

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Vibrio cholerae*

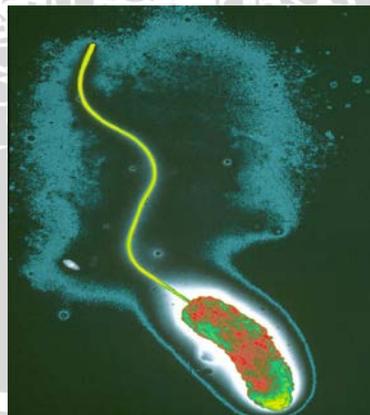
2.1.1 Taksonomi

Adapun sistematika penamaan (taksonomi) dari bakteri *V. cholerae* adalah sebagai berikut

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Vibrionales
Famili	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Vibrio</i>
Spesies	: <i>Vibrio cholera</i>

2.1.2 Karakteristik Bakteri

2.1.2.1 Gambaran Umum Mikroorganisme



Gambar 2.1 Gambaran mikroskop elektron perbesaran 10.000x *V. cholerae* dengan flagela monotrikus (Matthew *et al.*,2000).

Bakteri *V. cholerae* ditemukan oleh Filippo Pacini , seorang ahli anatomi Italia pada tahun 1854. *V. cholerae* masuk kedalam genus

Vibrio dimana terdapat beberapa spesies bakteri yang bersifat patogen intestinal misalnya *V. cholerae* yang merupakan penyebab terjadinya wabah atau *epidemic Asiatic cholerae* dan *V. parahaemolyticus* yang merupakan penyebab diare pada orang-orang dengan kebiasaan mengkonsumsi makanan laut terutama yang tidak dimasak dengan baik (Dzen *et al.*,2010).

V. cholerae adalah penyebab penyakit infeksi yang dapat menimbulkan kepanikan karena dapat menyebabkan wabah diare dengan angka kematian yang tinggi. Sejak tahun 1817, penyakit kolera telah menyebabkan terjadinya 7x pandemic dan pandemic ke-7 antara tahun 1961-1970 yang meliputi negara berkembang (Dzen *et al.*,2010).

2.1.2.2 Mikroskopik *V. cholerae*



Gambar 2.2 Mikroskopik *V.cholerae* pengecatan gram, perbesaran 1000x, batang pendek, gram negatif (Westphalen.2012).

V. cholerae merupakan bakteri enterik gram negatif, monotrikus polar. Pada isolasi primer atau sediaan langsung dari tinja, *V. cholerae* berbentuk batang bengkok atau koma. Panjangnya $\pm 1.5-3$ μm dan lebarnya $\pm 0,5$ μm . Bakteri ini bersifat motil yakni bergerak aktif

menggunakan flagella polar tunggal dan pergerakannya seperti anak panah. Setelah dibiakkan atau dibuat sub kultur, bakteri menjadi berbentuk batang lurus (Brooks *et al.*,2007).

2.1.2.3 Perbenihan



Gambar 2.3 koloni *V. cholerae* pada medium TCBS, koloni bulat berwarna kuning (Grimes, *et. Al.*2012).

V. cholerae berbentuk konveks, halus, koloninya bulat opaque dan granular. Koloni *V. cholerae* pada medium TCBS (*thiosulfate citrate bile salt sucrose*) sangat khas yaitu berwarna kuning karena bakteri ini memecah sukrosa dan memfermentasikan asam. *V. cholerae* bersifat fakultatif anaerob dan tumbuh baik pada suhu antara 18°-37°C tapi terbaik adalah pada suhu 37°C , dan tumbuh pada pH 8.5-9.5. Bakteri ini cepat mati pada pH asam (Brooks *et al.*, 2007) .

V. cholerae dapat tumbuh pada media yang sangat sederhana dan pada keadaan anaerob dapat memecah karbohidrat secara fermentasi, sedang pada keadaan aerob akan memecah karbohidrat seperti aerob yang lain. Untuk media enrichment sekaligus sebagai

media transport adalah *alkali pepton water* (APW) dengan pH sekitar 8.5-9.5, dimana pada kondisi ini bakteri lain sulit tumbuh. Untuk isolasi primer sebaiknya digunakan media selektif yaitu *Thiosulfat Citrat Bile Salt Sucrosa* (TCBS) atau *Tellurite Taurocholate Gelatin Agar* (TTGA). Media perbenihan lain non selektif yang bisa digunakan adalah media yang biasa untuk isolasi Enterobacteriaceae seperti EMB, MacConkey, agar Endo atau agar nutrient dan TTGA (Dzen *et al.*, 2010).

2.1.3 Penentu Patogenitas

2.1.3.1 Enterotoksin

Koleragen merupakan enterotoksin protein oligometrik yang dikeluarkan oleh bakteri yang masih hidup, susunannya sangat kompleks serta memiliki berat molekul ± 84.000 dalton. Toksin ini tersusun dari 1 subunit A dengan (Berat Molekul) BM 27.200 dalton yang terdiri dari 2 fragmen A1 dan A2 yang terikat bersama oleh ikatan disulfide serta 5 subunit B dengan BM masing – masing 11.200 dalton. Enterotoksin ini terdiri atas 98% protein, 1% karbohidrat dan 1% lipid. Subunit A bertanggung jawab atas sifat-sifat biologisnya, sedangkan subunit B bertanggung jawab terhadap terjadinya ikatan atau perlekatan antara enterotoksin dengan membrane sel usus dari hospes (Dzen *et al.*, 2010).

Subunit A terdiri atas dua molekul peptida yaitu A₁ yang bertanggung jawab terhadap aktivitas toksin dan A₂ yang berfungsi sebagai penghubung antara subunit A dan subunit B. Subunit B dari enterotoksin berikatan secara menetap dengan molekul GM₁

(*ganglioside molecule*) monogangliosida dari usus halus. Enterotoksin *V. cholerae* dapat menyebabkan peningkatan aktivitas adenil siklase dan konsentrasi AMP siklik, sehingga menyebabkan dikeluarkannya cairan sel beserta elektrolit (Na, K, Ca, Cl, bikarbonat, fosfat dll). (Dzen *et al.*, 2010)

2.1.3.2 TCP

Bakteri patogen *V. cholera* menggunakan *toxin-coregulated pili* (TCP) untuk berkolonisasi di usus manusia yang menyebabkan diare parah (Li *et al.*, 2008).

2.1.3.3 Faktor Adhesi

Untuk dapat menimbulkan penyakit, *V. cholerae* selain menghasilkan enterotoksin juga memiliki pili yang berguna untuk melekatkan dirinya pada sel intestin hospes yaitu pada mikrovili di daerah brush border dari sel epitel, untuk selanjutnya mengadakan kolonisasi dan menghasilkan enterotoksin. Bagian yang merupakan protein adhesi terletak pada ujung pili dengan BM 38 kDa. Selain itu juga didapatkan protein adhesi lain pada *outer membrane protein* (OMP) dengan BM 76kDa (Dzen *et al.*, 2010).

2.1.3.4 Motilitas

Motilitas juga berperan dalam menentukan terjadinya perlekatan dan patogenisitas *V. cholerae*, karena pada galur tertentu yang tidak motil walaupun dapat menghasilkan enterotoksin ternyata tidak dapat menimbulkan penyakit (Dzen *et al.*, 2010) *Vibrio* mutan yang tidak motil tidak memiliki kemampuan untuk melekat pada brush border membran intestine (Jones and Freter, 1976).

2.1.3.5 Mucinase

Mucinase berguna untuk melakukan penetrasi kedalam lapisan mukus dari usus halus dan hanya diproduksi oleh galur *V. cholerae* yang virulen (Dzen *et al.*,2010). Dengan memproduksi enzim mucinase, bakteri berhasil mencairkan lapisan lendir dengan menutupi permukaan sel epitel usus, sehingga bakteri dapat masuk kedalam membran mukosa usus (Hiswani. 2003).

2.1.3.6 Gen pengkode factor virulensi

Analisis genetik menunjukkan terdapat 2 gen pengkode faktor virulensi yaitu :

1. Elemen genetik pengkode kolera toksin
2. *Vibrio patogenecity island* (VPI) pembawa gen untuk factor kolonisasi pili sehingga memudahkan koloni bakteri menempel pada intestin (Waldor and Mekalanos,1996).

2.1.4 Identifikasi laboratorik *Vibrio cholera*

2.1.4.1 Reaksi Biokimia

V. cholerae secara regular memfermentasikan sukrosa dan manosa tanpa menghasilkan gas, tidak untuk arabinosa. Hasil positif terhadap tes oksidase adalah kunci identifikasi awal terhadap kelompok bakteri Vibrionaceae. *V. cholerae* sensitive terhadap komponen O129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine phosphate) (Brooks *et al.*,2007). *V. cholerae* menunjukkan hasil positif pada test dekarboksilase lysine dan ornithine. Kebanyakan spesies *Vibrio* bersifat halotoleran dan NaCl sering menstimulasi pertumbuhan

bakteri-bakteri tersebut. *V. cholerae* bisa tumbuh dengan kadar NaCl rendah (Sack *et al.*,2004).

V. cholerae memfermentasikan nitrat pada medium pepton (banyak yang mengandung triptofan dan nitrat) akan membentuk indol, yang dengan asam sulfat akan membentuk warna merah (tes Indol positif). Selain itu terdapat juga reaksi nitroso indol positif (merah cholera). Tes ini dapat dihambat oleh adanya glukosa(Syahrurachman *et al.*,2013) .

2.1.4.2 Reaksi Serologis

V. cholerae mempunyai serologis spesifik yakni lipopolisakarida O. *V. cholerae* galur O grup 1 dan O grup 139 menyebabkan kolera klasik. Sedangkan *V. cholerae* non-O1 dan non-O139 menyebabkan penyakit seperti kolera. Antibodi terhadap antigen O atau antigen somatik cenderung bersifat proteksi terhadap infeksi *V. cholerae*. Antigen O dari *V. cholerae* merupakan bagian dari LPS(*lipopolysaccharide*), yaitu komponen dari dinding selnya. *V. cholerae* serogrup antigen O1 memiliki beberapa serotipe diantaranya Ogawa, Inaba dan Hikojima. Dan ada 2 biotipe epidemic dari *V. cholerae* yang telah ditemukan yaitu El Tor dan klasik. Biotipe El Tor memproduksi hemolysin yang memberikan hasil positif terhadap test Voges-Proskauer dan resisten terhadap polymixin B (Greenwood *et al.*,2007) .

V. cholerae O139 sangat mirip dengan *V. cholerae* O1 biotipe El Tor. *V. cholerae* O139 tidak memproduksi lipopolisakarida O1. *V. cholerae* O139 membentuk kapsul polysakarida seperti tipe lainnya

yaitu *V. cholerae* non-O1. Sedangkan tipe O1 tidak membentuk kapsul (Yamai *et al.*,1997).

2.1.5 Struktur Antigen dan Klasifikasi Biologi

Adanya antigen somatic atau antigen-O digunakan untuk membagi *V. cholerae* menjadi beberapa serogroup. Pada *V. cholerae* O₁ terdapat biotipe El Tor dan klasik. Selanjutnya, *V. cholerae* biotipe El Tor maupun klasik digolongkan menjadi serotype Ogawa, Inaba dan Hikojima yang mempunyai arti penting didalam pemeriksaan epidemiologis (Dzen *et al.*,2010).

Semua anggota genus *Vibrio* memiliki Antigen H yang sifatnya sama untuk semua spesies. Untuk melakukan diferensiasi biotipe El Tor dan Klasik dapat dilakukan tes seperti pada table dibawah ini

Tabel 2.1 Tes untuk membedakan *V. cholerae* biotipe eltor dan klasik (Dzen *et al.*,2010).

	Uji	Klasik	El Tor
1	Uji Voges-Proskauer untuk Asetilmetilkarbinol	-	+
2	Hemaglutinasi butir darah merah ayam	-	+
3	Polimiksin B 50 IU	+	-
4	Faga grup IV	+	-

2.1.6 Manifestasi Klinis *Vibrio cholera*

2.1.6.1 Kolera

Setelah periode inkubasi dalam waktu 18 jam sampai 5 hari, gejala mulai muncul dan memburuk seperti diare cair dan muntah-muntah. Gejala khas yang tampak pada kolera adalah tanpa ada rasa sakit atau mulas sesaat dan sebelum buang air besar disertai dengan feses cair yang berwarna seperti perasan air beras. Feses sering kali berbau ikan. Muntahan yang keluar berupa cairan alkali, dan jernih. Laju diare orang dewasa dengan kolera parah biasanya sering dan mencapai volume 500-1000mL/jam, hal tersebut bisa menyebabkan dehidrasi parah (Sack *et al.*, 2004).

Berikut merupakan gejala dan tanda-tanda yang ditunjukkan penderita kolera :

- a) Diare encer dan berlimpah tanpa didahului rasa mulas atau tenesmus (rasa ingin buang air besar walaupun perut sudah terasa kosong). Diare terjadi berkali-kali dalam jumlah yang cukup banyak dengan tanda khas yaitu Ricewater stools yang terdiri dari mukus, sel epitel dan bakteri *Vibrio* dalam jumlah besar.
- b) Kotoran yang semula berwarna dan berbau mulai berubah menjadi cairan putih keruh tanpa bau busuk ataupun amis. Tetapi berbau manis yang menusuk.
- c) Kotoran berwarna putih ini bila diendapkan akan mengeluarkan gumpalan-gumpalan putih.
- d) Muntah setelah diare dan tidak merasakan mual sebelumnya.
- e) Kejang otot dan bisa disertai nyeri yang hebat.

- f) Akibat banyaknya cairan yang keluar sehingga terjadi dehidrasi dengan tanda-tanda : detak jantung cepat, mulut kering, lemah fisik, mata cekung, hypotensi dan lainnya. Jika tidak segera ditangani dapat menyebabkan kematian (Sack *et al.*,2004).

2.1.6.2 Penularan

Cara penularannya yakni masuk melalui makanan atau air minum yang terkontaminasi secara langsung atau tidak langsung oleh tinja atau muntahan dari orang yang terinfeksi. Sumber penularan adalah seseorang pembawa penyakit atau karier yang sampai saat ini diketahui ada 2 macam, yaitu karier setelah sembuh dari penyakit (*coalescent carrier*) dan karier yang kronis. Pada karier konvalesen dapat menyimpan mikroorganisme selama beberapa bulan samapi 1 tahun. Sedangkan karier kronik, bakteri bersembunyi didalam kandung empedu dan akan dikeluarkan kedalam lumen usus secara berkala sebagai akibat infeksi pada saluran cerna oleh bakteri lain selain *V. cholerae* (Dzen *et al.*,2010).

El Tor O1 dan O139 dapat bertahan di air tawar dalam jangka waktu yang lama. Peran hewan sebagai media penyebaran *V. cholerae* sangat kecil sekali, namun demikian, pernah dilaporkan bahwa *V. cholerae* dapat ditularkan oleh hewan seperti sapi atau ayam yaitu pada saat terjadi infeksi pada manusia (Dzen *et al.*,2010).

2.1.6.3 Patogenesis

Infeksi oleh bakteri merupakan penyebab tersering dari diare. Dari sudut kelainan usus, diare oleh bakteri dibagi atas non-invasif (tidak merusak mukosa) dan invasif (merusak mukosa). Kolera adalah salah satu

jenis dari diare infeksi yang disebabkan oleh bakteri non invasif. Bakteri non-invasif menyebabkan diare karena toksin yang disekresi oleh bakteri tersebut yang disebut diare toksigenik (Marcellus and Daldiyono, 2009) .

Gejala yang timbul berpangkal pada usus halus. Bila bakteri tertelan dan lolos dari barrier asam lambung, maka bakteri akan bermultiplikasi dalam suasana alkali di usus halus. Sambil berkembang biak, bakteri membentuk toksin yang bertanggung jawab terhadap patologis kolera. *V. cholerae* merupakan bakteri non invasif. Patogenesisnya disebabkan oleh enterotoksin yakni suatu protein yang tahan panas tapi tidak tahan asam. Toksin ini akan menyebabkan diare sampai dehidrasi, ketidak seimbangan elektrolit dan hipovolemi (Sukanto, 1999). Untuk dapat menimbulkan cholera, sedikitnya harus ada minimal $10^8 - 10^{10}$ bakteri *V. cholerae* yang menginfeksi. Hal ini berbeda dengan salmonellosis atau shigellosis yang dosis infektifnya $10^2 - 10^5$ (Shulman *et al.*, 1994).

V. cholerae tidak mencapai peredaran darah sehingga tidak menimbulkan bakteremia melainkan tetap tinggal pada permukaan sel epitel usus halus, berkembang biak dan mengeluarkan toksin cholerae, enzim mucinase serta endotoksin. Bila sel epitel usus halus terpapar cholerae maka subunit B akan melekat pada gangliosida GM1 pada membrane sel epitel usus halus, perlekatan ini dibantu oleh adanya hemaglutinin, lipopolisakarida serta pili. Selanjutnya subunit A akan melewati membrane sel epitel usus halus dengan cara menghidrolisis ikatan disulfide sehingga subunit A1 terpisah dengan subunit A2. Subunit A1 mempunyai aktifitas transferase ribose-ADP dan merangsang pemindahan ribose-ADP dari NAD ke protein pengikat GTP yang

mengendalikan aktifitas adenilat siklase. Ribosilasi ADP dari protein pengikat GTP akan menghambat reaksi penghentian GTP dan menyebabkan peningkatan aktifitas adenilat siklase, akibatnya terjadi kenaikan cAMP intraseluler, menimbulkan sekresi cairan isotonis dari sel epitel usus ke dalam lumen usus halus (Shulman *et al.*,1994).

Koleragen tidak memblokir atau mencegah reabsorpsi natrium dan air oleh usus halus atau colon. Pada kasus kolera yang akut, terjadi sekresi air dan ion dari sel mukosa usus halus yang berlebihan. Masa inkubasi kolera bervariasi mulai dari beberapa jam hingga 5 hari, umumnya 2- 3 hari. Diperkirakan selama hasil pemeriksaan feses masih positif, maka penderita tersebut masih berpotensi sebagai sumber penularan dan akan berlangsung hingga beberapa hari setelah dinyatakan sembuh, bahkan status sebagai carrier berlangsung hingga beberapa bulan kemudian. Secara klinis yang pertamakali dirasakan oleh penderita adalah rasa penuh di abdomen, hilangnya nafsu makan, telapak tangan serta kaki terasa dingin. Berikutnya secara tiba – tiba mual, muntah dan diare hebat. Feses yang cair yang mula – mula berwarna coklat kemudian berubah menjadi pucat berisi sedikit lendir yang secara klasik diistilahkan sebagai “rice water stools” atau air cucian beras. Diare ini dapat mencapai 24 liter per hari (Chin,2000).

Enterotoksin yang dihasilkan oleh *V. cholerae* El Tor merupakan protein yang dapat menempel pada epitel usus, yang lalu membentuk adenosine monofosfat siklik (AMF siklik) di dinding usus dan menyebabkan sekresi aktif anion klorida yang diikuti air, ion bikarbonat, kation natrium dan kalium. Mekanisme absorpsi ion natrium melalui mekanisme pompa

natrium tidak terganggu karena itu keluarnya ion klorida (diikuti ion bikarbonat, air, natrium, dan ion kalium) dapat dikompensasi oleh meningginya absorbsi ion natrium (diiringi oleh air, ion kalium dan ion bikarbonat klorida) Kompensasi ini dapat dicapai dengan pemberian larutan glukosa yang diabsorpsi secara aktif oleh dinding sel (Marcellus and Daldiyono. 2009).

2.1.7 Diagnosis

2.1.7.1 Specimen

Untuk diagnosis etiologis dibutuhkan spesimen yang berasal dari muntahan, lendir dari tinja atau hapusan rectum (Dzen *et al.*,2010) .

2.1.7.2 Apusan Tinja

Gambaran mikroskop cahaya dari apusan tinja tidak bisa sebagai bahan untuk menegakkan diagnosis. Namun untuk diagnose menggunakan mikroskop kontras atau lapangan gelap bisa menunjukkan gambaran adanya motilitas atau gerakan yang cepat dari bakteri *V.cholerae* (Brooks *et al.*2007) .

2.1.7.3 Kultur

Bahan pemeriksaan tersebut sesegera mungkin dimasukkan kedalam media transpor seperti media Amies, carry-blair atau bisa digunakan media Stuart's yang telah dimodifikasi atau APW dengan pH 8,5 yang juga merupakan media enrichment untuk *V. cholerae*. Kemudian diinkubasi selama 6-8 jam pada suhu 37°C . Media selektif *V. cholerae* adalah medium TCBS, sedangkan media non selektif

adalah yang biasa digunakan untuk membiakkan bakteri Enterobacteriaceae seperti EMB, MacConkey, NA dan TTGA (Dzen *et al.*,2010).

2.1.8 Resistensi *V. cholerae* Terhadap AntiMikroba

Resistensi terhadap antimikroba merupakan masalah utama dalam pengobatan terhadap penyakit infeksi. Beberapa bakteri pathogen resistens terhadap agen antimikroba terjadi sesaat setelah terpapar oleh antimikroba. (Ghosh and Ramamurthy,2011). Sejak tahun 1994 ditemukan peningkatan *V. cholerae* O1 yang menunjukkan resistensi multiple terhadap tetrasiklin, ampisilin, kotrimoksazol, asam nalidiksat. Di antara *V. cholerae* O1 dan O139 juga terdapat resistensi terhadap furazolidin, tapi secara umum prevalensi resistensi *V. cholerae* O139 lebih kecil dibandingkan O1. Studi yang dilakukan Teneja di India menunjukkan resistensi *V. cholerae* terbanyak asam nalidiksat (89,5% resisten) dan kotrimoksazol (77,8% resisten) (Kitaoka *et al.*,2011). Resistensi *V.cholerae* O1 di Indonesia dilaporkan terjadi sejak pandemic kolera ke-7 sekitar tahun 1961 terhadap tetrasiklin dan pada 1995-2001 terjadi resistensi multiple pada Ampisilin, Sulfometoksazol-trimethoprim, kloramfenikol, dan Tetrasiklin (Kitaoka *et al.*,2011). Mekanisme resistensi dari bakteri *V. cholerae* adalah sebagai berikut:

2.1.8.1 Adanya pembentukan spektrum luas β -laktamase

Produksi beta-laktamase 92,8 % resisten terhadap ampisilin terjadi pada galur *V. cholerae* yang diisolasi di India. Salah satu yang berperan dalam resistensi antibiotic adalah melalui plasmid. Plasmid yang terdeteksi pada *V. cholerae* adalah grup C

dan *J. V. cholerae* O1 El Tor yang diisolasi pada pasien di Uganda menunjukkan adanya plasmid 130-MDa grup 6-C yang resisten terhadap trimetoprim (dimediasi oleh gen *dfri*), sulfonamid (*sull*), tetrasiklin (*tetC*), kloramfenicol (*catI*), ampicilin (gen β -lactamase), dan streptomisin (Ghosh and Ramamurthy,2011).

2.1.8.2 Resistensi quinolon dan fluoroquinolone yang dimediasi oleh plasmid dan mutasi kromosom

Pada beberapa bakteri, resistensi terhadap quinolone berhubungan dengan komponen asam amino pada protein GyrA and ParC yaitu *resistance-determining regions* (QRDRs). Resistensi quinolone pada Vibrios terjadi karena mutasi *gyrA* yang dikode oleh subunit DNA gyrase diikuti dengan mutasi *parC*, gaya efflux dari pergerakan proton juga terlibat dalam resistensi quinolone. (Ghosh and Ramamurthy,2011) .

2.1.8.3 Resistensi yang dibantu oleh elemen genetic seperti integron dan *Integrating conjugative Elements*(ICEs).

ICE mempunyai kemampuan sebagai gen pengkode untuk faktor resistensi terutama untuk sulphamethoxazole-trimethoprim, dan kloramfenicol (Ghosh and Ramamurthy.,2011) .

2.1.9 Terapi

Untuk pengobatan spesifik bagi penderita Kolera adalah 1).Terapi rehidrasi agresif. 2). Pemberian antimikroba yang efektif. 3). Pengobatan untuk komplikasi. Antibiotika yang tepat sangat penting karena pemberian

antibiotika dapat mengurangi volume dan lamanya diare dan dengan cepat mengurangi ekskresi dari *Vibrio* (Hastomo,2011) .

Untuk kolera, pilihan antimikroba harus disesuaikan dengan uji kerentanan galur *V. cholerae* terhadap antimikroba. Untuk galur yang sensitive terhadap tetrasiklin, bisa diberikan doksisiklin dosis 300mg tunggal untuk dewasa, dimana untuk anak-anak bisa diberikan eritromisin dan furazolidone untuk ibu hamil. Alternative untuk yang resisten terhadap tetrasiklin, bisa diberikan ciprofloksasin dan azythromisin. Resistensi quinolone merupakan kasus darurat pada beberapa daerah (CDC,2011).

Untuk memperbaiki dehidrasi, asidosis dan hipokalemia pada penderita dengan dehidrasi ringan hingga sedang cukup dengan hanya memberikan larutan rehidrasi oral (Oralit) yang mengandung glukosa 20g/l (atau sukrosa 40 g/l atau dengan air tajin 50g/L), NaCl (3,5 g/L), KCl (1,5 g/L) dan trisodium sitrat dihidrat (2,9 g/L) atau NaHCO₃ (2,5 g/L). Kehilangan cairan pada penderita dengan dehidrasi ringan hingga sedang di perbaiki dengan rehidrasi oral sebagai pengganti cairan, diberikan lebih dari 4 – 6 jam, agar jumlah yang diberikan dapat mengganti cairan yang diperkirakan hilang (kira-kira 5 % dari berat badan untuk dehidrasi ringan dan 7 % pada dehidrasi sedang). Kehilangan cairan yang berlangsung terus dapat digantikan dengan memberikan, selama lebih dari 4 jam, cairan per oral sebanyak 1.5 kali dari volume tinja yang hilang selama 4 jam sebelumnya. Penderita yang menderita renjatan sebaiknya diberi rehidrasi intra vena cepat dengan larutan multielektrolit seimbang yang mengandung kira-kira 130 mEq/L Na⁺, 25 -

48 mEq/L bikarbonat, asetat atau ion laktat, dan 10-15 mEq/L K⁺ (CDC.2012).

2.1.10 Pencegahan

Cara utama penanggulangan adalah pemutusan rantai penularan bakteri kolera dengan prinsip sanitasi lingkungan. Penjernihan cadangan air sumur dan pembuangan tinja yang memenuhi standar. Jarak antara sumur dan *septic tank* minimal harus 10 meter. Usaha lainnya adalah mencuci tangan (menggunakan sabun) sebelum makan, meminum air yang sudah terlebih dahulu dimasak dan menghindari sayuran mentah atau ikan dan kerang yang dimasak tidak sampai matang. Bila ada anggota keluarga yang terkena kolera harus diisolasi dan secepatnya mendapatkan pengobatan. Benda-benda yang terkena kotoran harus disterilisasi (Dzen *et al.*,2010).

Vaksin kolera secara umum tidak dianjurkan untuk penggunaan rutin. Ada dua jenis vaksin secara oral yang tersedia saat ini yaitu Orochol® dan dukoral®. Vaksin tersebut tidak dianjurkan bagi wisatawan untuk penggunaan secara rutin bila berkunjung ke daerah endemic kolera, kecuali mereka yang mempunyai risiko tinggi seperti petugas kesehatan yang bertugas di daerah endemic. Dosis ulang dibutuhkan karena imunitas tidak berlangsung lama (Lesmana,2004) .

2.2 TANAMAN KAYU PUTIH (*Melaleuca leucadendra*)

2.2.1 Asal Usul Tanaman Kayu Putih

Tanaman Kayu putih (*Melaleuca cajuputi* sub sp. *Cajuputi* *Melaleuca leucadendra*) merupakan salah satu tumbuhan penghasil minyak atsiri yang tersebar secara alami di kepulauan Maluku dan Australia bagian utara. Jenis ini telah berkembang luas di Indonesia, terutama di pulau Jawa dan Maluku dengan memanfaatkan daunnya untuk disuling secara tradisional oleh masyarakat maupun secara komersial menjadi minyak atsiri yang bernilai ekonomi tinggi. Jenis tanaman ini mempunyai daur biologis yang panjang, cepat tumbuh, dapat tumbuh baik pada tanah yang berdrainase baik maupun jelek dengan kadar garam tinggi maupun asam dan toleran ditempat terbuka serta tahan terhadap kebakaran. (Lutony, TL., and Rahmayati Y, 1994)

2.2.2 Identifikasi Tanaman Kayu Putih

2.2.2.1 Taksonomi Tanaman Kayu Putih



Gambar 2.5. Tanaman Kayu Putih (Doran, 1999).

Domain : Eukaryota

Kingdom : Plantae

Subkingdom	: Viridaeplantae
Phylum	: Tracheophytas
Subphylum	: Euphylllophytina
Infraphylum	: Radiatopses
Class	: Magnoliopsida
Subclass	: Rosidae
Superorder	: Myrtanae
Order	: Myrtales
Suborder	: Myrtineae
Family	: Myrtaceae
Subfamily	: Ranunculoideae
Tribe	: Anemoneae
Genus	: Melaleuca
Specific epithet	: <i>leucadendra</i> - (L.) L.
Botanical name	: - <i>Melaleuca leucadendra</i> (L.) L (Hung-ta and Ru-Hwai,1984).

2.2.2.2 Morfologi

Tanaman kayu putih yang tingginya bisa mencapai 10 meter ini memiliki ciri-ciri morfologi yaitu batang berkayu, bulat, kulit mudah mengelupas, bercabang, dan warna kuning kecoklatan. pohon kayu putih mempunyai tinggi berkisar antara 10-20 m, kulit batangnya berlapis-lapis, berwarna putih keabu-abuan dengan permukaan kulit yang terkelupas tidak beraturan. Daun tunggal, bentuk lanset, ujung dan pangkal runcing, pada bagian tepi rata, permukaan berbulu, pertulangan sejajar, warna hijau. Daunnya agak tebal seperti kulit,

bertangkai pendek, letak berseling. Helaian daun berbentuk jorong atau lanset, dengan panjang 4,5-15 cm, lebar 0,75-4 cm, ujung dan pangkal daun runcing, tepi rata dan tulang daun hampir sejajar. Permukaan daun berambut, warna hijau kelabu sampai hijau kecoklatan (Doran, 1999).

Bunga majemuk, berbentuk bulir, panjang 7-8 cm, mahkota 5 helai, warna putih, bunga berbentuk seperti lonceng, kepala putik berwarna putih kekuningan, keluar di ujung percabangan. Buah berbentuk kotak, beruang 3, tiap ruang terdapat banyak biji, panjang 2,5-3 mm, lebar 3-4 mm, warnanya coklat muda sampai coklat tua (Doran, 1999).

Ada beberapa varietas pohon kayu putih. Ada yang kayunya berwarna merah, dan ada yang kayunya berwarna putih. Kayu putih dapat dibedakan dalam varietas daun besar dan varietas daun kecil. Varietas yang berdaun kecil digunakan untuk membuat minyak kayu putih. Daunnya, melalui proses penyulingan, akan menghasilkan minyak atsiri yang disebut minyak kayu putih, yang warnanya kekuning-kuningan sampai kehijau-hijauan (Doran, 1999).

2.2.3 Khasiat Tanaman Kayu Putih

Hampir semua bagian tanaman kayu putih (kulit, batang, daun, ranting, dan buah kayu putih) dapat dimanfaatkan sebagai obat. Kandungan daun kayu putih sineol, melaleucin, minyak atsiri yang terdiri dari terpineol, cineol dan lignin (Thomas, 1992). Secara empirik, daun kayu putih berkhasiat untuk menghilangkan bengkak dan nyeri

(analgetika). Khasiat lain dari daun kayu putih antara lain untuk sakit radang usus, diare, reumatik, asma, radang kulit ekzema, sakit kepala dan insomnia. Pengobatan bisa dilakukan dengan meremas daun lalu diletakkan pada bagian yang sakit atau bisa meminum rebusan dari daun kayu putih itu sendiri (Tuhi *et al.* 2007)

Sejauh ini, penelitian akan fungsi tanaman kayu putih adalah sebagai berikut :

- Antiseptikum: Minyak kayu putih dapat bersifat sebagai obat luar digunakan untuk luka yang disebabkan besi yang berkarat agar terlindung dari tetanus.
- Insektisida dan Vermifuge : Aroma yang kuat bisa ditambah cairan lain kemudian dimasukkan ke semprotan dan digunakan untuk mengusir nyamuk dan serangga lainnya.
- Decongestan dan Ekspektoran: Kayu putih dapat dimanfaatkan untuk mengobati gangguan pada hidung dan tenggorokan, organ pernapasan lainnya dan batuk serta infeksi lain yang menyebabkan radang tenggorokan dan bronchitis.
- Kosmetik dan Tonik: Kayu putih bermanfaat untuk menghaluskan dan mencerahkan kulit dan bebas infeksi sehingga banyak dipergunakan untuk kosmetik.
- Anti radang: bermanfaat untuk mengatasi peradangan di kulit sekitar tenggorokan, telinga, tangan dan sekitarnya (Ramu,2013) .

2.2.4 Kandungan

Sebuah penelitian mengukur kadar polifenol ekstrak daun kayu putih menunjukkan adanya kandungan 5,7,3',4'- tetrahydroxyflavone, 2'-O- β -D-glucopyranuronide, 6,8-dihydroxy-kaempferol, 3-O- α -L-rhamnopyranoside, quercitrin, quercetin 7-O- β -D-(6''-O-galloyl-glucopyranoside), myricitrin, myricetin 3-O- β -D-glucopyranoside, myricetin 3-O- β -D-glucopyranuronide, myricitrin 2''-O-gallate, afzelin, kaempferol, quercetin and myricetin. Empat derivat asam fenolik yaitu gallic acid, ellagic acid, 3-O-methylellagic acid, dan 3,4,3'-tri-O-methylellagic acid (Toumy *et al.*,2001).

Penelitian lain menunjukkan adanya kandungan derivat Tanin pada daun kayu putih, yaitu tiga isolat ellagiTanin: 2,3-O-hexahydroxydiphenoyl-(α/β)-D-⁴C₁-glucopyranose, castalin, dan grandinin (Moharram *et al.*,2003). Menurut penelitian terbaru tahun 2013 telah ditemukan beberapa komponen baru pada daun kayu putih yang belum diteliti lebih lanjut akan manfaatnya yaitu 5,7-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-6,8-dimethyl-chromen-4-one, bersama dengan 12 komponen lainnya yang telah diketahui sebelumnya termasuk chromones, anthraquinone, flavonoids, flavonoid glycosides, benzene derivatives, ellagic acids and terpenes. (Carroll *et al.*,2013)

Minyak atsiri (*volatile oil*) juga merupakan kandungan utama pada daun kayu putih. Komponen yang terkandung pada volatile oil tersebut diantaranya adalah 1,8-cineole (40-65%) sebagai komponen terbesar dari minyak atsiri daun kayu putih dan bersama komponen lainnya yaitu terpenoids, a-pinene, b-pinene, myrcene, a-terpene, limonene, y-

terpinene, p-cymene, terpinolene, linalool, terpinen-4ol, α -terpineole, dan benzaldehyde, valeraldehyde (farag *et al.*,2004).

Minyak atsiri yang aktif sebagai antibakteri pada umumnya mengandung gugus fungsi hidroksil (-OH) dan karbonil. Turunan fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses absorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Minyak atsiri bekerja dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel sehingga tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna. Minyak atsiri sebagai senyawa sequesterpenoid, mekanisme antibakteri minyak atsiri (*volatile oil*) diperkirakan melalui proses destruksi membran sel bakteri oleh komponen lipofilik. Terpene atau terpenoid merupakan komponen metabolit sekunder dari minyak atsiri yang terdiri dari struktur isoprene. Sekitar 60% derivat dari minyak atsiri tersebut bisa menghambat fungi dan 40% menghambat bakteri (Gopalakrishnakone *et al.*,2008)

2.2.4.1 Tanin

Tanin merupakan salah satu senyawa kimiawi yang termasuk dalam golongan polifenol memiliki kemampuan menginaktivasi adhesin, enzim, protein, transport dinding sel, merusak substrat, dan berikatan dengan polisakarida dinding sel bakteri. Pendapat lain mengatakan bahwa tanin diduga dapat mengerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel, terganggunya permeabilitas sel menyebabkan sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati. Efek antibakteri tanin antara lain melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi fungsi materi genetik (Cowan, 1999)

2.2.4.2 Flavonoid

Sebuah penelitian menunjukkan bahwa flavonoid memiliki efek anti inflamasi serta mampu menghambat senyawa adhesin (Crespo *et al.*, 2008), padahal adhesin merupakan salah satu faktor virulensi selain motilitas dan enterotoksin. Adhesin berperan pada perlekatan sel bakteri di permukaan substrat. Selain itu senyawa polifenol secara umum dapat merusak substrat dan menghambat enzim sehingga bakteri tidak dapat tumbuh (Jass *et al.*, 2003).

Efek flavonoid sebagai antimikroba diduga karena kemampuannya berikatan dengan protein ekstraseluler dan membran sitoplasma dari bakteri. Semakin lipofilik suatu flavonoid, maka semakin kuat daya rusak flavonoid tersebut terhadap membran sitoplasma bakteri. Flavonoid yang bersifat lipofilik mempunyai kemampuan akan merusak membran sel mikroba. Rusaknya membran dan dinding sel akan menyebabkan metabolit penting di dalam sel akan keluar, akibatnya terjadi kematian sel (Cowan, 1999)

Flavonoid mempunyai sifat yang khas yaitu bau yang tajam, sebagian besar merupakan pigmen warna kuning, larut air dan pelarut organik, mudah terurai pada temperatur tinggi. Senyawa flavonoid mampu menghambat enzim topoisomerase II pada bakteri serta berikatan dengan protein bakteri. DNA gyrase termasuk salah satu dari enzim kelas topoisomerase II (Melderer, 2002). Flavonoid dapat membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler bakteri sehingga terjadi denaturasi protein. Semakin lipofilik suatu flavonoid,

kemampuannya dalam merusak dinding sel bakteri semakin kuat (Cowan, 1999)

2.2.4.3 1,8-Cineole

1,8-Cineole, a.k.a. eucalyptol or 1,3,3-trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octane berfungsi untuk merusak stabilitas structural dari sel bakteri, dia bekerja dengan cara meningkatkan permeabilitas membrane sel dan mengubah struktur dinding bakteri (Kurekci.2013). 1,8 cineole menunjukkan aktivitasnya sebagai bakteriostatik yang secara biologis dan kimia dapat menghentikan reproduksi bakteri dan bakteriosidal yang bisa membunuh bakteri (Sokovic *et al.*,2010).

2.2.4.4 Limonene

Limonene memiliki efek bakterisidal, pada penelitian sebelumnya ekstrak limonene pada buah jeruk dapat melawan koloni dari *E. Coli*. Derajat inaktivasi koloni *E. coli* oleh limonene juga bisa dipengaruhi oleh pH dimana menunjukkan hasil yang baik pada pH 4.0 sampai 7.0. Limonene adalah kelompok dari family *cyclic monoterpen hydrocarbon*. Komponen tersebut berakumulasi pada membrane plasma mikroba sehingga menyebabkan bakteri kehilangan integritas membran dan gaya pergerakan oleh proton. Study sebelumnya telah membuktikan inaktivasi *E. coli* oleh senyawa terpen dan terpenoid lainnya seperti carvacol yang menyebabkan kerusakan sublethal pada membrane luar sitoplasma (Espina,2013).

2.2.4.5 Terpenoid

Terpenoid adalah senyawa alami yang dikenal aman untuk digunakan. Senyawa terpenoid dapat menekan aktivitas bakteri dan sekaligus merusak membran sel bakteri (Togashi, *et al* 2008).

2.2.5 Ekstraksi Senyawa Aktif Bahan Alam

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat aktif dari bagian tumbuhan, hewan dan beberapa jenis biota laut. Zat-zat aktif terdapat didalam sel namun sel tanaman dan hewan berbeda demikian pula dengan ketebalannya, sehingga diperlukan metode ekstraksi dengan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya. Tujuan ekstraksi bahan alam adalah menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut. Untuk mengekstraksi senyawa kimia yang ada dalam tumbuhan terlebih dahulu bahan dikeringkan kemudian dihaluskan dengan derajat halus tertentu lalu diekstraksi dengan pelarut yang sesuai. Untuk mendapatkan sari yang kental dapat dilakukan dengan menguapkan hasil ekstraksi dengan bantuan *rotary evaporator*. Pelarut untuk ekstraksi terdiri atas, pelarut non polar, seperti N-heksan, diklorometan, kloroform, benzena, dietil eter. Pelarut polar seperti air, metanol, etanol. Dan terdapat pelarut semipolar seperti aseton, etil asetat, dan lain-lain (Ansel, 2008).

Jenis ekstraksi bahan alam yang sering dilakukan adalah ekstraksi secara panas dengan cara refluks, sokletasi, digesti, infus, dekok dan ekstraksi secara dingin dengan cara maserasi dan perkolasi (Hamdani, 2011).

2.3 Bahan Antimikroba

Agen antimikroba yang ideal memperlihatkan toksisitas selektif, yang berarti obat tersebut berbahaya bagi patogen tanpa membahayakan pejamu. Sering kali, toksisitas selektif lebih bersifat relatif dan bukan absolut, ini berarti bahwa suatu obat dalam suatu konsentrasi tertentu yang dapat ditoleransi oleh pejamu dapat merusak mikroorganisme penyebab infeksi (Brooks *et al.*,2007). tidak bersifat alergenik atau tidak menimbulkan efek samping bila digunakan dalam jangka waktu yang lama, tetap aktif dalam plasma, cairan tubuh atau eksudat, larut didalam air dan stabil, kadar bakterisidal yang dimiliki agen antimikroba didalam tubuh cepat tercapai dan bertahan untuk waktu lama(Dzen *et al.*,2010)

Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Antibakteri tertentu aktivitasnya dapat meningkat dari bakteriostatik menjadi bakterisida bila kadar antibakterinya ditingkatkan melebihi KHM (Gariswarna, 1995).

2.4 Uji Kepekaan terhadap Antimikroba *In Vitro*

Penentuan aktifitas antimikroba dapat dilakukan dengan dua metode dasar, yaitu metode dilusi dan metode difusi

2.4.1. Metode Dilusi

2.4.1.1 Dilusi Tabung

Cara ini digunakan untuk menentukan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) dari obat anti mikroba. Menggunakan bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml. Prinsipnya dengan menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi

media cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Kemudian masing-masing tabung diisi dengan obat yang telah diencerkan secara serial. Ada satu tabung yang hanya diisi bahan aktif tanpa bakteri sebagai kontrol negatif dan ada pula satu tabung yang hanya diisi oleh bakteri biakan sebagai kontrol positif. Selanjutnya, seri tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah obat pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah KHM obat. KHM ini adalah kemampuan dari agen antimikroba yang menghambat multiplikasi bakteri uji (sebagai bakteristatik). Untuk mengukur kemampuan antimikroba membunuh mikroorganisme perlu dilakukan tes aktivitas bakterisidal dengan menggunakan modifikasi dari tes dilusi tabung. Selanjutnya biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat, diinkubasikan dan keesokan harinya (18-24 jam) diamati ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan atau adanya pertumbuhan < 0,1% inokulum original disebut Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari bahan antimikroba (Dzen *et al*, 2010).

2.4.1.2 Metode Dilusi Agar

Tes ini dikerjakan dengan menggunakan metode dilusi agar (*Agar Dilution test*). Metode dilusi agar, larutan antimikroba yang sudah diencerkan secara serial dicampurkan ke dalam medium agar yang masih cair (tetapi tidak terlalu panas) kemudian agar dibiarkan

memadat, dan selanjutnya diinokulasikan dengan bakteri. Dibutuhkan satu cawan untuk kontrol positif tanpa antimikroba. Dengan metode ini, satu atau lebih bakteri terisolasi yang tercampur per cawan (Parija, 2009). Pada dilusi agar, zat antibakteri diletakkan dalam medium agar lalu teteskan bakteri yang akan diuji dengan konsentrasi 10^4 CFU/ spot (CLSI, 2006). Pada metode dilusi agar, diperlukan larutan antimikroba dengan kadar menurun yang dibuat menggunakan tehnik pengenceran serial. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah diinkubasi, cawan diamati serta dihitung pertumbuhan bakteri (Parija,2009).

2.4.2 Metode Difusi

Metode yang paling luas digunakan adalah uji difusi cakram. Tes ini dikerjakan dengan menggunakan cakram kertas saring yang mengandung bahan antimikroba yang telah ditentukan kadarnya. Cakram tersebut kemudian ditempatkan pada media padat yang telah diberi bakteri uji. Setelah diinkubasi, diameter area hambatan dihitung sebagai daya hambat obat terhadap bakteri uji (Brooks *et al.*,2007).

Untuk mengevaluasi hasil uji kepekaan tersebut (apakah isolat mikroba sensitif atau resisten terhadap obat), dapat dilakukan dengan cara berikut :

2.4.2.1 Cara Kirby Bauer

Yaitu dengan cara membandingkan diameter dari area jernih (zona hambatan) disekitar cakram dengan tabel standar yang dibuat oleh NCCLS (*National Committe for Clinical Laboratory Standard*).

Dengan tabel NCCLS ini dapat diketahui kriteria sensitif, sensitif intermediet dan resisten (Dzen *et al.*,2010).

2.4.2.2 Cara Joan-stokes

Metode ini dilakukan dengan cara membandingkan radius zona hambatan yang terjadi antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaanya terhadap obat tersebut dengan isolat bakteri yang di uji. Pada cara Joan-stokes, prosedur kepekaan untuk bakteri uj kontrol dan bakteri uji dilakukan secara bersama-sama dalam satu piring agar (Dzen *et al.*,2010). Kriteria pada metode Joan-stokes adalah sebagai berikut:

- Sensitif : yaitu radius zona inhibisi bakterites lebih luas, sama dengan atau lebih kecil tetapi tidak lebih dari 3mm terhadap kontrol.
- Intermediet : yaitu radius zona inhibisi bakterites lebih besar dari 3mm, tetapi dibanding kontrol lebih kecil lebih dari 3mm.
- Resisten : yaitu radius zona inhibisi kurang atau sama dengan 3mm (Dzen *et al.*,2010)