

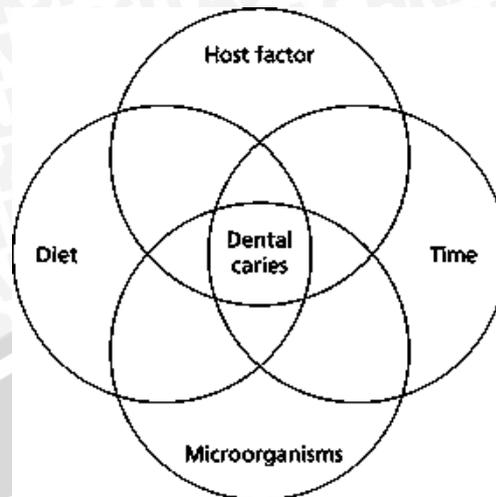
BAB 2**TINJAUAN PUSTAKA****2.1 Karies Gigi****2.1.1 Deskripsi**

Karies gigi adalah penyakit mikrobial yang mengakibatkan suatu proses demineralisasi yang progresif pada jaringan keras permukaan mahkota dan akar gigi dan sering menyebabkan kavitas (Angela, 2005).

Karies dapat menyerang jaringan keras gigi yaitu email, dentin dan sementum yang disebabkan oleh aktivitas mikroba dalam suatu karbohidrat yang dapat diragikan yang ditandai dengan demineralisasi jaringan keras gigi (Kidd, 2011). Lesi karies dapat terbentuk akibat adanya perubahan ekologi dan aktivitas metabolisme dari biofilm dimana terjadi ketidakseimbangan antara mineral pada gigi dan biofilm yang terbentuk. Metabolisme mikroba pada biofilm ini akan menyebabkan pH menjadi turun dan akibatnya akan menyebabkan hilangnya kalsium dan fosfat pada gigi sehingga terbentuk porus pada enamel gigi (Fejerskov and Kidd, 2008).

2.1.2 Etiologi

Karies gigi memiliki etiologi multifaktorial yaitu terjadinya interaksi dari tiga faktor utama dan satu faktor tambahan, yakni mikroorganisme, substrat, host, dan waktu (Susilaningrum, 2012). Bakteri plak akan memfermentasikan substrat karbohidrat dalam makanan yang sesuai (misalnya glukosa dan sukrosa) sehingga membentuk suasana asam dan menjadikan pH turun sampai pH 4,5-5,0 (Soesilo, 2005). Penurunan pH yang berulang-ulang dalam waktu tertentu mengakibatkan terjadinya demineralisasi pada permukaan gigi yang rentan dan proses karies pun dimulai (Kidd, 2011).



Gambar 2.1 Empat lingkaran yang menggambarkan saling keterkaitan faktor-faktor etiologi karies (Kidd, 2000)

2.1.2.1 Substrat

Faktor substrat dapat mempengaruhi pembentukan plak karena membantu perkembangbiakan dan kolonisasi mikroorganisme yang ada pada permukaan enamel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa orang yang banyak mengonsumsi karbohidrat, terutama sukrosa cenderung mengalami kerusakan pada gigi. Sebaliknya, pada orang dengan diet yang banyak mengandung lemak dan protein hanya sedikit atau sama sekali tidak mempunyai karies gigi (Pintauli, 2008).

2.1.2.2 Host

Ada beberapa faktor yang dihubungkan dengan gigi sebagai host terhadap karies, yakni faktor morfologi gigi (bentuk dan ukuran gigi), struktur enamel, dan faktor kimia. Pit dan fisur pada gigi posterior lebih rentan mengalami karies karena sisa-sisa makanan mudah menumpuk di daerah tersebut terutama pit dan fisur yang dalam. Selain itu, enamel merupakan jaringan keras gigi dengan susunan kimia kompleks yang mengandung 97% mineral (kalsium, fosfat, karbonat, fluor), 1% air dan 2% bahan organik. Bagian luar enamel mengalami mineralisasi yang lebih sempurna karena mengandung banyak fluor,

fosfat dan sedikit karbonat dan air. Kepadatan kristal enamel sangat menentukan kelarutan enamel. Semakin banyak enamel yang mengandung mineral, maka kristal enamel akan menjadi padat dan enamel akan menjadi resisten. Gigi susu lebih mudah terserang karies daripada gigi permanen karena enamel gigi susu mengandung lebih banyak bahan organik dan air sedangkan jumlah mineralnya lebih sedikit (Pintauli, 2008)

2.1.2.3 Mikroorganisme

Terdapat berbagai macam bakteri yang dapat menyebabkan terjadinya karies gigi, di antaranya adalah *Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus* yang banyak ditemukan dalam biofilm (Daswi, 2014).

2.1.2.4 Waktu

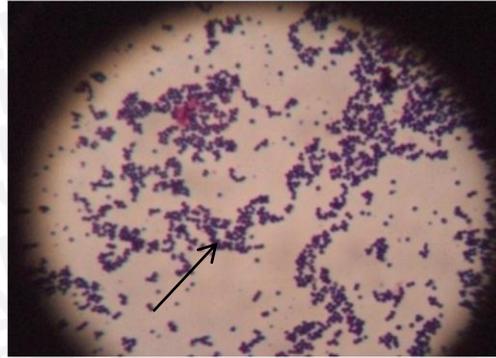
Secara umum, karies dianggap sebagai penyakit kronis pada manusia yang berkembang dalam waktu beberapa bulan atau tahun. Lamanya waktu yang dibutuhkan karies untuk berkembang menjadi suatu kavitas cukup bervariasi, diperkirakan sekitar 6 - 48 bulan (Pintauli, 2008).

2.2 Bakteri *Staphylococcus aureus*

2.2.1 Klasifikasi

Tabel 2.1 Taksonomi *Staphylococcus aureus* (Whitman, 2009)

Klasifikasi	Keterangan
Domain	<i>Bacteria</i>
Kingdom	<i>Eubacteria</i>
Filum	<i>Firmicutes</i>
Kelas	<i>Cocci</i>
Ordo	<i>Bacillales</i>
Famili	<i>Staphylococcaceae</i>
Genus	<i>Staphylococcus</i>
Spesies	<i>Staphylococcus aureus</i>



Gambar 2.2 Hasil Pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* (Toelle and Lenda, 2014)

Keterangan: Hasil pewarnaan gram *Staphylococcus aureus* menunjukkan bakteri berbentuk kokus dan berwarna ungu.

Pada tahun 1884, Rosenbach membagi *Staphylococcus* menjadi *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus albus*. *Staphylococcus* dan kelompok saprofit micrococci yang membentuk tetrad digabungkan Zopf ke dalam genus Micrococci pada tahun 1885 dan dipisahkan lagi oleh Flugge. Kemudian Evans, Bradford, dan Niven pada tahun 1995 membagi cocci aerob fakultatif dan aerob obligat menjadi genus *Staphylococcus* dan *Micrococcus* berdasarkan tes *Oxidation – Fermentation*. Kemajuan yang pesat terjadi ketika membandingkan struktur DNA keduanya, dimana *Micrococci* memiliki komponen G+C sebanyak 63-73 mol%, dan *Staphylococci* memiliki komponen G+C sebanyak 30-39 mol% yang menunjukkan bahwa keduanya tidak terlalu berhubungan. Banyak studi secara sistematis menunjukkan perbedaan *Staphylococci* dan *Micrococci* dan bakteri lainnya menggunakan banyak faktor seperti komposisi dinding sel, sitokrom dan menaquinon, asam lemak sel dan polar lipid, hibridisasi, dan katalog perbandingan oligonukleotida. Sekarang genus *Staphylococcus* termasuk dalam bakteri gram positif dan memiliki komponen DNA G+C yang rendah (Peacock, 2006).

2.2.2 Karakteristik dan Morfologi

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif yang menghasilkan pigmen kuning, bersifat aerob fakultatif, tidak menghasilkan spora dan tidak motil, umumnya tumbuh berpasangan maupun berkelompok, dengan diameter sekitar 0,8-1,0 μm . Bakteri ini tumbuh dengan optimum pada suhu 37°C dengan waktu pembelahan 0,47 jam. Infeksi serius akan terjadi ketika resistensi inang melemah karena adanya perubahan hormon, adanya penyakit, luka, atau perlakuan menggunakan obat-obatan steroid dan obat lain yang mempengaruhi imunitas sehingga terjadi pelemahan inang (Robert, 2010).

Staphylococcus tidak bergerak dan tidak berspora. Akibat pengaruh beberapa zat kimia seperti penicillin, *Staphylococcus* dapat kehilangan dinding selnya yang keras dan berubah menjadi bentuk L (Protoplas). Protoplas ini bisa berubah kembali menjadi *Staphylococcus* yang berdinding keras jika pengaruh bahan kimia yang bersangkutan dihilangkan dari lingkungan. *Staphylococcus* tidak dipengaruhi oleh garam empedu dan optochin (Syahrurachman, 2004).

Bakteri *Staphylococcus* mudah tumbuh pada kebanyakan pembenihan bakteri pada keadaan aerobik atau mikroaerofilik. Bakteri ini tumbuh paling cepat pada suhu 37°C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25°C). Pada lempeng agar koloni *Staphylococcus* berbentuk bulat, licin, cembung, dan mengkilat. Koloni *Staphylococcus* berwarna abu-abu sampai kuning tua keemasan. Pigmen *Staphylococcus* tidak terbentuk pada keadaan anaerob atau bila tumbuh pada medium cair (Brooks *et al*, 2007).

Sifat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* menghasilkan katalase. Bakteri ini meragikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat, tetapi tidak menghasilkan gas (Syahrurachman, 2004).

2.2.3 Struktur Antigen

Staphylococcus aureus mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigenik. Bahan-bahan ekstraseluler dari bakteri ini juga banyak yang bersifat antigenik. Polisakarida yang ditemukan pada jenis yang virulen disebut polisakarida A dan yang tidak patogen disebut polisakarida B. Polisakarida A merupakan komponen dinding sel yang dapat dihilangkan dengan menggunakan asam triklorasetat. Antigen ini merupakan suatu kompleks peptidoglikan asam teikhoat dan dapat menghambat fagositosis. Antigen protein A terletak di luar antigen polisakarida, keduanya membentuk dinding sel kuman bersama-sama (Syahrurachman, 2004).

2.2.4 Komponen Seluler dan Komponen Sekresi

2.2.4.1 Membran Sel dan Dinding Sel

Membran sel terdiri dari bilayer lipid-protein yang tersusun oleh phospholipid dan protein. *Cytochrome* dan *menaquinone* yang terikat pada membran sel berperan paling penting dalam sistem transportasi elektron. Dari protein-protein yang diisolasi dari membran *Staphylococcus aureus*, terdapat beberapa *penicillin-binding proteins* (PBPs) yang mengkatalase reaksi-reaksi terminal dari biosintesis peptidoglikan. *Iron regulate cell membrane protein* terekspresi dalam pembatasan *iron*. *42-kDa cell-wall protein* yang mengikat *transferrin* manusia merupakan *iron-binding protein*. *Peptidoglycan* dan *teichoic acid* adalah komponen utama dari dinding sel *Staphylococcus*. Aktivitas biologis dari peptidoglikan di antaranya menghasilkan endotoksin, menyebabkan reaksi inflamasi kulit, dan menghambat migrasi leukosit (Peacock, 2006).

2.2.4.2 Cell Surface Associated dan Komponen Sekresi

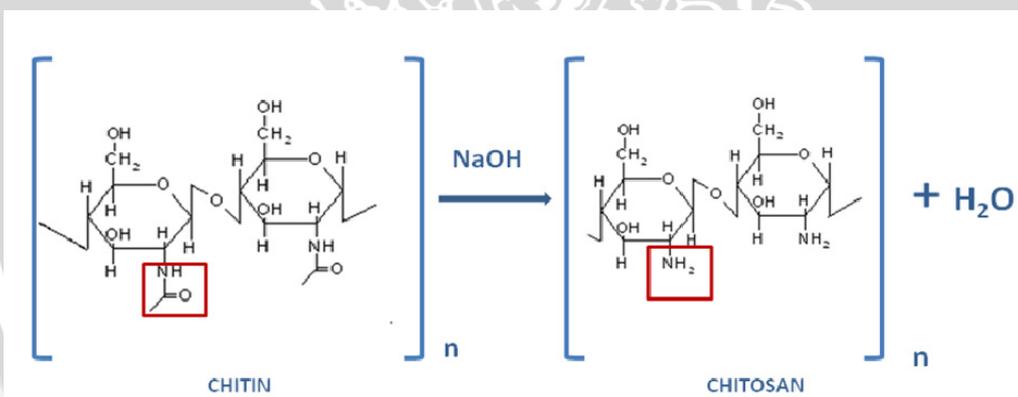
Perlekatan dengan komponen plasma larut dan atau matriks ekstraseluler dimediasi oleh beberapa protein yang berhubungan dengan dinding sel. Adhesi

ini memiliki peran utama dalam kolonisasi pada host dan saat terjadi penyakit invasif (Peacock, 2006).

2.2.4.3 Toksin Ekstraseluler

Staphylococcus aureus memproduksi sekelompok toksin pirogenik yang menyebabkan demam dan *shock* pada hostnya. Toksin ini diklasifikasikan sebagai superantigen (SAGs) dan termasuk di dalamnya *staphylococcal enterotoxins* (SEs) dan *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1) yang memiliki aktivitas mitogenik yang poten terhadap Limfosit-T dari beberapa spesies host. *Staphylococcus* juga memproduksi empat tipe *hemolysin*, yaitu: toksin α -, β -, δ -, dan γ -. *Hemolysin* ini menyerang membran eritrosit dan beberapa sel lain dari berbagai spesies host (Peacock, 2006).

2.3 Kitosan



Gambar 2.3 Skema deasetilasi kitin menjadi kitosan melalui hidrolisis NaOH (De Carvalho et al, 2011)

Cangkang dari hewan *crustaceae* seperti lobster, kumbang dan udang mengandung kitin. Kitin merupakan bahan polimer yang memiliki struktur yang keras, tersusun atas N-asetil-d-glukosamin yang lebih banyak dari glukosa, tetapi mempunyai struktur yang hampir sama dengan selulosa (Kurita, 2006). Kitin dapat diubah menjadi kitosan (*poly- β -1,4-glucosamine*) melalui berbagai proses kimiawi. Besarnya kandungan kitin berpengaruh pada besarnya kandungan

kitosan di dalamnya. Besarnya kandungan kitin pada cangkang *crustacea* dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Konsentrasi Kitin dari Hewan *Crustacea* (Arbia *et al.*, 2013; Synowiecky *et al.*, 2003)

Sumber Kitin	Kitin (%)
Kepiting	13,5
Udang windu (<i>Peneaus monodon</i>)	40,4
Udang putih/ biasa (<i>Penaeus sp.</i>)	33,0
Cangkang kerang	3,6

Kitin dalam kulit udang sebesar 58-85% dan dapat diisolasi melalui proses deproteinasi yang diikuti dengan demineralisasi. Kitin diubah menjadi kitosan melalui proses deasetilasi untuk menghilangkan lebih dari 70% gugus asetil ($\text{CH}_3\text{CO}-$) (Teng, 2012). Kitosan merupakan polimer alami kedua terbanyak di alam setelah selulosa, yang banyak terdapat pada serangga, *crustacea*, dan fungi (Sandford, 2003). Kitosan bersifat tidak toksik dan biokompatibel. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa kitosan berpotensi sebagai antimikroba terhadap beberapa organisme (Vinsova *et al*, 2008).

2.3.1 Manfaat

Kitosan lebih mudah larut daripada kitin karena adanya penghilangan gugus asetil. Hal ini menjadi alasan kitosan lebih banyak digunakan daripada kitin, antara lain pada industri kertas, pangan, farmasi, fotografi, kosmetika, fungisida dan tekstil sebagai pengemulsi, koagulan, pengkelat serta pengental emulsi (Sugita, 2009). Penelitian terkini, menyebutkan bahwa kitosan berpotensi sebagai antimikroba, antikanker dan antiinflamasi. Kitosan dengan *Low Molecular Weight* telah diteliti mampu menghambat proliferasi sel tumor akibat

adanya aktifitas sitotoksik. Penambahan nanopartikel kitosan pada *theophylline* dapat meningkatkan efek antiinflamasi pada obat tersebut (Kim, 2014).

Kitosan berpotensi sebagai antimikroba baik dalam ukuran *Low Molecular Weight* (LMW) maupun dalam ukuran *High Molecular Weight* (HMW). Kitosan berpotensi sebagai antimikroba akibat adanya interaksi muatan positif kitosan dengan muatan negatif pada membran sel bakteri, yang meningkatkan permeabilitas membran sel bagian luar. Hal ini akan menyebabkan hilangnya penyusun membran sel bagian luar seperti protein, lipopolisakarida, dan fosfolipid. Hasil dari proses tersebut akan menghambat metabolisme mikroorganisme dan akhirnya mengakibatkan kematian sel (Kurniasih *et al*, 2009). Mekanisme lain yang mungkin terjadi adalah kitosan membentuk sebuah lapisan yang menghalangi bakteri untuk melakukan transport nutrisi melalui dinding sel sehingga menghambat metabolisme sel. Hasil dari proses ini adalah kematian sel (Kim *et al*, 2014). Kemungkinan mekanisme yang lain adalah muatan positif kitosan berinteraksi dengan DNA bakteri, yang mengakibatkan terhambatnya sintesis RNA dan protein. Pada mekanisme ini, kitosan harus mempunyai berat molekul kecil agar dapat masuk dalam sel mikroorganisme (Kurniasih *et al*, 2009; Liu *et al*, 2004).

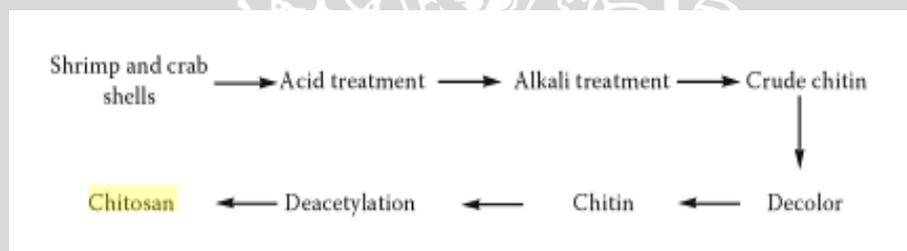
2.3.2 Sifat Kitosan

Kitosan merupakan salah satu produk biologis yang bersifat kationik, tidak beracun, *biodegradable*, dan biokompatibel. Kitosan memiliki banyak gugus amino (NH_2) sehingga bersifat basa. Kitosan tidak dapat larut dalam air dan beberapa pelarut organik seperti dimetilsulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), pelarut alkohol organik, dan piridin. Kitosan dapat larut dalam asam organik maupun asam mineral encer melalui protonasi gugus amino bebas ($\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$) pada pH kurang dari 6,5. Bahan yang dapat digunakan sebagai pelarut

kitosan di antaranya adalah asam format, asam asetat, dan asam glutamat (Khan *et al*, 2002)

2.4 Metode Deasetilasi

Kitosan dapat diambil dari kulit udang dengan cara menghilangkan gugus asetil dari kitin. Kitosan dapat dibuat melalui deasetilasi metode kimiawi maupun enzimatis (Teng, 2012). Umumnya kitosan memiliki derajat deasetilasi 75-100%. Derajat deasetilasi dan massa molekul kitosan hasil deasetilasi kitin pada dasarnya dipengaruhi oleh konsentrasi alkali/ basa, rasio larutan terhadap padatan, suhu dan waktu reaksi, lingkungan/ kondisi reaksi selama deasetilasi. Konsentrasi alkali, rasio padatan dan larutan yang tinggi dapat memfasilitasi proses deasetilasi menghasilkan kitosan yang memiliki sifat fito-kimia yang memenuhi syarat untuk berbagai aplikasi (Ramadhan *et al*, 2010).



Gambar 2.4 Metode Pengambilan Kitosan (Teng, 2012)

Metode deasetilasi merupakan salah satu metode kimiawi. Preparasi kitosan dari kulit udang dilakukan melalui beberapa proses antara lain penghilangan protein, penghilangan mineral, dan deasetilasi (Kurniasih, 2009). Kitin diisolasi dari kulit udang dengan proses deproteinasi dalam NaOH 3,5% (b/v) dengan rasio massa kulit udang terhadap larutan 1: 10 selama dua jam pada suhu 65⁰C, kemudian dilanjutkan demineralisasi dengan HCl 1 N (rasio 1:15 b/v) selama 1 jam pada suhu kamar. Proses deasetilasi kitin menjadi kitosan dilakukan dengan pengerjaan secara bertahap dalam larutan NaOH 50% (Teng, 2012).

2.5 Udang WIndu (*Penaeus monodon*)

2.5.1 Taksonomi

Tabel 2.3 Taksonomi *Penaeus monodon* (Suyanto, 2009)

Klasifikasi	Keterangan
Filum	<i>Arthropoda</i>
Subfilum	<i>Mandibulata</i>
Kelas	<i>Crustacea</i>
Ordo	<i>Decapoda</i>
Familia	<i>Penaeidae</i>
Genus	<i>Penaeus</i>
Spesies	<i>Penaeus monodon</i>

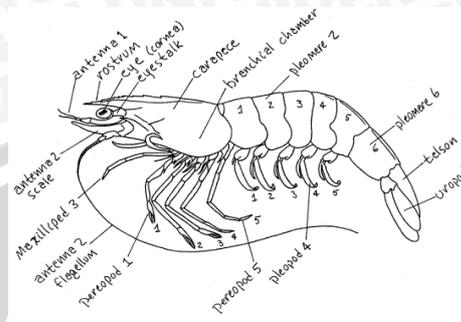


Gambar 2.5 Udang windu (*Penaeus monodon*) (Suyanto, 2009)

2.5.2 Morfologi dan Persebaran Udang

Tubuh udang dapat dibagi menjadi dua bagian, yaitu bagian kepala dan bagian badan. Bagian kepala menyatu dengan bagian dada disebut *cephalothorax* yang terdiri dari 13 ruas, yaitu 5 ruas di bagian kepala dan 8 ruas di bagian dada. Bagian badan dan abdomen terdiri dari 6 ruas, tiap-tiap ruas (segmen) mempunyai sepasang anggota badan (kaki renang) yang beruas-ruas pula. Ujung ruas keenam terdapat ekor kipas 4 lembar dan satu telson yang berbentuk runcing (Fox, 2006). Populasi udang banyak terdapat pada pantai

pesisir utara Jawa Timur, khususnya Tuban dan Gresik karena pada dua daerah tersebut mampu menghasilkan 44 ton udang dari tambak seluas enam hektar (Prasetyo, 2014).



Gambar 2.6 Morfologi Udang (Fox, 2006)

2.5.3 Manfaat Udang

Banyak sekali manfaat yang terkandung dalam tubuh udang, diantaranya adalah kandungan *astaxanthin* sebagai pewarna alami pada udang, pada beberapa penelitian telah terbukti mengandung antioksidan yang mendukung sistem saraf dan muskuloskeletal. Penelitian lain bahkan menyebutkan bahwa zat ini mampu menurunkan resiko kanker kolon dan menurunkan resiko penyakit yang berhubungan dengan diabetes. Selain itu, udang juga kaya akan selenium dan tembaga. Kedua mineral ini dapat berperan sebagai antioksidan dalam tubuh. Selenium menurunkan resiko infeksi paru-paru, menurunkan resiko penyakit kardiovaskular dan menurunkan resiko diabetes tipe 2. Tembaga memiliki fungsi dalam enzim *copper-zinc superoxide dismutase* (SOD). Enzim ini ditemukan dalam sitosol dan memiliki peranan penting dalam regulasi metabolisme oksigen dan mencegah stres oksidatif (Mateljan, 2001).

2.5.4 Kandungan Kulit Udang

Kulit udang terdiri atas empat lapisan, yaitu : epikutikula, eksokutikula, endokutikula dan epidermis. Kulit udang yang keras tersusun dari protein, mineral kalsium karbonat (CaCO_3), kitin dan komponen lain seperti lemak dan protein. Sebanyak 19,4% kitin terkandung dalam satu gram kulit udang.

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa kulit udang banyak mengandung kitin dan kitosan yang sangat berguna bagi tubuh kita. Kitin dapat digunakan dalam terapi pasien dengan luka bakar karena meningkatkan proses penyembuhan. Kandungan mineral dalam kitin dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan sebagai bahan perbaikan tulang (Sahelian, 2015). Kitosan dalam kulit udang menunjukkan lebih banyak manfaat antara lain sebagai antimikroba, menurunkan kolesterol, menurunkan tekanan darah, detoksifikasi pada hati dan sebagai antitumor (Haider, 2012).

2.6 Mekanisme Kerja Antimikroba

Mekanisme aksi obat antimikroba dapat dikelompokkan dalam empat kelompok utama menurut Brooks *et al*, 2004, yaitu:

2.6.1 Penghambatan terhadap Sintesis Dinding Sel

Bakteri mempunyai lapisan luar yang rigid, yakni dinding sel. Dinding sel ini berfungsi untuk mempertahankan mikroorganisme dan pelindung sel bakteri, yang mempunyai tekanan osmotik internal yang tinggi. Trauma pada dinding sel atau penghambatan pembentukannya menimbulkan lisis pada sel. Semua obat β -lactam menghambat sintesis dinding sel bakteri dan oleh karena itu aktif melawan pertumbuhan bakteri. Obat β -lactam misalnya basitrasin, sefalosporin, sikloserin, penisilin, dan vankomisin (Brooks *et al.*, 2004).

2.6.2 Penghambatan terhadap Fungsi Membran Sel

Sitoplasma semua sel hidup dibatasi oleh membrane sitoplasma yang berperan sebagai barrier permeabilitas selektif, membawa fungsi transport aktif, dan kemudian mengontrol komposisi internal sel. Jika fungsi integritas membran sitoplasma rusak, makromolekul dan ion keluar dari sel, kemudian sel rusak atau terjadi kematian. Obat yang termasuk golongan ini misalnya amfoterisin B, kolistin, imidazole, triazol, polien, dan polimiksin (Brooks *et al.*, 2004).

2.6.3 Penghambatan terhadap Sintesis Protein

Telah diketahui bahwa eritromisin, linkomisin, tetrasiklin, aminoglikosida, dan kloramfenikol dapat menghambat sintesis protein pada bakteri. Mekanisme yang tepat tidak seluruhnya diketahui. Bakteri memiliki 70SS ribosom, sedangkan sel mamalia memiliki 80SS ribosom. Sub unit masing-masing tipe ribosom, komposisi kimianya, dan spesifikasi fungsinya berbeda, bisa untuk menerangkan mengapa antimikroba dapat menghambat sintesis protein dalam ribosom bakteri tanpa berpengaruh pada ribosom mamalia (Brooks *et al.*, 2004).

2.6.4 Antagonis Metabolit

Mekanisme kerja senyawa anti metabolit adalah dengan cara menghambat secara kompetitif terhadap sintesis metabolit esensial. Obat yang termasuk dalam golongan ini misalnya sulfonamide, trimethoprim, pirimetamin, dan trimetrexat. Sulfonamide secara structural analog dengan PABA (Para-aminobenzoic Acid) dan menghambat dihidropteroat sintetase. Sulfonamide masuk ke dalam reaksi dimana terdapat PABA dan bersaing pada sasaran enzim yang aktif. Sebagai hasilnya, dibentuk asam folat analog yang nonfungsional sehingga bakteri tidak dapat tumbuh. Trimethoprim menghambat enzim dihidrofolat reduktase 50.000 kali lebih efisien pada sel bakteri daripada sel mamalia. Enzim ini mereduksi dihidrofilik terhadap asam tetrahidrofolat, merupakan rangkaian sintesis purin dan juga DNA. Primetamin juga menghambat dihidrofolat reduktase, tetapi lebih aktif melawan enzim pada sel mamalia dan lebih toksik daripada trimethoprim (Dzen *et al.*, 2003; Brooks *et al.*, 2004).