koloni, aglutinasi *saline* serta hilangnya virulensi bakteri (Guentzel, 1996). Antibodi untuk antigen O biasanya adalah IgM (Kadhim, 2011). Antigen O resisten terhadap panas dan alkohol dan biasanya dideteksi dari aglutinasi bakteri (Kadhim, 2011). Antigen H merupakan antigen *flagellar* yang terdiri atas 56 tipe (Evans dan Evans, 1996). Terdapat subunit protein pada flagela yang membawa spesifitas antigen H bernama *Flagellin* (Wang *et al.*, 2003).

Antigen K berada eksternal dari antigen O (Kadhim, 2011). Antigen K atau antigen kapsul merupakan komponen *polysaccharide* dan beberapa diantaranya merupakan *pilus like protein* (Guentzel, 1996). Antigen K berhubungan dengan kapsul atau terkadang berhubungan dengan *fimbriae* (Harvey, 2007). Strain *E. coli* yang memproduksi antigen K1 prominen pada meningitis neonatus (Kadhim, 2011). Terdapat 50 H, 90 K dan 160 O antigen yang telah diidentifikasi dari berbagai strain *E. coli* (Guentzel, 1996). Banyak isolat *E. coli* memproduksi antigen *heat labile* yang tidak berhubungan dengan antigen O dan H yang disebut *pili* dan menyebabkan aglutinasi apabila bercampur dengan eritrosit (Evans dan Evans, 1996). Bagian *lipid A* pada *Lipopolysaccharide* (LPS) pada membran luar *E. coli* merupakan *endotoxic* (Guentzel, 1996).

Setiap strain *E. coli* patogenik memiliki antigen khusus yang menyebabkan perbedaan manifestasi klinis yang terjadi. *Verotoxin* pada EHEC mengakibatkan inflamasi yang berperan dalam terjadinya *hemolytic uremic syndrome* (HUS), selain itu EHEC juga memiliki *fimbriae* yang turut berperan dalam proses pathogenesis (Todar, 2012). Pada serotipe *E. coli* penghasil *verotoxin*, O157:H7 merupakan yang paling sering dan merupakan salah satu

yang bisa diidentifikasi pada spesimen klinis (Kadhim, 2011). Strain EHEC ditemukan dengan serogrup O157, O26, O111, O145 dan lainnya, akan tetapi yang paling sering ditemukan sebagai penyebab *hemolytic-uremic* (HUS) adalah O157:H7 (Kayser *et al.*, 2005). EHEC juga memiliki *hemolysin* bekerja dengan membunuh sel target dengan memasukkan dirinya ke dalam membran sel yang menyebabkan pembentukan lubang dan lisis dari sel tersebut (Bielaszewska *et al.*, 2013).

EPEC berkoloni di permukaan mukosa usus halus dan mengeluarkan enterotoksin yang dapat meningkatkan sekresi usus (Kaper *et al.*, 2004). EPEC memiliki *heat labile enterotoxin* dan *heat stable toxins* *Sta* serta *STb* (Kayser *et al.*, 2005). *Heat-labile enterotoxin* EPEC memiliki ukuran molekul, sifat antigen dan fungsi seperti toksin kolera serta *heat stable toxin* (*St*) yang tahan terhadap perebusan selama 30 menit (Todar, 2012). Beberapa strain EPEC memproduksi *exotoxin* yang bersifat *heat labile* (*Lt*) dengan berat molekul 80.000 dan secara genetik dikontrol oleh plasmid (Kadhim, 2011). Enterotoksin pada EPEC termasuk *St* bekerja dengan meningkatkan tingkat cyclic guanosine monophosphate (cGMP) sel, sementara *Lt* meningkatkan *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) (Harvey, 2007). EPEC juga memiliki toksin *Enterotoxin Aggregative St* yang dikode oleh plasmid *heat labile* dan *hemolysin* yang berperan pada infeksi saluran kencing (Todar, 2012). Pada sebuah penelitian di USA ditemukan bahwa *St* pada EPEC dapat mensupresi proliferasi sel kanker kolon melalui kaskade sinyal *guanylyl cyclase C-mediated* (Pitari *et al.*, 2003). *Hemolysin* menyebabkan hemolisis dengan cara membuat lubang pada membran eritrosit (Skals *et al.*, 2008).

ETEC memiliki specialized *pili* yang dapat berperan sebagai *ligand* untuk menempel pada reseptor pada sel epitel usus halus (Evans dan Evans, 1996). *Colonization-factor antigens* (CFA) yang merupakan *attachment pili* menyebabkan ETEC dapat menempelkan dirinya pada usus halus sehingga terlindung dari *rapid removal* oleh gerakan peristaltik usus (Kayser *et al.*, 2005). *Fimbriae adhesin* pada ETEC bersifat spesifik untuk setiap spesies, contohnya antigen *fimbriae* K-88 ditemukan pada strain dari *piglet*, antigen *fimbriae* K-99 ditemukan pada strain dari anak sapi dan anak biri-biri, CFA I dan CFA 2 ditemukan pada strain dari manusia (Todar, 2012). ETEC juga merupakan penyebab penting dari diare pada hewan, strain hewan ini mengekspresikan antigen K88 dan K99 yang tidak didapatkan pada ETEC strain manusia (Kaper *et al.*, 2004).

EPEC *adherence factor* (EAF) menyebabkan EPEC dapat menempel pada sel usus, sementara *Intimin* merupakan *non fimbrial adherence factor* pada membran luar EPEC yang berguna untuk menempel pada permukaan usus (Todar, 2012). Setelah EPEC menempel pada sel epitel usus dengan EAF, bakteri ini menginjeksikan molekul toksik ke dalam *enterocyte* dengan menggunakan sistem sekresi tipe III, yaitu dengan membentuk *needle complex* (Kayser *et al.*, 2005).

EAEC memproduksi *Shiga like toxin* (Stx) dan *hemolysin* (Kadhim, 2011). Seperti pada EHEC dan ETEC, EAEC juga memiliki *hemolysin* yang membunuh sel host dan menyebabkan lisis dari sel darah merah sementara *siderophores* tipe *hydroxamate* (*aerobactin*) dan *phenolate* (*enterochelin*) melucuti *iron* dari *transferrin* dan *lactoferrin* (Guentzel, 1996). EAEC juga

memproduksi toksin yang mirip dengan Sta pada ETEC (Kayser *et al.*, 2005). *Flagellin* pada EAEC menginduksi pelepasan IL-8 (Steiner *et al.*, 2000).

Kebanyakan strain *E. coli* pathogen tetap berada di ekstraseluler dan dapat masuk ke dalam sel epitel tetapi tidak dapat bereplikasi di intrasel, akan tetapi EIEC merupakan pathogen intraseluler yang mampu menginvasi dan bereplikasi di dalam sel epitel dan makrofag, (Kaper *et al.*, 2004). EIEC memiliki adhesin spesifik seperti pada bakteri *Shigella* (Todar, 2012). Hal itu menyebabkan EIEC menyebabkan penyakit yang mirip dengan shigellosis (Kadhim, 2011). EIEC dapat dibedakan dengan *Shigella* dengan beberapa tes *biochemical minor* (Kaper *et al.*, 2004). EIEC menginvasi sel epitel usus besar, melisiskan fagosom, multiplikasi dan berpindah ke sel lain dengan *nucleating action microfilament*, EIEC dapat berpindah secara langsung dari satu sel epitel ke epitel lain atau dengan keluar terlebih dahulu lalu masuk kembali ke membran plasma basolateral (Kaper *et al.*, 2004).

Kurang lebih 75% dari strain DAEC memproduksi *adhesin fimbrial* yang disebut F1845, selain itu DAEC juga memiliki efek sitopatik yang menyebabkan pertumbuhan ekstensi sel usus yang membungkus bakteri yang menempel (Kaper *et al.*, 2004).

Galur *E. coli* yang diisolasi dari infeksi ekstraintestinal biasanya memiliki beberapa antigen yang tidak dimiliki isolat *E. coli* dari feses, seperti hemolysins, plasmid colicin V, siderophores aerobactin dan enterochelin serta *special pilial antigen* yang berfungsi untuk perlekatan pada sel target (Guentzel, 1996). *Hemolysin* pada *E. coli* ditemukan dapat menginduksi osilasi Ca^{2+} pada sel epitel ginjal, menyebabkan peningkatan produksi IL-6 dan IL-8 (Uhlén *et al.*, 2000). Sekresi *vacuolating cytotoxin* bernama Sat dapat merusak glomerulus

dan epitel di sekitarnya (Guyer *et al.*, 2000). Pada beberapa kasus, barier berupa tubulus proksimal setebal satu sel bocor dan bakteri dapat memasuki sel endothel, memasuki aliran darah dan terjadilah bakterimia (Kaper *et al.*, 2004).

Bacteriocins merupakan protein antibakteria yang diproduksi suatu bakteri untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri (Cleveland *et al.*, 2001). *E. coli* memproduksi *bakteriocin* bernama *colicin* (Kadhim, 2011).

2.3.3. Patogenesis dan Manifestasi Klinis Infeksi *E. coli*

Strain *E. coli* patogenik memiliki patogenesis yang mirip dengan patogen mukosa yang terdiri atas kolonisasi pada mukosa, menghindari pertahanan inang, multiplikasi dan merusak inang (Kaper *et al.*, 2004).

EHEC merupakan penyebab diare pada manusia, kambing, dan binatang ternak (Zinnah *et al.*, 2007). EHEC menyebabkan *haemorrhagic colitis*, diare tidak berdarah dan *haemolytic uremic syndrom* (Kaper *et al.*, 2004). EHEC menempel pada sel usus besar, lalu memproduksi *verotoxin* atau *shiga-like toxin* (Stx) dan menyebabkan diare berdarah yang parah atau *hemorrhagic colitis* tanpa adanya inflamasi atau invasi pada mukosa (Harvey, 2007). Apabila Stx di absorpsi secara sistemik dapat terjadi komplikasi yang mengancam jiwa (Kaper *et al.*, 2004). EHEC dapat menyebabkan HUS dengan tanda demam, *acute renal failure* (ARF), *microangiopathic hemolytic anemia* dan *thrombocytopenia* pada anak di bawah lima sampai sepuluh tahun (Harvey, 2007). HUS terjadi 5% dari kasus infeksi EHEC (Kayser *et al.*, 2005). Beberapa makanan yang dilaporkan berhubungan dengan infeksi EHEC diantaranya adalah sosis, susu yang tidak dipasteurisasi, selada, melon, jus apel dan *radish*

sprouts (Kaper *et al.*, 2004). Karena reservoir utama dari EHEC adalah hewan ternak, resiko infeksi dapat dikurangi dengan memasak daging dengan benar dan pasteurisasi susu (Harvey, 2007). Dosis infeksi EHEC sangat rendah yaitu kurang dari 100 sel (Kaper *et al.*, 2004).

ETEC merupakan penyebab penting diare pada anak di negara berkembang dan merupakan penyebab utama diare pada wisatawan (Russo dan Johnson, 2004). ETEC juga menyebabkan diare pada populasi endemis, wisatawan dan hewan ternak (Pitari *et al.*, 2003). Gejala klinis infeksi ETEC adalah diare cair yang masif dan dapat terjadi pada berbagai usia (Kayser *et al.*, 2005). ETEC bersifat *non-invasive* (Todar, 2012). ETEC menempel pada *enterocyte* usus halus dan menginduksi diare cair dengan sekresi enterotoksin Lt dan atau St (Kaper *et al.*, 2004). ETEC menyebabkan hipersekresi berkepanjangan dari ion chlor dan air pada sek mukosa usus serta menghambat reabsorpsi natrium (Harvey, 2007). Tidak hanya pada manusia, ETEC juga menjadi penyebab diare pada babi, kambing, domba, binatang ternak, anjing dan kuda (Zinnah *et al.*, 2007).

EPEC merupakan penyebab penting diare pada bayi terutama di daerah dengan sanitasi buruk, dan dapat terinfeksi baik saat di dalam maupun di luar janin (Harvey, 2007). Kasus infeksi EPEC kini jarang terjadi pada negara industri akan tetapi masih menjadi penyebab kematian di negara berkembang (Kayser *et al.*, 2005). EPEC menempel pada *enterocyte* usus halus, merusak mikrovili, menyebabkan lesi dan merusak sitoskeleton yang nantinya akan menyebabkan proses inflamasi (Kaper *et al.*, 2004). EPEC yang menempel pada *microvili* mengeluarkan *shiga-like toxin* dan menyebabkan terjadi diare cair (Harvey, 2007). Diare disebabkan oleh beberapa mekanisme, diantaranya

adalah peningkatan sekresi ion secara aktif, meningkatnya permeabilitas usus, inflamasi dan hilangnya mikrovili yang berfungsi untuk absorpsi (Kaper *et al.*, 2004). EPEC juga merupakan penyebab diare pada kelinci, kucing, anjing dan kuda (Zinnah *et al.*, 2007).

Tidak semua infeksi EAEC menimbulkan gejala, tetapi ada beberapa gejala yang biasa dilaporkan, yaitu diare cair baik dengan atau tanpa darah dan lendir, sakit perut, mual, muntah dan demam ringan (Adachi *et al.*, 2002). EAEC menyebabkan diare cair dan kadang diare berdarah pada bayi dan anak-anak (Kayser *et al.*, 2005). EAEC menempel pada sel epitel usus halus dan usus besar di dalam biofilm yang tebal dan mensekresi enterotoksin dan sitotoksin (Kaper *et al.*, 2004). *Flagellin* pada EAEC menginduksi pelepasan IL-8 (Steiner *et al.*, 2000). Pelepasan IL-8 dapat menstimulasi perpindahan neutrofil ke epitel dan menyebabkan kerusakan jaringan dan sekresi cairan (Kaper *et al.*, 2004). EAEC hanya ditemukan pada manusia (Zinnah *et al.*, 2007).

EIEC menginvasi sel epitel usus besar, melisiskan fagosom, multiplikasi dan berpindah ke sel lain dengan *nucleating action microfilament*, EIEC dapat berpindah secara langsung dari satu sel epitel ke epitel lain atau dengan keluar terlebih dahulu lalu masuk kembali ke membran plasma basolateral (Kaper *et al.*, 2004). Ulkus dan inflamasi yang terjadi menyebabkan gejala klinis yang mirip dengan infeksi bakteri disentri (Kayser *et al.*, 2005). EIEC dapat menyebabkan *invasive inflammatory colitis*, akan tetapi kebanyakan kasus hanya berupa diare cair yang tidak bisa dibedakan dengan infeksi *E. coli* pathogen yang lain (Kaper *et al.*, 2004). DAEC merupakan penyebab dari diare pada anak yang berumur lebih dari 12 bulan (Scaletsky *et al.*, 2002).

Enterobacteriaceae merupakan *family* bakteri utama yang berhubungan

dengan produksi enzim ESBL, di mana *E. coli* dan *K. pneumonia* merupakan bakteri yang menjadi penyebab terpenting (Brolund , 2014). Kematian karena ESBL dapat terjadi secara langsung karena bakteremia yang dibuktikan dengan gejala klinis infeksi aktif serta hasil kultur positif, dan kegagalan sistem organ (Lautenbachm *et al.*, 2001). Di beberapa tempat Asia kasus infeksi *e. coli* yang memproduksi enzim ESBL memiliki prevalensi 60-79% (Sidjabat dan Peterson, 2015). Pada sebuah penelitian di Bali didapatkan frekuensi yang tinggi resistensi *ampicillin*, *trimethoprim/ sulfamethoxazole*, *chloramphenicol*, *tetracycline* dan *cephalothin* terhadap strain ETEC (Subekti *et al.*, 2003).

ESBL diketahui dapat menghidrolisa semua *penicillin*, *early cephalosporin*, *oxymino-cephalosporin* dan *monobactam*, akan tetapi kurang memiliki aktivitas hidrolitik pada *cephamycin* dan *carbapenem* (Rao *et al.*, 2014). Eksposur pada *extended-spectrum cephalosporins* meningkatkan jumlah pasien dibandingkan dengan kontrol yang diekspos dengan *cotrimoxazole* dan *aminoglycoside* (Lautenbachm *et al.*, 2001). Ko-resistensi dengan *fluoroquinolones*, *aminoglycosides* dan *trimethoprim* pada ESBL sering ditemukan (Brolund *et al.*, 2014). Kombinasi ini dapat mempengaruhi kasus kejadian infeksi baik di komunitas maupun rumah sakit (Picozzi *et al.*, 2014).

Percobaan konjugasi mendemonstrasikan bahwa resistensi pada obat-obatan pada ESBL berhubungan dengan adanya *conjugative plasmid* (Lautenbachm *et al.*, 2001). Flora usus merupakan tempat yang ideal untuk gen resistensi antibiotik, di mana banyak bakteri dari berbagai spesies dapat berinteraksi, kebanyakan tanpa menyebabkan penyakit dikarenakan adanya interfensi dari sistem imun (Brolund , 2014). Transmisi gen yang mengkode enzim ESBL dapat terjadi baik dengan munculnya klon bakteri maupun transfer

gen secara horizontal, pada kasus lebih lanjut, plasmid yang mengandung gen resistensi menyebar di antara bakteri baik dalam satu spesies maupun tidak (Brolund , 2014).

2.4 Uji Kepekaan Antimikroba

2.4.1. Metode Dilusi Tabung

Minimal inhibitory concentration merupakan konsentrasi agen antimikroba terendah yang dapat menghambat pertumbuhan dan multiplikasi isolat bakteri (Ivonne, 2005). Interpretasi dari MIC dapat berpedoman pada NCCLS atau dari CLSI (Ivonne, 2005; Brooks *et al.* 2013). Tes MIC dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu dengan menggunakan metode dilusi tabung dan dilusi agar, akan tetapi metode yang sering digunakan pada laboratorium klinis adalah metode dilusi tabung (Ivonne, 2005).

Salah satu dari uji kepekaan antimikroba yang paling awal ditemukan adalah metode dilusi tabung (Ericsson dan Sherris, 1971). Pada prosedur ini, digunakan pengenceran dua kali dari dosis antibiotik, misalnya konsentrasi yang digunakan 1, 2, 4, dan 8 µg/mL, yang dimasukkan ke dalam cairan media pertumbuhan pada tabung reaksi (Jorgensen dan Ferraro, 2009). *Mueller Hinton (MH) broth* direkomendasikan sebagai pilihan media untuk tes kepekaan isolat aerobik *rapid growing* atau organisme fakultatif dengan pH dari *broth* atau kaldu berkisar antara 7,2 sampai 7,4 pada suhu ruang atau 25°C (Ivonne, 2005). Tabung yang berisi antimikroba diinokulasi dengan suspensi bakteri standar yaitu $1-5 \times 10^5$ CFU/mL lalu diinkubasi pada suhu 35°C dan diamati kekeruhannya (Jorgensen dan Ferraro, 2009).

2.4.2. Metode Dilusi Agar

Metode dilusi tabung terdiri dari mikrodilusi dan makrodilusi yang pada prinsip pengerjaannya hanya berbeda dalam volume (Jorgensen dan Ferraro, 2009). Pada metode dilusi agar, agen atau obat antimikroba tergabung pada media agar dengan berbagai konsentrasi. Inokulum dapat diaplikasikan pada permukaan agar dengan *inoculum-replicating apparatus*. pH MH agar berkisar antara 7,2 dan 7,4 pada suhu ruang. Kation suplemental perlu ditambahkan pada agar dan dapat pula disuplementasi dengan 5% *defibrinated sheep blood* atau *lysed horse blood*. Tes dilusi agar tidak biasa dilakukan pada laboratorium klinis akan tetapi ideal untuk penelitian yang membutuhkan isolat dalam jumlah besar dan penelitian untuk referensi regional (Ivonne, 2005).

2.4.3. Metode Difusi Cakram

Metode difusi cakram telah digunakan laboratorium mikrobiologu selama lebih dari 70 tahun. Sebelum melakukan penelitian cakram atau *disk* perlu dibiarkan pada suhu ruangan selama satu sampai dua jam untuk meminimalisir kondensasi dan menghilangkan embun yang dapat mempengaruhi konsentrasi obat antimikroba. Cakram yang telah mengandung agen atau obat antimikroba akan diletakkan pada *Mueller-Hinton* (MH) agar plate, biasanya dalam satu cawan bisa diletakkan 12 cakram dengan diameter 150 mm. Tidak diperkenankan memindahkan cakram yang telah menyentuh permukaan agar (Jose, 2005).

Metode ini menggunakan inokulum bakteri sebanyak kurang lebih $1-2 \times 10^8$ CFU/mL pada MH *agar plate*. Kertas yang mengandung antimikroba

diletakkan pada permukaan agar, lalu *plate* diinkubasi selama 16 sampai 24 jam pada suhu 35°C. Zona hambat antimikroba akan diukur dalam milimeter yang berhubungan dengan kepekaan isolat pada antimikroba yang digunakan (Jorgensen dan Ferraro, 2009).

Diameter zona hambat dapat diinterpretasikan dengan menggunakan kriteria yang dipublikasikan oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* atau CLSI (Cockerill *et al.*, 2012). Colistin memiliki aktivitas bakteriosidal yang baik terhadap kebanyakan basil aerobik Gram negatif termasuk *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* dan *Yersinia pseudotuberculosis*. Metode yang biasa digunakan dalam test kepekaan pada colistin adalah metode difusi cakram dengan cakram *colistin sulfate* (Oxoid) 10 µg dan dianggap sensitif atau peka jika zona hambat ≥ 11 mm. Colistimethate sodium bukan colistin sodium digunakan dalam praktek klinis dan diadministrasikan secara intravena (Kasiakou dan Falagas, 2005).

Cara kerja colistin adalah mengikat molekul lipopolisakarida anionik dengan menggantikan kalsium dan magnesium dari membran sel luar dari bakteri Gram negatif, menyebabkan perubahan permeabilitas pada selubung sel, kebocoran isi sel dan kematian sel. Selain itu Colistin juga memiliki aktivitas anti endotoksin yang poten yaitu dengan menetralsir porsi lipid A dari molekul lipopolisakarida bakteri (Kasiakou dan Falagas, 2005).

Keuntungan dari metode ini adalah tekniknya yang sederhana dan tidak membutuhkan alat khusus, hasilnya mudah diinterpretasikan dan mudahnya pemilihan cakram yang akan digunakan. Dari ketiga metode uji sensitivitas antimikroba, metode ini adalah yang paling ekonomis. Walaupun tidak semua bakteri yang tumbuh lambat dan susah untuk dikultur dapat secara akurat diuji dengan metode ini, terdapat beberapa bakteri yang telah distandarisasi untuk

menggunakan metode ini, yaitu *streptococci*, *Haemophilus influenzae*, and *N. meningitidi* melalui *specialized media*, kondisi inkubasi dan kriteria interpretasi ukuran zona spesifik (Jorgensen dan Ferraro, 2009). Gambar metode difusi cakram dapat dilihat pada gambar 5.2.



Gambar 2.4 Metode Difusi Cakram (Jose, 2005)