

BAB I

PENDAHULUAN

Gastroenteritis merupakan penyebab utama penyakit pada anak-anak yang memerlukan perawatan di rumah sakit dan 80% daripadanya berumur sampai dengan 3 tahun. Angka kematian tertinggi karena penyakit ini juga didapatkan pada kelompok umur tersebut (47).

Di Poli Anak RSUD Dr. Soetomo Surabaya, penyakit ini merupakan penyakit ke-2 terbanyak pada anak-anak di bawah 2 tahun. Gambaran klinis penderita di mana kuman tersangka penyebab penyakit dapat ditemukan, tidak dapat dibedakan dari gambaran klinis penderita di mana kuman tersangka penyebab penyakit tidak dapat ditemukan (48).

Sebagai salah satu gejala klinis gastroenteritis, diare masih merupakan masalah kesehatan masyarakat di seluruh dunia terutama di negara-negara yang sedang berkembang (61). Secara global (tidak termasuk Cina), pada tahun 1980 diperkirakan terjadi sejumlah 744 juta episode diare akut pada anak-anak balita dan 4,6 juta di antaranya meninggal. Diare paling banyak dijumpai pada anak-anak di bawah umur 2 tahun di mana terjadi 2-3 kali episode diare setiap tahunnya; dan angka kematian yang tertinggi juga didapatkan pada kelompok umur tersebut

yaitu sebesar 20% (81).

Di Indonesia, jumlah anak balita pada tahun 1980 adalah sebesar 14% dari jumlah penduduk sehingga diperkirakan terdapat 20 juta anak balita (1). Pada tahun yang sama, jumlah proporsi kematian kelompok ini dalam 1 tahun adalah sebesar 17,7% dari seluruh kematian ini sedangkan untuk bayi kurang dari 1 tahun sebesar 28%. Di antara penyebab kematian bayi kurang dari 1 tahun diare merupakan penyebab utama yaitu sebesar 24,1% (83). Setiap tahun diperkirakan terdapat 60 juta kejadian diare di mana 60-80% di antaranya mengenai anak balita dan angka kematian pada bayi dan anak balita adalah 125.000-150.000 tiap tahun (35). Diare paling banyak dijumpai pada anak-anak di bawah umur 2 tahun dan kematian terutama dalam lingkup umur 2 tahun sebagian besar disebabkan oleh karena diare (82). Di samping itu, diare dapat menyebabkan pula gangguan nutrisi dan perkembangan bayi dengan segala permasalahannya (82). Dengan demikian diare merupakan masalah kesehatan masyarakat (84).

Sebagai salah satu penyebab gastroenteritis bakterial, *Campylobacter fetus* subspecies jejuni ditemukan dari tinja pada 7,1% penderita dengan diare (78). Blaser dkk. (4) menemukan angka ini sebesar 5,1%; Pai dkk. (65) menemukan angka ini sebesar 4,3%; Ringertz dkk. (72) menemukan angka ini sebesar 5%; sedangkan Smith, Durfee

dan Marymont (80) menemukan angka ini sebesar 4,8%. Penulis (90) menemukan kuman ini dari tinja pada 10% penderita anak di bawah 2 tahun dengan diare; dan Young dkk. (94) menemukan kuman ini dari tinja pada 11,8% penderita dengan diare. *Campylobacter fetus* subspecies jejuni dapat diisolasi dalam keadaan murni dari tinja penderita dengan gastroenteritis (4,65,72,78,80,90,94) sedangkan dari anak/orang sehat, kuman ini tidak ditemukan (4,16,65,90) atau ditemukan sebesar 0,5% (72). Dari usus penderita diare yang meninggal sesudah rehidrasi, 12% di antaranya dapat ditemukan kuman ini (15).

Selain telah dinyatakan dalam Memorandum WHO bahwa *Campylobacter fetus* subspecies jejuni dapat menyebabkan gastroenteritis pada manusia, kuman ini juga dinyatakan sebagai salah satu kuman penyebab terjadinya diare persisten. Di beberapa negara berkembang, 3-20% anak balita yang menderita diare akut akan mengalami diare persisten dengan angka kematian sebesar 14-56% (58).

Mengingat dampak negatif berupa hilangnya berat badan, marasmus, malnutrisi, perlambatan pertumbuhan pada anak yang mengalami diare persisten (58), dan adanya penularan dari penderita ke anak/orang di sekitarnya (10), maka jelas bahwa gastroenteritis karena *Campylobacter fetus* subspecies jejuni perlu ditangani dengan baik.

Walaupun gastroenteritis karena *Campylobacter* dapat

terjadi karena adanya hygiene lingkungan yang kurang memadai (1,82) namun dalam upaya menurunkan angka kematian bayi/anak di Indonesia pada saat ini, penanganan langsung kasus-kasus diare merupakan pendekatan yang lebih layak dibandingkan dengan upaya perbaikan ekonomi dan lingkungan (82).

Mengingat kurang jelasnya peran obat-obat antimikrobia dan masih banyaknya ekskretor kuman pasca diare serta dampak negatif berupa kemungkinan terjadinya resistensi kuman terhadap obat-obat antimikrobia maka pada pola penanganan diare pada bayi/anak, pengobatan dengan obat antimikrobia tidak diberikan pada kasus diare akut murni (tanpa komplikasi dengan penyakit lain); pengobatan dengan obat antimikrobia sistemik dipertimbangkan pemberiannya pada bayi umur sampai 2 bulan dengan dugaan kemungkinan terjadinya sepsis (82).

Mengingat adanya perbedaan cara penanganan kasus-kasus diare tersebut dan adanya kemungkinan *Campylobacter fetus* subspecies jejuni menyebabkan diare persisten dengan segala akibatnya maka tanpa mengesalkan keberhasilan pengobatan dengan cairan elektrolit (83,85), pengetahuan tentang sebab terjadinya penyakit menjadi sangat penting artinya.

Belum diketahui jelas, dengan cara bagaimana *Campylobacter fetus* subspecies jejuni menimbulkan penyakit

gastroenteritis karena hasil penelitian yang satu dengan hasil penelitian lainnya saling berbeda, bahkan ada yang bertentangan (16,25,34,45,54,63,75,76).

Guerrant dkk. (34) gagal menunjukkan adanya toksin peka panas (heat-labile toxin) pada segmen ileum kelinci yang diligasi (ligated rabbit ileal loop) dan pada perbenihan sel. Butzler dan Skirrow (16) juga gagal menunjukkan adanya toksin ini pada perbenihan sel. Fernandez dkk. (25) menemukan adanya respon sekresi supernatan biakan kuman ini, dan Klipstein dan Engert (45) menemukan bahwa kuman ini bervariasi kemampuannya dalam menghasilkan toksin peka panas. Akan tetapi, Olsvik dkk. (63) tidak menemukan adanya gene untuk memproduksi toksin peka panas.

Adanya toksin tahan panas (heat-stable toxin) juga gagal ditunjukkan oleh Guerrant dkk. (34) tetapi Butzler dan Skirrow (16) menemukan toksin ini hanya pada beberapa strain kuman saja. Untuk lebih memastikan apakah kuman ini menghasilkan toksin tahan panas, seperti halnya *Escherichia coli*, perlu penelitian lebih lanjut.

Invasi *Campylobacter fetus* subspecies jejuni baru diketahui pada perbenihan sel embrio ayam dan anak ayam yang berumur 8 hari (16), berumur 3 hari (75,76), namun tidak terjadi pada percobaan oleh Manninen, Prescott dan Dohoo (54). Sedangkan invasi pada hewan percobaan lain

yang lazim dipakai, yaitu golongan mammalia, belum pernah terbukti (7,26).

Oleh karena itu penulis berusaha untuk ikut mencari apakah penyakit gastroenteritis karena kuman ini disebabkan oleh proses toksin ataukah oleh proses invasi kuman ke dalam mukosa usus.

BAB II

LANDASAN TEORI

Campylobacter fetus subspecies jejuni adalah kuman berbentuk batang bengkok, berbentuk seperti huruf S atau spiral dengan ukuran 0,2-0,5 mikron X 1,5-5 mikron, bersifat Gram negatif, aktif bergerak dengan flagella pada satu atau kedua ujungnya (12,16,60). Kuman ini bersifat mikroaerofilik, tumbuh pada suhu 35°C-45°C tetapi tidak tumbuh pada suhu 25°C (12,13,16,30,50,60,88). Tumbuh baik pada media yang ditambah dengan ekstrak ragi (57). Kadar NaCl yang ditoleransi baik adalah 0,5% (22) dan pH optimumnya adalah 7-7,5 (57). Mudah dimatikan oleh desinfektan yang biasa dipakai seperti alkohol 70%, glutaraldehid 0,125%, phenol 0,15% (89).

Secara normal kuman ini dapat ditemukan pada saluran cerna hewan ternak mammalia seperti kambing, domba, lembu, babi (12). Dengan ditemukannya cara-cara yang lebih baik untuk mendapatkan suasana mikroaerofilik (13,50,88) dan digunakannya media selektif (11,66), kuman ini ditemukan juga pada air susu mentah atau yang tidak dipasteurisasi (5,23,49), saluran cerna bangsa unggas termasuk ayam (33,39), ayam yang siap dipasarkan (43,92) dan ayam yang sedang bertelur (24). Juga dapat ditemukan pada air

tanah (55). Adanya dugaan bahwa lalat rumah bertindak sebagai vektor (74), maka bukan tidak mungkin akan memperbesar kemungkinan kuman ini menyebabkan infeksi pada manusia.

Infeksi pada manusia terjadi dengan perantara makanan atau minuman yang terkontaminasi oleh kuman ini (9). Grados dkk. (32) menemukan bahwa sentuhan dengan tinja ayam merupakan faktor utama terjadinya infeksi kuman ini pada anak-anak; dan kuman ini bertahan dalam tinja ayam sampai 96 jam. Penyakit yang ditimbulkan oleh kuman ini adalah gastroenteritis dengan gejala utama diare, sakit perut dan panas (4,16,41,65,80). Masa inkubasinya 3-5 hari (16). Diare berlangsung antara 2-3 hari sampai 7 hari (16,65), sakit perut berlangsung selama 7 hari dan panas berlangsung selama 3 hari (65). Pada beberapa kasus dijumpai adanya muntah dan adanya darah pada tinja (16,41,65,80). Kuman dijumpai pada tinja penderita selama 2 hari dan pada kasus yang tidak diobati kuman dapat tetap ditemukan selama 2-7 minggu (16,41,65). Sebagian besar penderita sembuh dalam waktu kurang dari 1 minggu dan sebagian kecil (20%) dapat mengalami kekambuhan atau menjadi kronis (4).

Antimikroba yang dapat digunakan untuk mengobati penderita adalah Furazolidon, Gentamisin, Eritromisin, Tobramisin, Amikasin, Tetrasiklin, Kloramfenikol, Tiam-

fenikol, Klindamisin. Penisilin maupun Sefalosporin menunjukkan aktifitas yang jelek (86,87) sedangkan terhadap Vankomisin, Trimetoprim dan Polimiksin B kuman ini menunjukkan resistensi (9).

Selama ini diketahui bahwa kuman penyebab penyakit saluran cerna menimbulkan kelainan melalui beberapa cara yaitu pembentukan toksin atau mengadakan invasi. Toksin yang telah berhasil diketahui dihasilkan oleh kuman-kuman tersebut adalah toksin peka panas, seperti yang dihasilkan oleh *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*; dan toksin tahan panas, seperti yang dihasilkan oleh *Escherichia coli*. Sedangkan kemampuan mengadakan invasi ditunjukkan oleh *Shigella*, yang invasinya bersifat lokal, *Salmonella* dan *Yersinia*, yang invasinya bersifat sistemik (16).

Adanya toksin peka panas dapat diketahui secara tidak langsung melalui percobaan dengan segmen ileum kelinci yang diligasi (ligated rabbit ileal loop) (19,34) ataupun dengan perbenihan sel (tissue culture) (16,34), sedangkan toksin tahan panas dapat diketahui secara tidak langsung melalui percobaan pada bayi mencit (16,34,54).

Pada percobaan dengan segmen ileum kelinci yang diligasi, toksin peka panas merangsang terjadinya sekresi cairan yang berlebihan dan volume cairan tersebut diukur untuk tiap satuan panjang segmen ileum yang dipakai (34), sedangkan pada perbenihan sel menyebabkan perubahan mor-

fologi sel-sel perbenihan selnya yaitu berupa pemanjangan sel-sel Chinese Hamster Ovary (CHO) (34).

Percobaan menggunakan segmen ileum kelinci yang diligasi, memerlukan biaya mahal, waktu yang lama dan kadang-kadang hasilnya bervariasi (19,34). Percobaan menggunakan perbenihan sel juga memerlukan biaya mahal dan sangat kompleks pelaksanaannya. Mahal karena memerlukan (16,34):

- medium khusus untuk pertumbuhan cell line misalnya Eagle medium, MEM, M199
- fetal calf serum/fetal bovine serum
- cell line misalnya CHO cell, Hela cell, MK2 cell
- laminar flow
- antibiotika dan anti jamur

Pelaksanaannya kompleks karena memerlukan perbenihan sel satu lapis (monolayer) pada gelas penutup (cover glass), pencucian tiga kali dengan larutan garam bufer fosfat (PBS) hangat lalu inokulasi dengan suspensi kuman dalam medium khusus. Sesudah inkubasi selama tiga jam, perbenihan sel satu lapis yang telah diinokulasi dicuci tiga kali dengan larutan PBS, kemudian ditambahkan medium khusus yang disuplementasi dengan 8% newborn calf serum dan antimikroba. Sesudah inkubasi lagi selama tiga jam, perbenihan sel satu lapis dicuci lagi tiga kali dengan larutan PBS, lalu dikeringkan (54).

Pada percobaan dengan bayi mencit, toksin tahan panas merangsang terjadinya sekresi cairan yang berlebihan kemudian dihitung perbandingan antara berat usus dan berat badan sisa (16,34,54). Percobaan menggunakan bayi mencit memerlukan biaya yang lebih murah, waktu yang lebih cepat dan hasil yang lebih seragam (uniform) daripada menggunakan segmen ileum kelinci yang diligasi (19).

Kemampuan invasi kuman dapat diketahui secara tidak langsung dengan uji Sereny (34,54) atau dengan perbenihan sel (54); atau secara langsung dengan menggunakan mikroskop elektron (16). Uji Sereny menggunakan marmot di mana adanya invasi ditandai dengan terjadinya konjungtivitis purulenta atau keratitis (34,54). Invasi pada perbenihan sel menyebabkan penetrasi sel kuman ke dalam perbenihan sel atau terjadi lisis sel (54). Sedangkan pada pemeriksaan mikroskop elektron perlu ditemukan adanya kuman yang diteliti pada sediaan yang berasal dari hewan percobaan yang dipakai (16).

BAB III

PERMASALAHAN, HIPOTESIS, TUJUAN PENELITIAN

III.1. Permasalahan

Permasalahan yang dapat dikemukakan di sini adalah :

1. Apakah *Campylobacter fetus* subspecies jejuni menghasilkan toksin tahan panas.
2. Apakah *Campylobacter fetus* subspecies jejuni mengadakan invasi ke dalam mukosa usus.

III.2. Hipotesis

Dengan permasalahan seperti tersebut di atas, dapat dikemukakan hipotesa sebagai berikut :

1. Hipotesis nol : *Campylobacter fetus* subspecies jejuni tidak menghasilkan toksin tahan panas dan tidak mengadakan invasi ke dalam mukosa usus.
2. Hipotesis alternatif :
 - 2.1. Hipotesis alternatif 1 : *Campylobacter fetus* subspecies jejuni tidak menghasilkan toksin tahan panas tetapi mengadakan invasi ke dalam mukosa usus.
 - 2.2. Hipotesis alternatif 2 : *Campylobacter fetus* subspecies jejuni menghasilkan toksin tahan panas

tetapi tidak mengadakan invasi ke dalam mukosa usus.

- 2.3. Hipotesis alternatif 3^o : *Campylobacter fetus* subspecies jejuni menghasilkan toksin tahan panas dan mengadakan invasi ke dalam mukosa usus.

III.3. Tujuan Penelitian

Dengan demikian penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui apakah *Campylobacter fetus* subspecies jejuni menghasilkan toksin tahan panas.
2. Mengetahui apakah *Campylobacter fetus* subspecies jejuni mengadakan invasi ke dalam mukosa usus.

BAB IV

BAHAN DAN CARA

IV.1. Kuman Subyek Penelitian

Mikroorganisma subyek penelitian diperoleh dari penderita anak berumur sampai dua tahun dengan diare yang berobat jalan ke Poliklinik Anak RSUD. Dr. Soetomo. Dengan menggunakan lidi kapas steril, diambil usapan rektum penderita tersebut. Usapan rektum dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dengan menggunakan medium transport Amies pada hari yang sama dengan hari pengambilannya. Usapan rektum ditanam secara penggoresan (streaking) pada medium selektif Skirrow lalu dieramkan secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 42°C.

Koloni yang dicurigai adalah koloni yang pada medium Skirrow memberikan gambaran sebagai berikut: berukuran garis tengah 1-2 mm, konveks, permukaan halus, batas tegas, bagian tepi lebih translucent, tidak menghemolisa darah. Terhadap koloni yang dicurigai dilakukan uji oksidase. Bila uji oksidase positif, perlu dilanjutkan pewarnaan Gram, penanaman pada TSI agar miring, uji motilitas, uji pertumbuhan pada suhu kamar, uji katalase, uji kepekaan terhadap cakram Nalidixic acid 30 ug.

Kuman didiagnosa sebagai *Campylobacter fetus* sub-species jejuni bila: berbentuk batang bengkok, berbentuk seperti huruf S atau spiral, Gram negatif, bersifat mikroaerofilik, memberikan hasil alkali slant alkali butt pada TSI agar miring, uji motilitas positif, tumbuh pada suhu 42°C, tidak tumbuh pada suhu 25°C, uji katalase positif, peka terhadap Nalidixic acid (27,40,51,94).

IV.1.1. Medium Transport

Medium transport yang digunakan adalah medium Amies. Medium ini terdiri dari : charcoal pharmaceutical neutral 10 g/l, sodium chloride 3 g/l, sodium hydrogen phosphate 1,15 g/l, potassium dihydrogen phosphate 0,2 g/l, potassium chloride 0,2 g/l, sodium thioglycollate 1 g/l, calcium chloride 0,1 g/l, magnesium chloride 0,1 g/l, agar no.1 4 g/l.

Medium transport dibuat dengan melarutkan 20 g medium Amies dalam 1 l air suling. Kemudian diisikan ke dalam botol, masing-masing sebanyak 10 ml tiap botol. Sesudah ditutup rapat, disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 20 menit. Sesudah dingin siap dipakai sebagai medium transport. Usapan rektum dibenamkan ke dalam medium transport, kelebihan panjang lidinya diputus lalu ditutup lagi.

IV.1.2. Medium Skirrow

Medium Skirrow dibuat menurut rumus sebagai

berikut: Blood Agar Base No.2 40 g/l, darah kuda 70 ml/l, Vancomycin 10 mg/l, Trimethoprim 5 mg/l, Polymyxin B 2.500 IU/l, air suling 1 l.

Sebanyak 40 g Blood Agar Base No.2 dilarutkan dalam 1 l air suling, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 20 menit. Dibiarkan pada suhu kamar sampai suhunya mencapai $\pm 45^{\circ}\text{C}$ lalu ditambahkan darah kuda sebanyak 70 ml/l. Dicampur hingga rata. Sebanyak 2 ml larutan antibiotika yang mengandung campuran Vancomycin 5 mg, Trimethoprim 2,5 mg, Polymyxin B 1250 IU ditambahkan untuk setiap 500 ml agar darah. Dicampur lagi hingga rata. Lalu dituang secara aseptis ke dalam lempeng gelas sebanyak ± 20 ml medium tiap lempeng gelas. Dibiarkan dingin pada suhu kamar hingga memadat. Sesudah itu diuji sterilitasnya dengan cara dieramkan dalam lemari pengering pada suhu 37°C selama semalam dengan posisi terbalik (tutup lempeng gelas diletakkan di bagian bawah, sedangkan bagian lempeng yang mengandung medium agar terletak di bagian atas). Medium Skirrow yang tetap steril siap dipakai sebagai medium isolasi primer.

Seluruh permukaan usapan rektum diusapkan pada sebagian permukaan medium Skirrow, lalu dengan sengkeliit penanam (inoculating loop) dilanjutkan dengan penggoresan (streaking) untuk mendapatkan koloni terpisah. Lempeng medium yang telah ditanami, dieramkan secara mikroaerofi-

lik selama 2 X 24 jam pada suhu 42°C.

IV.1.3. Uji Oksidase

Reagen oksidase dibuat dengan melarutkan 50 mg p. amino dimethyl aniline oxalate dalam 5 ml air suling steril. Dengan menggunakan pipet reagen oksidase diteteskan pada koloni yang dicurigai. Perubahan warna koloni yang ditetesi menjadi merah lalu hitam dikatakan uji oksidase positif.

IV.1.4. Pertumbuhan Pada Triple Sugar Iron (TSI) Agar Miring

Medium agar TSI terdiri dari : lab-lemco powder 3 g/l, yeast extract 3 g/l, peptone 20 g/l, sodium chloride 5 g/l, lactose 10 g/l, sucrose 10 g/l, dextrose 1 g/l, ferric citrate 0,3 g/l, sodium thiosulphate 0,3 g/l, Phenol red q.s., agar 12 g/l.

Sebanyak 65 g medium agar TSI dilarutkan dalam 1 l air suling kemudian diisikan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 7 ml tiap tabung reaksi. Lalu disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 20 menit. Dibiarkan dingin pada suhu kamar dengan posisi miring. Sesudah padat diuji sterilitasnya dengan cara dicamkan dalam lemari pengering pada suhu 37°C selama semalam. Medium agar TSI yang tetap steril siap untuk ditanami.

Dengan jarum penanam (inoculating needle) diambil sebagian koloni kuman subyek penelitian yang tumbuh pada medium

Skirrow lalu ditusukkan ke dalam agar miring TSI sampai ± 0,5 cm dari dasar tabung reaksi; kemudian ditarik keluar melalui jalan yang sama dengan waktu menusuknya. Sesudah itu permukaan agar miring ditanami secara penggoresan (streaking).

Agar TSI yang telah ditanami dieramkan secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 37°C.

Bila dijumpai adanya pertumbuhan kuman tanpa terjadi perubahan warna agar TSI di bagian slant maupun butt, dikatakan memberikan hasil alkali slant alkali butt.

IV.1.5. Uji Motilitas

Medium untuk uji ini terdiri dari : bacto triptose 10 g/l, sodium chloride 5 g/l, bacto agar 5 g/l, triphenyl tetrazolium chloride 0,05 g/l.

Sebanyak 20 g medium uji motilitas (MTM) dilarutkan dalam 100 ml air suling. Ditambahkan 0,05 g/l Triphenyl Tetrazolium Chlorida. Kemudian diisikan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 4 ml tiap tabung reaksi. Lalu disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 20 menit. Dibiarkan dingin pada suhu kamar dengan posisi tegak. Sesudah dingin diuji sterilitasnya dengan cara dieramkan dalam lemari pengeram pada suhu 37°C selama semalam. Medium uji motilitas yang tetap steril siap untuk ditanami.

Dengan jarum penanam (inoculating needle) diambil sebagi-

an koloni kuman subyek penelitian yang tumbuh pada medium TSI agar miring lalu ditusukkan ke dalam medium uji motilitas sampai $\pm 0,5$ cm dari dasar tabung reaksi, kemudian ditarik keluar melalui jalan yang sama dengan waktu menusuknya.

Medium uji motilitas yang telah ditanami dieramkan secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 37°C .

Bila terdapat pertumbuhan seperti kabut di sekitar bekas tusukan dikatakan uji motilitas positif.

IV.1.6. Uji Pertumbuhan Pada Suhu Kamar

Untuk uji pertumbuhan pada suhu kamar diperlukan medium agar Mueller Hinton. Medium agar Mueller Hinton terdiri dari : meat infusio 6 g/l, casein hydrolysate 17,5 g/l, starch 1,5 g/l, agar no.1 10 g/l.

Sebanyak 35 g medium agar Mueller Hinton dilarutkan dalam 1 l air suling. Kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 20 menit. Dibiarkan pada suhu kamar sampai suhunya mencapai $\pm 45^{\circ}\text{C}$ lalu dituang secara aseptis ke dalam lempeng gelas sebanyak ± 20 ml medium tiap lempeng gelas. Dibiarkan dingin pada suhu kamar hingga memadat. Sesudah itu diuji sterilitasnya dengan cara dieramkan dalam lemari pengeram pada suhu 37°C selama semalam dengan posisi terbalik (tutup lempeng gelas diletakkan di bagian bawah, sedangkan bagian lempeng yang mengandung medium agar terletak di bagian atas). Medium

agar Mueller Hinton yang tetap steril siap untuk ditanam-
i.

Kuman subyek penelitian ditanam secara penggoresan (streaking) pada medium agar Mueller Hinton dan dieramkan secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu kamar.

IV.1.7. Uji Katalase

Untuk uji ini diperlukan medium cair Mueller Hinton yang terdiri dari : beef, infusion from 300 g/l, casein hydrolysate 17,5 g/l, starch 1,5 g/l.

Sebanyak 25 g medium Mueller Hinton dilarutkan dalam 1 l air suling. Kemudian diisikan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml tiap tabung reaksi. Lalu disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 20 menit. Dibiarkan dingin pada suhu kamar. Sesudah dingin diuji sterilitasnya dengan cara dieramkan dalam lemari pengeram pada suhu 37°C selama semalam. Medium cair Mueller Hinton yang tetap steril siap untuk ditanami.

Kuman subyek penelitian ditanam pada medium cair Mueller Hinton dan dieramkan secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 37°C.

Pertumbuhan kuman yang terjadi ditetesi dengan 0,5 ml larutan H₂O₂ 3% lalu dikocok. Bila timbul gelembung-gelembung gas dari dasar tabung reaksi menuju ke permukaan biakan cair dikatakan uji katalase positif.

IV.1.8. Uji Kepekaan Terhadap Nalidixic Acid

Kuman subyek penelitian ditanam pada 5 ml medium cair Mueller Hinton dan dieramkan secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 37°C.

Biakan cair yang diperoleh dibuat homogen lalu disamakan kekeruhannya dengan standard Mc. Farland 0,5 yaitu setara dengan $1,5 \times 10^8$ kuman tiap ml suspensi.

Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam biakan cair yang telah dibuat sama kekeruhannya dengan standard Mc. Farland 0,5, diperas di dinding bagian dalam tabung biakan lalu diusapkan pada seluruh permukaan medium agar Mueller Hinton. Biarkan pada suhu kamar selama 5 menit. Kemudian cakram Nalidixic acid 30 ug ditempelkan pada permukaan agar dan ditekan sedikit.

Lempeng agar Mueller Hinton dieramkan secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 37°C dengan posisi terbalik.

Bila didapatkan daerah hambatan dengan garis tengah 21 mm atau lebih dikatakan kuman peka terhadap Nalidixic acid.

IV.1.9. Suasana Mikroaerofilik

Suasana mikroaerofilik diperoleh dengan menggunakan gas generating kit BR 38 yang diletakkan di dalam sungkup anaerob (anaerobic jar). Tiap kantong gas generating kit mengandung tablet Natrium borohidrida, asam tartarat (tartaric acid) dan Natrium bikarbonat. Bila ke dalam kantong gas generating kit tersebut ditambahkan 10

ml air, akan dihasilkan 1.800 ml gas H₂ dan 350 ml gas CO₂.

IV.1.10. Pewarnaan Gram (Modifikasi Hucker)

Untuk pewarnaan Gram perlu dibuat suspensi kuman dengan air suling pada kaca benda (gelas obyek) terlebih dahulu. Sesudah kering di udara, difiksasi dengan panas api lampu spiritus. Kemudian diwarnai dengan urutan sebagai berikut:

- Tuangi sediaan dengan larutan kristal violet, diamkan selama 10 detik.
- Buang larutan kristal violet dari sediaan.
- Tuangi sediaan dengan lugol, diamkan selama 10 detik.
- Buang lugol dari sediaan.
- Cuci dengan air.
- Tuangi sediaan dengan alkohol 95-96 % dan digoyang-goyang sampai tidak terlihat lagi zat warna yang terlarut.
- Buang alkohol 95-96 % dari sediaan.
- Cuci dengan air.
- Tuangi sediaan dengan Safranin, diamkan selama 10 detik.
- Buang Safranin dari sediaan.
- Cuci dengan air.
- Keringkan di udara.
- Sediaan siap dilihat di bawah mikroskop.

Kuman yang tampak berwarna merah dikatakan Gram negatif.

IV.2. Penyediaan Bahan Perlakuan

Kuman subyek penelitian yang telah ditemukan ditanam pada 5 ml medium cair casamino acid-yeast extract (CA-YE). Dieramkan secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 37°C sambil dikocok. Lalu ditentukan konsentrasi sel kumannya dengan cara tetes (droplet plate method) (62). Sesudah itu sel kumannya dipisahkan dari bagian cairnya dengan alat pemusing (centrifuge) (28,31).

Sebagian dari bagian cairnya (supernatan) ditanam pada lempeng agar Mueller Hinton secara penggoresan (streaking) lalu dieramkan secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 37°C. Bagian cair ini tidak boleh mengandung sel kuman pada waktu diberikan secara intragastrik ke hewan percobaan. Sedangkan terhadap endapan sel kuman yang terbentuk, dilakukan pencucian dengan air suling steril sebanyak 5 ml. Dibuat suspensi kembali dengan bantuan alat Vortex Mixture. Sesudah itu dipusingkan lagi dengan cara seperti sebelumnya untuk memisahkan sel kuman dari bagian cairnya. Bagian cair dibuang lalu dilakukan pencucian sekali lagi. Kemudian terhadap endapan sel kuman yang terbentuk dibuat suspensi kuman dengan air suling steril sehingga didapat konsentrasi 10^6-10^7

kuman tiap ml suspensi.

IV.2.1. Medium Cair Casamino Acid-Yeast Extract (CA-YE)

Medium cair Casamino Acid-Yeast Extract dibuat dengan melarutkan casamino acid sebanyak 1,75 % dan yeast extract sebanyak 0,5 % dalam air suling. Kemudian diisi ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml tiap tabung reaksi. Lalu disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 20 menit. Dibiarkan dingin pada suhu kamar. Sesudah dingin diuji sterilitasnya dengan cara dieramkan dalam lemari pengeram pada suhu 37°C selama semalam. Medium cair casamino acid-yeast extract yang tetap steril siap untuk ditanami.

IV.2.2. Penghitungan Konsentrasi Sel Kuman Dengan Cara Tetes (Dropplet Plate Method)

Dari biakan cair hasil pengeraman, dibuat pengenceran secara seri kelipatan 10 sehingga diperoleh pengenceran sebanyak 10 kali hingga 10^6 kali. Dari tiap pengenceran 10^3 dan 10^4 kali diambil 50 ul suspensi kuman dengan menggunakan pipet mikro dan diteteskan secara tegak lurus sedemikian rupa pada permukaan medium agar Mueller Hinton yang sebelumnya telah dibagi. Penghitungan ini dilakukan berpasangan (duplo).

Sesudah semua bagian cair terserap ke dalam medium agar, lempeng agar Mueller Hinton yang telah ditanami itu dieramkan secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu

37°C.

Pengenceran yang menghasilkan pertumbuhan koloni antara 20-40 dipakai untuk menghitung konsentrasi sel kuman dalam biakan cair semula.

IV.2.3. Pemusingan

Untuk mengetahui bahwa pemusingan yang digunakan tidak berpengaruh pada daya hidup (viabilitas) kuman yang diteliti dan sekaligus dapat memisahkan bagian sel kuman dari bagian cairnya dilakukan penghitungan konsentrasi sel kuman dalam biakan cair sebelum dan sesudah pemusingan, pewarnaan Gram dan penanaman supernatan yang terjadi. Sebanyak 5 ml biakan cair hasil pengeraman, dipusingkan dengan kekuatan sebesar 2000 X g selama 20 menit. Bagian cair (supernatan) diambil secara hati-hati dengan pipet dan dengan alat Vortex Mixture endapan sel kuman yang terbentuk dibuat suspensi lagi dengan air suling steril sampai volumenya seperti semula.

IV.2.3.1. Sebagian dari bagian cair (supernatan) ditanam pada lempeng agar Mueller Hinton secara penggoresan (streaking) dan dieramkan secara mikro-aerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 37°C. Bagian cair (supernatan) ini hendaknya tidak mengandung sel kuman lagi.

IV.2.3.2. Sedangkan konsentrasi sel kuman dalam biakan cair sebelum dan sesudah pemusingan ditentukan

secara tetes. Sebelum dan sesudah pemusingan hendaknya memberikan pertumbuhan sel kuman yang tidak berbeda kualitas maupun kuantitasnya.

IV.2.3.3. Pewarnaan Gram juga dilakukan terhadap biakan cair sebelum pemusingan maupun terhadap suspensi kuman sesudah pemusingan. Hasil pewarnaan Gram hendaknya memberikan gambaran morfologi dan sifat pewarnaan yang sama sebelum dan sesudah pemusingan.

IV.2.4. Dosis Perlakuan

Untuk mendapatkan konsentrasi sel kuman sebesar 10^8 - 10^7 sel kuman tiap ml suspensi, dilakukan penanaman 2 koloni kuman subyek penelitian pada 5 ml perbenihan/medium cair CA-YE. Sesudah dieramkan secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 37°C , dilakukan pemusingan dengan kekuatan sebesar 2000 X g selama 20 menit. Bagian cair (supernatan) diambil secara hati-hati dengan pipet, sedangkan endapan sel kumannya dicuci dengan air suling steril sebanyak dua kali. Sesudah itu, terhadap endapan sel kuman yang terbentuk dibuat suspensi kuman lagi dengan air suling steril hingga volumenya kembali seperti semula.

IV.3. Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang dipakai adalah tikus Wistar

jantan dengan berat 100-150 g dan diperoleh dari ITB melalui Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Sebelum diberi perlakuan, hewan percobaan ini hanya diberi minum selama 2 X 24 jam. Hewan percobaan ini dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok yang mendapat supernatan biakan cair kuman subyek penelitian dan kelompok yang mendapat suspensi kuman subyek penelitian.

IV.3.1. Biakan Isi Usus Halus Hewan Percobaan Sebelum Perlakuan

Sebelum dipakai sebagai hewan percobaan, ditentukan terlebih dahulu ada tidaknya kuman subyek penelitian (atau mikroorganisme yang mirip dengannya) di dalam usus.

Sebanyak 2 ekor tikus dikorbankan, bagian usus masing-masing tikus diambil sebagian pada beberapa tempat secara aseptik dan dimasukkan ke dalam air suling steril. Lalu suspensi yang terbentuk ditanam secara penggoresan (streaking) pada medium Skirrow dan dieramkan secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 37°C.

IV.3.2. Pengujian Terhadap Adanya Toksin Tahan Panas

Tiap tikus pada kelompok yang mendapat supernatan diberi sebanyak 0,2 ml supernatan secara intragastrik. Kemudian dikembalikan ke kandangnya dan dibiarkan pada suhu kamar tanpa diberi minum. Berturut-turut 1 jam,

2 jam, 3 jam, 4 jam sesudah perlakuan, tiap tikus dikorbankan dengan menggunakan ether (79) lalu ditimbang berat badannya. Ususnya diambil dan ditimbang beratnya. Tiap jenis perlakuan dilakukan berpasangan (duplo). Kemudian ditentukan perbandingan antara berat usus (G) dan berat badan sisa (B-G) (19).

IV.3.3. Pengujian Terhadap Adanya Invasi

Tiap tikus pada kelompok yang mendapat suspensi kuman, diberi sebanyak 1 ml suspensi kuman secara intragastrik. Kemudian dikembalikan ke kandangnya dan dibiarkan pada suhu kamar sambil diamati (diobservasi). Berturut-turut 1 hari sampai dengan 5 hari sesudah perlakuan, tiap tikus dikorbankan dengan menggunakan ether (79) lalu ditimbang berat badannya. Bagian ususnya diambil sebagian dan diproses untuk dilihat dengan mikroskop elektron.

Sebagian isi ususnya ditanam secara penggoresan (streaking) pada medium Skirrow dan dieramkan secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 37°C. Terhadap koloni kuman yang dicurigai dilakukan identifikasi seperti yang telah disebutkan pada permulaan Bab IV tentang kuman subyek penelitian.

IV.3.4. Kelompok Kontrol

Untuk kontrol kelompok yang mendapat supernatan, digunakan medium cair CA-YE steril sebanyak yang diberikan kepada sekelompok tikus perlakuan dengan cara yang

sama. Kelompok kontrol ini dikorbankan dengan cara yang sama pula. Perbandingan antara berat usus (G) dan berat badan sisa (B-G) untuk kelompok kontrol juga ditentukan. Sedangkan kontrol kelompok yang mendapat suspensi kuman adalah tikus yang hanya diberi air suling steril sebanyak yang diberikan kepada sekelompok tikus perlakuan dengan cara yang sama, serta dikorbankan dengan cara yang sama pula. Kemudian sebagian ususnya diambil dan diproses untuk dilihat dengan mikroskop elektron.

IV.4. Pemeriksaan Mikroskop Elektron Transmisi (Menurut Standard UPT Mikroskop Elektron Universitas Air-langga)

IV.4.1. Penyediaan Bahan Untuk Pemeriksaan Mikroskop Elektron Transmisi :

- Jaringan segar difiksasi dengan larutan glutaraldehid 2 % dalam bufer fosfat 0,1 M selama 3-4 jam pada suhu 4°C.
- Jaringan dicuci dengan larutan bufer fosfat 2-3 kali masing-masing selama 5 menit pada suhu 4°C.
- Lalu dilakukan post-fiksasi dengan larutan osmium tetrooksida 1 % dalam bufer fosfat selama 2 jam.
- Dicuci dengan larutan bufer fosfat 2-3 kali masing-masing selama 5 menit.
- Kemudian dehidrasi alkohol dilakukan dengan kepekatan

yang meningkat pada suhu kamar:

30 % selama 10 menit

50 % selama 10 menit

70 % selama 10 menit

100% sebanyak 2 kali masing-masing selama 60 menit

- Jaringan yang terbentuk dimasukkan ke dalam propilen oksida 2 kali masing-masing selama 10 menit pada suhu kamar.
- Lalu dimasukkan ke dalam campuran propilen oksida-epon dengan perbandingan 1:1 selama 16 jam sampai semalam.
- Kemudian dimasukkan ke dalam campuran epon murni selama 6 jam. Pada saat jam ke-4, dimasukkan ke exicator untuk mengeluarkan gelembung-gelembung udara dan sisa propilen oksida.
- Jaringan dimasukkan ke dalam cetakan plastik dan campuran epon dituangkan perlahan-lahan.
- Polimerisasi dilakukan dalam inkubator dengan pemanasan bertahap;
 - 35°C selama 12 jam sampai semalam.
 - 45°C selama 12 jam sampai semalam.
 - 63°C selama 12 jam sampai semalam.
- Jaringan dalam blok epon siap dipotong dengan ultra mikrotom.

IV. 4.2. Pemotongan Jaringan Dalam Blok Epon

- Untuk mengetahui lokasi mana yang akan diamati dengan

mikroskop elektron, pemotongan pertama dilakukan dengan ketebalan 1 mikron, diwarnai dengan Toluidin Blue dan dilihat dengan mikroskop cahaya. Sebagian potongan-potongan ini diwarnai dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) dan Periodic Acid Schiff (PAS) dan dilihat dengan mikroskop cahaya untuk melihat dengan jelas reaksi jaringan yang ada dan memperjelas lokasi sasaran yang akan diamati dengan mikroskop elektron transmisi.

- Bila lokasi yang akan diamati dengan mikroskop elektron sudah ditemukan, blok epon dikecilkan lagi (trimming) sehingga berukuran kurang lebih 0,25 X 0,25 mm .
- Pemotongan untuk sediaan mikroskop elektron transmisi dilakukan sampai terlihat warna gray silver.
- Potongan/sediaan dilekatkan pada grid tembaga.

IV.4.3. Pewarnaan Sediaan Mikroskop Elektron Transmisi

- Grid tembaga yang telah berisi sediaan dimasukkan ke dalam larutan Uranyl acetat 10% selama 2 menit.
- Cuci dengan methanol beberapa kali.
- Keringkan dengan kertas penghisap.
- Kemudian diletakkan pada larutan Reynauld selama 2 menit.
- Cuci dengan air suling beberapa kali.
- Keringkan dengan kertas penghisap.
- Kemudian grid diletakkan pada kertas penghisap di dalam lempeng gelas.

- Grid siap untuk dilihat di bawah mikroskop elektron transmisi.

IV.5. Pewarnaan Histopatologi

IV.5.1. Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) :(17)

- Tetesi sediaan dengan larutan 2,5% p-periodic acid selama 5 menit sambil dipanasi pada suhu 55°C
- Dibilas dengan air mengalir selama 5 menit dan keringkan di udara
- Diwarnai dengan larutan Hematoksilin (Harris) selama 5 menit sambil dipanasi pada suhu 55°C
- Dibilas dengan air mengalir selama 5 menit dan keringkan di udara
- Tetesi dengan 0,25% alkohol asam selama 1 menit sampai 5 menit
- Dibilas dengan air mengalir selama 5 menit dan keringkan di udara
- Diwarnai dengan larutan Eosin 1% dalam alkohol selama 60 detik sambil dipanasi pada suhu 55°C
- Dibilas dengan air mengalir selama 5 menit dan keringkan di udara
- Dijernihkan dengan aseton selama 15-30 menit
- Ditutup gelas penutup dengan memakai Entelan

IV.5.2. Pewarnaan Periodic Acid Schiff (PAS) (Mc Manus) :(52)

- Tetesi sediaan dengan larutan Periodic Acid selama 5 menit
- dibilas beberapa kali dengan air suling
- Diwarnai dengan larutan Schiff selama 15 menit
- dibilas dengan air mengalir selama 10 menit
- Diwarnai larutan Hematoksilin (Harris) selama 6 menit
- Dibilas dengan air mengalir
- Diberi alkohol asam 1% sebanyak 3-10 kali celupan cepat
- Dibilas dengan air mengalir
- Celupkan dalam larutan amoniak
- Dibilas dengan air mengalir selama 10 menit
- Ditutup gelas penutup dengan memakai Entelan

IV.6. Pemeriksaan Uji Kepekaan Antibiotika Secara In Vitro Cara Difusi (27)

Pemeriksaan uji kepekaan antibiotika ini dilakukan mengingat adanya kemungkinan kuman subyek penelitian mengadakan invasi ke dalam jaringan usus dan adanya kemungkinan variasi pola kepekaan kuman ini terhadap antibiotika.

Uji kepekaan antibiotika secara in vitro cara difusi ini dilakukan sebagai berikut :

- Kuman subyek penelitian ditanam pada 5 ml medium cair Mueller Hinton dan dieramkan secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 37°C. Biakan cair yang

diperoleh dibuat homogen dengan bantuan Vortex Mixture lalu disamakan kekeruhannya dengan standard Mc. Farland 0,5 yaitu setara dengan $1,5 \times 10^8$ kuman tiap ml suspensi.

- Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam biakan cair yang telah dibuat sama kekeruhannya dengan standard Mc. Farland 0,5, diperas di dinding bagian dalam tabung biakan lalu diusapkan pada seluruh permukaan medium agar Mueller Hinton.
- Biarkan pada suhu kamar selama 5 menit, kemudian cakram antibiotika yang akan diperiksa ditempelkan pada permukaan agar dan ditekan sedikit. Bila digunakan lebih dari satu cakram antibiotika pada satu lempeng medium agar, jarak minimal antara tepi-tepi 2 cakram antibiotika adalah 24 mm sedangkan jarak minimal antara tepi cakram antibiotika dengan tepi lempeng gelas adalah 15 mm.
- Lempeng agar Mueller Hinton dieramkan secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 37°C dengan posisi terbalik.
- Kuman subyek penelitian dikatakan peka terhadap antibiotika yang dipakai bila didapatkan daerah hambatan :
 - 17 mm atau lebih untuk klindamisin (2 ug)
 - 19 mm atau lebih untuk tetrasiklin (30 ug)
 - 18 mm atau lebih untuk kloramfenikol (30 ug)

- Untuk kontrol uji kepekaan antibiotika ini digunakan *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) yang dikerjakan dengan cara yang sama.

BAB V

HASIL

V.1. Penghitungan Konsentrasi Sel Kuman Dengan Cara Tetes
Biakan cair hasil pengeraman 2 koloni kuman *Campylobacter fetus* subspecies jejuni pada medium cair caseamino acid-yeast extract secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 37°C, rata-rata mengandung kuman sebanyak $27,76 \times 10^7$ tiap ml nya (Tabel 1). Konsentrasi ini cukup untuk diberikan kepada hewan percobaan.

V.2. Pemusingan

Pemusingan dengan kekuatan sebesar 2000 X gravitasi selama 20 menit terhadap biakan cair *Campylobacter fetus* subspecies jejuni, ternyata tidak berpengaruh terhadap jumlah kuman ($P > 0,01$) (Tabel 2) (77).

Pewarnaan Gram terhadap sediaan yang diambil dari biakan cair sebelum dan sesudah pemusingan, menunjukkan morfologi mikroskopi dan sifat pewarnaan yang sama.

Penanaman supernatan secara streaking pada lempeng agar Mueller Hinton secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 37°C, tidak satupun menunjukkan adanya pertumbuhan kuman ini.

Dengan demikian diketahui bahwa pemusingan dengan

kekuatan sebesar 2000 X gravitasi selama 20 menit, tidak berpengaruh terhadap daya hidup (viabilitas) kuman dan sekaligus dapat memisahkan bagian sel kuman dari bagian cairnya.

V.3. Biakan Isi Usus Hewan Percobaan Sebelum Perlakuan

Pembiakan isi usus yang berasal dari 2 ekor tikus Wistar jantan pada medium Skirrow secara mikroaerofilik selama 2 X 24 jam pada suhu 37°C, menghasilkan adanya pertumbuhan kuman batang gram negatif. Tidak satupun menunjukkan adanya pertumbuhan *Campylobacter fetus* sub-species jejuni.

V.4. Pengujian Terhadap Adanya Toksin Tahan Panas

Hasil pengamatan dari saat sesudah perlakuan sampai menjelang dilakukannya otopsi, tidak menunjukkan adanya tanda-tanda diare pada semua hewan percobaan yang diamati. Dan pemeriksaan makroskopi terhadap usus-usus hewan percobaan kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan, tidak menunjukkan adanya perbedaan. Sekresi cairan usus yang berlebihan juga tidak ditemukan pada hewan percobaan kelompok perlakuan.

Perhitungan perbandingan antara berat usus (G) dan berat badan sisa (B-G) masing-masing hewan percobaan dari kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan, ternyata

tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($P > 0,01$) (Tabel 3a dan 3b) (2,14).

V.5. Pengujian Terhadap Adanya Invasi

Pengamatan dari saat sesudah perlakuan sampai menjelang dilakukannya otopsi, tidak menunjukkan adanya tanda-tanda diare pada semua hewan percobaan yang diamati. Walaupun demikian, pola penurunan berat badan selama waktu pengamatan tersebut menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ($P < 0,01$) (Tabel 4a dan 4b) (2,14,46).

V.5.1. Kelompok Kontrol

Pemeriksaan makroskopi terhadap usus halus, lambung, caecum dan usus besar hewan percobaan kelompok kontrol, tidak menunjukkan adanya kelainan.

Pemeriksaan histopatologi sediaan usus halus hewan percobaan kelompok ini tidak mendapatkan adanya kelainan.

Pemeriksaan mikroskop elektron transmisi sediaan jaringan yang berasal dari usus halus, juga tidak menemukan adanya kuman subyek penelitian.

V.5.2. Kelompok Perlakuan

Pemeriksaan makroskopi terhadap usus halus, lambung, caecum dan usus besar hewan percobaan kelompok perlakuan, jelas menunjukkan adanya kelainan.

Tikus yang diotopsi pada hari ke-1 sesudah perlakuan,

menunjukkan adanya pembengkakan lokal di usus halusnya di mana garis tengah pembengkakan lokal itu berukuran 2-3 mm dan dijumpai pada beberapa tempat.

Kelainan serupa juga dijumpai pada tikus yang diotopsi pada hari ke-2 sesudah perlakuan. Pembengkakan lokal di usus halus ditemukan pada beberapa tempat dan masing-masing mempunyai garis tengah yang lebih besar yaitu 5-6 mm.

Kelainan yang lebih berat dijumpai pada tikus yang diotopsi pada hari ke-3 sesudah perlakuan. Pada beberapa tempat di usus halus terdapat banyak cairan di dalam lumen usus halus sehingga usus halus tersebut tampak 4 X lebih besar dari semula. Dinding ususnya tampak lebih tipis. Juga ditemukan adanya kelainan di usus besar serupa dengan yang terjadi di usus halus yaitu berupa pembengkakan lokal.

Tikus yang diotopsi pada hari ke-4 sesudah perlakuan menunjukkan kelainan yang lebih luas. Dijumpai banyak cairan di dalam lumen lambung dan caecum sehingga lambung tampak 3 X lebih besar dari semula dan caecum tampak 2 X lebih besar dari semula, sedangkan di dalam lumen usus halus dijumpai cairan yang lebih banyak lagi sehingga usus halus tampak 8 X lebih besar dari semula. Cairan yang berlebihan ini meliputi seluruh panjang usus halus. di dalam lumen usus besar juga ditemukan adanya cairan

yang bersifat lokal.

Tikus yang ke-5 ternyata sudah mati saat akan dilakukan otopsi. Sesudah diotopsi, lambung, usus halus, caecum dan usus besar tidak berisi cairan lagi dan tampak nekrosis.

Pembiakan isi usus hewan percobaan yang mendapat suspensi kuman subyek penelitian memberikan pertumbuhan kuman *Campylobacter fetus subspecies jejuni* dan kuman ini berhasil diisolasi kembali dari semua hewan percobaan yang mendapat suspensi kuman tersebut.

Pemeriksaan histopatologi sediaan usus halus hewan percobaan kelompok perlakuan yang mendapat suspensi kuman subyek penelitian menemukan adanya mukosa usus yang dilapisi sel-sel silindris yang mengadakan proliferasi. Beberapa sel epitel usus lepas ke arah lumen usus. Lamina propria sembab dan ditemukan juga sel-sel radang akut (polimorfonuklear). Pada proses radang yang lebih lanjut, villi usus menjadi tidak sejajar dan memendek dengan lamina propria yang sembab. Sel-sel goblet tampak lebih banyak. Pada beberapa tempat tampak sel-sel epitel mengalami nekrosis dan lepas ke arah lumen usus. Pembuluh darah kapiler melebar dan berisi sel-sel darah merah, dan pada lamina propria yang sembab banyak ditemukan kelompok-kelompok sel-sel radang akut (polimorfonuklear).

Pemeriksaan mikroskop elektron transmisi sediaan jaringan yang berasal dari usus halus yang menunjukkan

kelainan, menemukan adanya kuman *Campylobacter fetus* subspecies jejuni pada semua sediaan yang diperiksa. Kuman tampak terpotong melintang, miring ataupun membujur (gambar 2-5).

Pada pemeriksaan mikroskop elektron transmisi tersebut juga ditemukan sel-sel darah putih polimorfonuklear yang pada sediaan kelompok perlakuan lebih banyak daripada kelompok kontrol. Sel-sel darah putih tersebut sebagian menembus dinding usus menuju ke dalam lumen usus (gambar 6).

V.6. Pemeriksaan Uji Kepekaan Antibiotika Secara In Vitro Cara difusi

Dari hasil uji kepekaan antibiotika secara in vitro cara difusi yang dilakukan pada penelitian ini, antibiotika Kloramfenikol, Tetrasiklin, Klindamisin menunjukkan efektifitas yang baik.

BAB VI

DISKUSI

Sebagai bahan pemeriksaan laboratorium untuk gastroenteritis dapat berupa tinja ataupun usapan rektum penderita (13,38). Kaplan dkk. (38) menemukan bahwa usapan rektum lebih unggul secara statistik ($P=0,016$) daripada tinja untuk menemukan *Campylobacter fetus subspecies jejuni*.

Sebagai medium transport, medium Amies tidak mengandung gliserofosfat sehingga diharapkan dapat mengurangi pertumbuhan *Escherichia coli* yang dapat menggunakan gliserofosfat sebagai sumber energi (64).

Pemeriksaan yang dilakukan pada hari yang sama dengan saat pengambilannya, memberikan angka isolasi yang lebih besar daripada bila pemeriksaan dilakukan sesudah lebih dari 24 jam (37).

Sebagai medium selektif untuk isolasi *Campylobacter fetus subspecies jejuni*, medium Skirrow dan medium Butzler sebanding satu sama lain (66) dan untuk isolasi kuman ini dari penderita, medium Skirrow adalah efektif (11).

Untuk pertumbuhannya, *Campylobacter fetus subspecies jejuni* memerlukan suasana mikroaerofilik di mana kadar

oksigen berkisar antara 3-15% dan kadar karbon dioksida berkisar 8% (12,42).

Berbagai cara telah dicoba untuk membuat suasana mikroaerofilik tersebut yaitu :

- a. Menggunakan campuran oksigen, karbon dioksida dan nitrogen masing-masing dengan kadar tertentu yang dimasukkan ke dalam sungkup anaerob dengan evacuation replacement/refilling system. Cara ini disebut cara Standard (50,78).
- b. Menggunakan gas generating kit yang diletakkan di dalam sungkup anaerob tanpa katalis (13,88).
- c. Menggunakan kuman fakultatif anaerob bersama dengan biakan *Campylobacter fetus subspecies jejuni* dalam satu kantong polythene yang ditutup rapat. Cara ini dikenal dengan prinsip Fortner (42).
- d. Menggunakan candle jar (50,88).

Walaupun candle jar dapat digunakan untuk isolasi primer kuman ini, tetapi angka isolasinya lebih rendah daripada bila digunakan cara Standard; dan perbedaan ini bermakna secara statistik ($P < 0,02$) (50). Sedangkan penggunaan gas generating kit dan cara Standard tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna secara statistik (13).

Walaupun inkubasi dapat dilakukan selama 24 jam sampai 72 jam, namun inkubasi selama 48 jam menghasilkan koloni kuman yang mudah dilihat dan dikenali (70) sedang-

kan sesudah inkubasi selama 72 jam, kuman akan mengalami perubahan bentuk dan daya hidupnya hilang (70,80).

Walaupun kuman ini dapat diisolasi dengan menggunakan suhu 37°C ataupun 42°C (50,65) namun inkubasi pada suhu 42°C memberikan hasil isolasi primer yang lebih banyak dibandingkan dengan inkubasi pada suhu 37°C (50); dan pada penelitiannya Janssen dan Helstad (37) menemukan bahwa bila isolasi kuman ini dilakukan terhadap bahan pemeriksaan berasal dari penderita, inkubasi pada suhu 42°C memberikan angka isolasi yang lebih banyak, jumlah koloni yang lebih banyak dan isolasi yang lebih cepat daripada bila inkubasi dilakukan pada suhu 35°C; perbedaan ini bermakna secara statistik ($P < 0,001$). Di samping itu suhu 42°C akan menghambat pertumbuhan *Campylobacter fetus subspecies fetus* (16,70) yang jarang ditemukan di dalam usus manusia dan bukan penyebab enteritis pada manusia (16).

Medium Casamino Acid-Yeast Extract (CA-YE) digunakan oleh Gianella (29) untuk menghasilkan toksin tahan panas *Escherichia coli*. Pembentukan toksin ini optimal bila pembiakan kuman dilakukan sambil diputar (rolling), sedangkan pembiakan kuman sambil dikocok (shaking) ataupun secara diam (stationary) menghasilkan pembentukan toksin yang suboptimal untuk beberapa strain *Escherichia coli* yang diteliti. Gianella (29) juga menemukan bahwa pembed-

tukan toksin tahan panas *Escherichia coli* yang memadai pada medium CA-YE adalah 16-24 jam. Mehlman dan Romero (57) menemukan bahwa *Campylobacter fetus* subspecies jejuni tidak dapat tumbuh pada Casamino Acid saja atau Yeast Extract saja tetapi tumbuh pada CA-YE di mana kadar Casamino Acid adalah 1,75% dan kadar Yeast Extract adalah 0,5%. Pertumbuhan pada medium CA-YE tersebut adalah yang terbaik apabila dibandingkan dengan pertumbuhan pada Brucella broth, Mueller Hinton broth, 0,3% beef extract yang ditambah 1,75% Casamino Acid, ataupun Mueller Hinton broth yang ditambah 0,5% yeast extract dan 0,15% agar murni. Yeast Extract merupakan sumber vitamin B kompleks yang sempurna sehingga merupakan stimulator sempurna untuk pertumbuhan kuman (21).

Secara umum, Reed dan Reed (69) menemukan hasil penghitungan yang lebih banyak 7% dengan cara tetes untuk biakan murni kuman aerob pada medium cair dibandingkan dengan hasil penghitungan dengan cara tuang; sedangkan untuk *Clostridium*, cara tetes memberikan hasil penghitungan yang selalu lebih rendah dibandingkan dengan cara tuang. Pomales-Lebron dan Fernandez (68) menemukan bahwa penghitungan biakan murni *Escherichia coli* pada medium cair Tryptosa dengan cara tetes tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan cara tuang. Pada pemeriksaan air susu yang dipasteurisasi, Mallmann dan Broitman (53)

menemukan bahwa perbandingan hasil penghitungan rata-rata dengan cara tetes dan cara tuang adalah 1:1,005. Pada cara tuang, medium agar yang akan dipakai haruslah dalam keadaan cair dengan suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ (25,33). Dengan suhu itu, Clark (18) menyebutkan bahwa strain-strain kuman yang peka terhadap suhu tersebut dapat mati sehingga mengurangi jumlah kuman yang ditemukan. Pada cara sebaran ada kemungkinan kuman melekat pada alat spreadernya sehingga akan sangat mempengaruhi jumlah koloni yang tumbuh bila bahan pemeriksaan semula relatif sedikit kandungannya (62). Pada penelitian Hoben dan Somasegaran (36) ditemukan bahwa cara tuang, cara sebaran dan cara tetes ternyata sebanding satu sama lain untuk menghitung jumlah *Rhizobium* spp. dalam bahan pemeriksaan yang berasal dari lumut yang belum disterilkan (presterilized peat); namun demikian, cara tetes lebih disukai karena hemat dalam bahan medium dan pekerjaan. Di samping itu penulis juga menemukan bahwa cara tetes mempunyai keuntungan lain yaitu : tidak ada pengaruh suhu panas media agar yang dipakai, dapat digunakan untuk media agar transparan maupun tidak, dan adanya infeksi campuran masih dapat diketahui seperti halnya dengan cara tuang dan cara sebaran (91).

King, Stiles dan Taypor (44) menemukan bahwa penambahan FBP (0,05% Ferrous Sulphate hydrate, 0,05% Sodium

Metabisulphite, 0,05 Sodium Pyruvate) atau 7% darah domba yang telah dihilangkan fibrinogennya (defibrinated sheep blood) pada Brucella agar, Campylobacter agar base atau Mueller Hinton agar, tidak secara nyata mempengaruhi jumlah Campylobacter dari biakan murni. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian supplement pada media tersebut tidak diperlukan untuk menumbuhkan Campylobacter dari biakan murni. Di samping itu, adanya starch dalam medium agar Mueller Hinton menjamin terjadinya absorpsi bahan-bahan toksik yang terbentuk selama pertumbuhan kuman berlangsung (64). Di samping tidak mempengaruhi pertumbuhan Campylobacter dari biakan murni dan jaminan terjadinya absorpsi bahan-bahan toksik, Mueller Hinton agar digunakan untuk melakukan uji kepekaan antibiotika (27). Dengan demikian menghemat jenis/macam media yang dipakai.

Larutan garam fisiologis tidak digunakan sebagai pencuci seperti lazimnya untuk kuman-kuman lain karena kadar NaCl yang terbaik ditoleransi oleh kuman subyek penelitian adalah 0,5% sedangkan kadar NaCl dalam larutan garam fisiologis adalah 0,85%. Di samping itu, pada keadaan di mana tidak ada NaCl, fase lag kuman ini bertambah panjang sehingga selama pencucian, kuman ini tetap jumlahnya (22).

Dari penelitian Blaser dkk. (7) diketahui bahwa dengan pembiakan suspensi tinja maupun isi usus, Campylo-

bacter fetus subspecies jejuni bukan merupakan commensal saluran cerna mencit dewasa HA-ICR. Hasil penelitian Field dkk. (26) menunjukkan bahwa dengan mikroskop elektron scanning diketahui bahwa *Campylobacter fetus subspecies jejuni* bukan merupakan flora normal saluran cerna bayi mencit Crl:CFW(SW)BR. Seperti yang dapat dilihat pada hasil penelitian ini, kuman ini juga tidak ditemukan dari usus tikus dewasa Wistar.

Blaser dkk. (7) juga menemukan bahwa terjadinya infeksi pada mencit dewasa HA-ICR tergantung pada banyaknya kuman yang diberikan. Tiga strain kuman, masing-masing sebanyak 10^7 , secara intragastrik menyebabkan terjadinya infeksi sebesar 100%. Strain-strain kuman yang baru diisolasi maupun yang telah mengalami pemindahan ulang pada media artificial menghasilkan angka infeksi yang serupa. Dengan mikroskop sinar diketahui bahwa perubahan histopatologi mukosa usus yang terjadi menyerupai dengan yang ditemukan pada manusia dan terutama mengenai usus kecil.

Dari hasil penelitian Field dkk. (26) diketahui bahwa perkembang-biakan *Campylobacter fetus subspecies jejuni* pada bayi mencit, tikus dan kelinci menunjukkan banyak persamaan, namun sayang tidak satupun hewan percobaan itu menunjukkan gejala penyakit yang jelas. Dari penelitian itu juga didapatkan bahwa tinja yang lunak, banyak, berulang kali dikeluarkan dan beberapa mengandung

lendir dan darah, dijumpai pada mencit dewasa dan tidak dijumpai pada bayi mencit. Blaser dkk. (7) juga menemukan bahwa mencit dewasa HA-ICR yang diinfeksi dengan kuman ini tidak menunjukkan gejala penyakit dan tidak dijumpai adanya kematian tetapi menjadi ekskretor asimtomatis yang kronis. Respon usus terhadap toksin cholera ditunjukkan oleh tikus dewasa dan tidak dijumpai pada bayi tikus (3).

Pada penelitian ini digunakan hewan percobaan tikus oleh karena tikus adalah hewan mamalia yang kehidupannya dekat dengan manusia sehingga jenis makanannya serupa dengan manusia. Selain daripada itu, *Campylobacter fetus* subspecies jejuni dapat mengadakan perkembangbiakan di dalam usus bayi tikus walaupun tanpa disertai adanya gejala penyakit yang jelas (26). Karena strain Wistar dapat diperoleh secara tetap dalam keadaan inbred dan karena hasil penelitian Fernandez dkk. (25) menunjukkan bahwa segmen jejunum yang diligasi tikus jantan dewasa strain Wistar ini memberikan respon sekresi terhadap supernatan biakan kuman ini maka dipilihlah tikus Wistar jantan dewasa sebagai hewan percobaan pada penelitian ini.

Jumlah hewan percobaan yang dipakai pada penelitian eksperimental ini disesuaikan dengan lama pengamatan yang dilakukan. Pada pengujian untuk mengetahui adanya proses

toksin tahan panas, lama pengamatan yang optimum adalah 1-4 jam (3,29). Oleh karena perlakuan dilakukan secara berpasangan (duplo) maka diperlukan sebanyak 8 hewan percobaan. Sedangkan pada pengujian untuk mengetahui adanya proses invasi, regenerasi sel-sel epitel usus terjadi setiap kurang dari 5 hari (20,82). Oleh karena itu diperlukan sebanyak 5 hewan percobaan. Untuk kelompok kontrol diperlukan hewan percobaan sebanyak kelompok perlakuan.

Percobaan diare oleh *Vibrio cholerae* dan *Escherichia coli* pada hewan percobaan menunjukkan bahwa usus kecil merupakan sumber hilangnya cairan dan elektrolit. Walaupun usus besar tidak terlibat langsung pada proses hilangnya cairan namun kemampuan reabsorpsinya dapat mengurangi hilangnya cairan pada saat terjadinya diare (3,71).

Woodard (93) menyebutkan bahwa volume yang diberikan secara enteral pada hewan percobaan hendaknya cukup banyak agar pengukurannya tepat dan cukup sedikit agar tidak berlebihan. Untuk hewan percobaan kecil seperti mencit, tikus dan kelinci, volume yang paling aman adalah antara 1 dan 10 ml tiap kg berat badan. Disebutkan juga bahwa bahan pelarut atau pembawa yang terbaik adalah air. Larutan atau suspensi yang akan digunakan hendaknya disiapkan sedekat mungkin dengan waktu perlakuan/percobaan dan pH yang baik adalah antara 4,5 dan 8.

Pemilihan cara pemberian suspensi kuman subyek penelitian pada hewan percobaan memperhatikan faktor kemudahan pemberian dari pihak yang melakukan dan faktor kenyamanan hewan percobaan yang dipakai di samping infeksi yang terjadi secara alami. Pemberian melalui mulut adalah cara yang paling aman tetapi perlu memperhatikan kebiasaan makan hewan percobaan yang dipakai. Namun cara ini mempunyai kelemahan yaitu kemungkinan terjadinya dosis yang kurang tepat. Oleh karena ketepatan dosis dan waktu sangat diperlukan pada penelitian ini maka pemberian yang paling tepat adalah pemberian secara intragastrik (93). Pemberian secara intragastrik ini dilakukan dengan menggunakan ball tipped blunted needle sepanjang 7 cm (93). Ukuran ini dipilih karena dari tikus-tikus yang dikorbankan pada penelitian sebelumnya, diketahui bahwa jarak mulut sampai dengan lambung adalah 7 cm.

Untuk mengetahui proses adanya toksin dilakukan dalam satuan jam karena toksin mempunyai awal kerja (onset of action) yang cepat yaitu 10-15 menit (3) dan waktu optimum yang diperlukan untuk mengetahui respon terhadap adanya toksin adalah 1-4 jam (3,29). Sedangkan untuk mengetahui adanya invasi dilakukan dalam satuan hari karena invasi kuman akan terjadi bila proses regenerasi sel epitel usus sudah tidak mampu lagi mengganti sel-sel epitel usus yang rusak. Regenerasi sel-sel epitel usus

terjadi setiap kurang dari 5 hari (20,82).

Untuk blok epon tidak semua zat warna yang biasa dipakai di bidang histologi, patologi maupun mikrobiologi, dapat digunakan untuk mewarnai jaringan dan atau kuman yang akan diperiksa. Toluidin biru dan PAS adalah zat-zat warna yang dapat digunakan untuk mewarnai jaringan dalam blok epon (67). Untuk itulah maka pewarnaan toluidin biru digunakan untuk melokalisasi sasaran yang akan diperiksa dengan mikroskop elektron (67); dan pewarnaan PAS dan HE, di samping digunakan untuk memperjelas sasaran yang akan diperiksa, dimaksudkan pula untuk melihat reaksi jaringan yang terjadi (17). Ini dimungkinkan karena epon menjamin keutuhan susunan jaringan sehingga bila diwarnai menghasilkan kejelasan, ketegasan dan kesinambungan/keutuhan yang unggul (17). Oleh karena zat-zat warna di bidang mikrobiologi tidak dapat digunakan untuk mewarnai kuman dalam jaringan dalam blok epon walaupun sudah dibantu dengan pemanasan, maka lokalisasi sasaran ditentukan secara tidak langsung dengan melihat reaksi jaringan yang terjadi pada pemeriksaan dengan pewarnaan PAS dan HE. Penentuan lokalisasi sasaran secara tidak langsung ini juga didasarkan hasil penelitian Blaser dkk. (8) di mana pada semua sediaan histopatologi yang diwarnai HE, tidak satupun dapat dilihat adanya kuman subyek penelitian di antara reaksi radang akut yang tampak.

Untuk pewarnaan HE sediaan jaringan dalam blok epon dipilih larutan hematoksilin Harris karena larutan ini menghasilkan diferensiasi komponen jaringan secara menyeluruh dan terinci (17); hanya saja untuk membantu masuknya zat warna yang digunakan, perlu pemberian larutan periodic acid terlebih dahulu dan pemanasan (17).

Pemeriksaan jaringan usus yang menunjukkan kelainan makroskopis dalam blok parafin tidak dilakukan oleh karena pemeriksaan histopatologi dengan menggunakan mikroskop cahaya belum dapat menunjukkan adanya kuman subyek penelitian di antara semua jaringan usus yang diperiksa dengan pewarnaan HE (8). Lagipula, andaikata pemeriksaan histopatologi dengan mikroskop cahaya dapat menunjukkan adanya kuman subyek penelitian di antara jaringan usus yang diperiksa, masih ada kekawatiran bahwa kuman yang ditemukan tersebut juga dapat ditemukan pada pemeriksaan dengan mikroskop elektron. Hal ini disebabkan oleh karena untuk pembuatan blok epon diperlukan volume jaringan sebesar 1 mm^3 (17,67,73).

Pemeriksaan struktur ultra kuman subyek kuman penelitian dengan menggunakan mikroskop elektron tidak dilakukan oleh karena pemeriksaan ini tidak diperlukan untuk diagnosa kuman ini secara mikrobiologi. Diagnosa mikrobiologi berdasar morfologi koloni kuman, morfologi sel kuman di bawah mikroskop cahaya, sifat pewarnaan Gram,

uji oksidase, sifat-sifat pertumbuhan, reaksi-reaksi biokimia, pergerakan kuman dan kepekaannya terhadap asam nalidiksat sudah cukup (27,40,51,94). Di antara hal-hal yang dipakai sebagai dasar diagnosa mikrobiologi tersebut, morfologi sel kuman subyek penelitian di bawah mikroskop cahaya sajalah yang dapat dipakai lagi untuk pegangan membuat diagnosa pada waktu melakukan pemeriksaan mikroskop elektron, di samping diagnosa secara mikrobiologi. Morfologi sel kuman yang dimaksud adalah menyangkut ukuran dan bentuk sel kuman. Di samping pemeriksaan struktur ultra kuman subyek penelitian tidak diperlukan untuk membuat diagnosa kuman ini, pembuatan blok epon gumpalan (pellet) kuman memerlukan cara-cara khusus tersendiri (67,73).

Dalam usaha menemukan patogenesa penyakit *Campylobacter* pada manusia, Guerrant dkk. (34) gagal menunjukkan adanya toksin peka panas, toksin tahan panas, toksin yang bersifat sitotoksik maupun adanya invasi. Butzler dan Skirrow (16) juga gagal menunjukkan adanya toksin peka panas pada perbenihan sel (tissue culture) sedangkan toksin tahan panas ditemukan hanya pada beberapa strain saja yaitu pada 16 di antara 100 hewan percobaan (mencit putih Swiss yang berumur 3-4 hari) yang dipakai. Dengan menggunakan segmen jejunum tikus dewasa Wistar, Fernandez dkk. (25) berhasil menunjukkan adanya respon sekresi su-

pernatan biakan kuman ini; dan dengan menggunakan perbenihan sel dan metoda ELISA Klipstein dan Engert (45) menemukan adanya toksin peka panas. Namun dari penelitian ini juga diketahui bahwa strain-strain *Campylobacter fetus* subspecies jejuni bervariasi kemampuannya untuk menghasilkan toksin peka panas. Dengan menggunakan genetic probing, Olsvik dkk. (63) tidak menemukan adanya gene untuk memproduksi toksin peka panas.

Dari kelompok hewan percobaan yang mendapat supernatan biakan cair *Campylobacter fetus* subspecies jejuni, tidak ditemukan tanda-tanda diare dan tidak didapatkan sekresi cairan usus yang berlebihan. Perbandingan antara berat usus (G) dan berat badan sisa (B-G) hewan percobaan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan juga tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Dengan cara dan waktu yang dipakai pada penelitian ini tidak dapat ditunjukkan adanya toksin tahan panas kuman subyek penelitian.

Hewan percobaan yang mendapat supernatan ini tidak diperiksa dengan mikroskop elektron transmisi karena tidak dapat dibuktikan adanya toksin tahan panas.

Dalam usaha untuk mengetahui adanya kemampuan invasi oleh *Campylobacter fetus* subspecies jejuni, Butzler dan Skirrow (16) menemukan adanya kuman ini di dalam sel 24 jam sesudah pemberian 5 strain kuman masing-masing sebanyak 10^9 kuman tiap ml pada perbenihan sel embrio ayam

yang berumur 10 hari. Pemberian salah satu strain kuman itu sebanyak 10^9 pada ayam yang berumur 8 hari, 1 minggu kemudian menghasilkan adanya kuman dalam saluran cerna pada semua hewan percobaan yang dipakai dan 48% menunjukkan adanya bakteremia, walaupun tak satupun menunjukkan gejala penyakit. Dengan mikroskop elektron ditemukan adanya kuman di dalam dinding caecum pada semua hewan percobaan yang dipakai.

Ruiz Palacios, Escamilla dan Torres (75), dalam usaha menemukan hewan percobaan untuk *Campylobacter fetus* subspecies jejuni di mana diare secara konsisten dihasilkan dengan pemberian kuman secara peroral, menemukan bahwa diare terjadi pada 88% ayam berumur 3 hari yang diberi 9×10^7 kuman hidup secara peroral. Waktu rata-rata yang diperlukan untuk terjadinya diare adalah 45 jam. Namun perlu diketahui bahwa bangsa unggas mempunyai cloaca di mana kotoran dikeluarkan bercampur dengan air kencing sehingga adanya diare tidak dapat didasarkan pada konsistensi ataupun frekuensi kotorannya (76). Selain itu, kuman ini secara normal dapat ditemukan pada saluran cerna bangsa unggas (39).

Dengan menggunakan ayam yang berumur 3 hari, Sanyal dkk. (76) menjumpai terjadinya diare 2-5 hari sesudah pemberian 10^7 - 10^8 kuman hidup subyek penelitian secara peroral pada 25% dan 81% hewan percobaan yang dipakai.

Diare didasarkan pada penumpukan cairan di dalam usus. Pada penelitian itu juga didapatkan bahwa kuman mengadakan multiplikasi di semua bagian usus dan 11% menunjukkan adanya bakteremia 4 hari sesudah perlakuan.

Mengingat bakteremia pada anak ayam diketahui 4-7 hari sesudah inokulasi dengan *Campylobacter fetus* subspecies jejuni (16,76) dan pada penelitian ini invasi kuman subyek penelitian pada hewan percobaan yang dipakai belum tentu dapat dibuktikan maka pada penelitian ini belum dilakukan pembiakan darah.

Dari darah penderita yang diketahui terinfeksi oleh kuman subyek penelitian ditemukan adanya antibodi kelas immunoglobulin G yang bersifat homolog artinya spesifik untuk kuman yang menginfeksi penderita tersebut (4). Mengingat serotipe kuman sangat berlainan (56) oleh karena itu belum tersedia secara komersial sediaan antigen kuman ini yang dapat digunakan untuk melakukan uji serologis pada setiap penderita yang terinfeksi oleh kuman ini yang bermanfaat untuk membantu menegakkan diagnosa penyakit. Karenanya, pemeriksaan serologis rutin pada penderita gastroenteritis dengan dugaan karena kuman ini sampai saat ini masih dalam penelitian (6).

Dari kelompok hewan percobaan yang mendapat suspensi kuman *Campylobacter fetus* subspecies jejuni ditemukan adanya kelainan. Pembengkakan lokal pada usus halus sudah

ditemukan 1 hari sesudah pemberian kuman secara intragastrik. Sekresi cairan usus yang berlebihan pada hewan percobaan yang dipakai, mulai terlihat dengan jelas 3 hari sesudah pemberian kuman secara intragastrik dan hari berikutnya meluas ke lambung dan caecum. Sedangkan pembengkakan lokal pada usus besar serupa dengan yang terjadi pada usus halus baru ditemukan 3 hari sesudah pemberian kuman secara intragastrik. Sampai batas akhir pengamatan, cairan yang berlebihan di dalam lumen usus besar masih bersifat lokal.

Walaupun terjadi sekresi cairan usus yang berlebihan, namun selama pengamatan tidak ditemukan tanda-tanda diare. Kemungkinan disebabkan adanya reabsorpsi oleh usus besar yang rupanya masih dapat mengimbangi sekresi cairan usus yang terjadi. Selama waktu pengamatan pola penurunan berat badan hewan percobaan kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang bermakna ($P < 0,01$) dibandingkan dengan pola penurunan berat badan hewan percobaan kelompok kontrol. Bahkan hewan percobaan terakhir kelompok perlakuan mengalami penurunan berat badan yang hampir 2 X lebih besar daripada penurunan berat badan rata-rata hewan percobaan kelompok perlakuan. Dengan demikian kematian yang terjadi pada hewan percobaan terakhir kelompok perlakuan kemungkinan disebabkan oleh gangguan keseimbangan cairan dan elektrolit (15).

Derajat kemaknaan 0,01 digunakan pada penelitian eksperimental ini oleh karena penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental, sehingga diharapkan dapat terhindar dari kesalahan tipe I dan II (59).

Dari serangkaian pengamatan di bawah mikroskop elektron transmisi, dapat disebutkan tahapan masuknya kuman ke dalam jaringan usus. Kuman yang semula berada di dalam lumen usus merusak terlebih dahulu villi mikro sel epitel usus untuk seterusnya masuk ke dalam jaringan usus dan berada di dalam jaringan usus. Disayangkan memang, peristiwa masuknya kuman melalui dinding sel epitel usus belum ditemukan pada sediaan yang diperiksa. Mengingat kuman yang ditemukan ini tidak dijumpai pada sediaan yang berasal dari hewan percobaan kelompok kontrol dan juga secara mikrobiologik tidak ditemukan dari hewan percobaan sebelum perlakuan, maka pastilah bahwa kuman tersebut berasal dari suspensi kuman yang diberikan secara intragastrik.

Adanya sel-sel darah putih polimorfonuklear yang menembus dinding usus menuju ke dalam lumen usus sesuai dengan ditemukannya sel-sel darah putih polimorfonuklear pada pemeriksaan tinja penderita (4,16).

Oleh karena ukuran potongan tipis (thin section) adalah 60-90 nM (67) sedangkan ukuran kuman subyek penelitian adalah 0,2-0,5 mikron X 1,5-5 mikron atau 200-

500 nm X 1500-5000 nm maka jelaslah bahwa kuman subyek penelitian ini dapat terpotong menjadi beberapa bagian. Mengingat bentuk kuman ini dan arah potongannya maka dimungkinkan bentuk irisan kumannya berbeda-beda (20) seperti yang terlihat pada gambar 2-5.

Bila hasil pemeriksaan makroskopi dikaitkan dengan hasil pemeriksaan histopatologinya, jelas ditemui adanya proses radang akut. Dengan ditemukannya kuman subyek penelitian di daerah usus halus yang mengalami proses radang akut ini pada pemeriksaan di bawah mikroskop elektron transmisi, maka jelas bahwa proses radang akut ini timbul sebagai akibat invasi kuman subyek penelitian ke dalam mukosa usus.

Hasil pemeriksaan histopatologi pada penelitian ini sama dengan yang ditemukan pada mencit yaitu berupa reaksi radang akut (7). Mengingat kelainan histopatologi pada mencit oleh karena *Campylobacter fetus* subspecies jejuni serupa dengan yang ditemukan pada penderita yang diinfeksi oleh kuman ini (8), maka sangat mungkin bahwa kelainan histopatologi pada penelitian ini juga ditemukan pada penderita.

Walaupun kelompok hewan percobaan yang mendapat supernatan dan kelompok hewan percobaan yang mendapat suspensi kuman, masing-masing tidak menunjukkan adanya tanda-tanda diare, namun dari kelompok hewan percobaan

yang mendapat suspensi kuman ditemukan adanya sekresi cairan yang berlebihan di usus halus, lambung dan caecum. Kuman juga dapat ditemukan kembali dari masing-masing anggota kelompok ini disertai adanya proses radang akut. Bahkan dari kelompok ini pula dijumpai adanya kematian.

Untuk uji kepekaan antibiotika secara *in vitro* dipilih cara difusi oleh karena cara ini mudah, cepat, hemat, dapat diulang kembali dengan hasil sama (*reproducible*), dan digunakan medium Mueller Hinton oleh karena medium ini seragam dalam hal kemasannya (*good batch to batch uniformity*) (27).

Agar manfaat pengobatan dapat dirasakan oleh seluruh penderita, maka dipilihlah obat-obat antibiotika yang mudah diberikan melalui mulut, kadarnya dalam jaringan tinggi dan akibat samping yang rendah yaitu klindamisin, tetrasiklin, kloramfenikol (9). Golongan penisilin ataupun sefalosporin tidak ikut dipilih karena kuman subyek penelitian ini membentuk enzim laktamase beta (9).

BAB VII

KESIMPULAN

Dengan bahan dan cara seperti yang dilakukan pada penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa gastroenteritis karena *Campylobacter fetus* subspecies jejuni disebabkan oleh adanya proses invasi kuman ke dalam mukosa usus. Kuman merusak villi mikro sel epitel usus untuk seterusnya masuk ke dalam sel epitel usus dan menimbulkan rekasi radang akut di sekelilingnya.

Dijumpai sel-sel darah putih polimorfonuklear menembus dinding usus menuju ke dalam lumen usus.

Sekresi cairan yang berlebihan terjadi secara maksimum di lambung, usus halus, dan caecum 4 hari sesudah infeksi. Terjadinya sekresi cairan yang berlebihan ini bukan disebabkan oleh proses adanya toksin tahan panas.

BAB VIII

RINGKASAN

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah gastroenteritis karena *Campylobacter fetus* subspecies jejuni disebabkan oleh proses toksin atautkah disebabkan oleh proses invasi ke dalam mukosa usus.

Campylobacter fetus subspecies jejuni diisolasi dari penderita anak di bawah 2 tahun dengan diare yang berobat jalan ke poliklinik anak RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Identifikasi kuman didasarkan pada morfologi koloni, pemeriksaan di bawah mikroskop cahaya, uji oksidase, sifat-sifat pertumbuhan, reaksi biokimia, pergerakan dan kepekaan terhadap asam nalidiksat.

Satu kelompok tikus jantan Wistar dengan berat badan antara 100 dan 150 gram, mendapat supernatan biakan cair kuman yang berumur 2 X 24 jam secara intragastrik. Sebagai kontrol digunakan satu kelompok tikus jantan Wistar dewasa, dengan berat badan seperti pada kelompok perlakuan, yang diberi medium cair steril secara intragastrik. Satu sampai empat jam sesudahnya, diamati kemungkinan adanya diare, adanya cairan yang berlebihan di dalam saluran cerna dan ditentukan perbandingan antara berat usus dan berat badan sisa.

Kelompok tikus jantan Wistar lainnya, dengan berat badan antara 100 dan 150 gram, mendapat suspensi sel kuman *Campylobacter fetus subspecies jejuni* sebanyak 10^8 - 10^7 secara intragastrik. Sebagai kontrol digunakan satu kelompok tikus jantan Wistar desasa, dengan berat badan seperti pada kelompok perlakuan, yang diberi air suling steril secara intragastrik. Satu sampai lima hari sesudahnya, diamati kemungkinan adanya diare, perubahan yang terjadi pada saluran cerna dan dengan mikroskop elektron dicari kemungkinan adanya kuman di dalam mukosa usus halus.

Dari kelompok yang mendapat supernatan, tidak dijumpai diare maupun cairan yang berlebihan di dalam saluran cerna dan perbandingan antara berat usus dan berat badan sisa tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol.

Dari kelompok yang mendapat suspensi sel kuman, juga tidak dijumpai adanya diare tetapi dijumpai adanya cairan yang berlebihan di dalam saluran usus halus, lambung dan caecum. Kuman dengan reaksi radang akut di sekitarnya juga ditemukan dari semua sediaan usus halus yang diperiksa.

Dari penelitian ini diketahui bahwa proses invasi kuman ke dalam mukosa usus halus jelas menyebabkan terjadinya gastroenteritis.

SUMMARY

Experiments were performed to study the causative mechanism of the pathologic process seen in *Campylobacter fetus* subspecies gastroenteritis.

The bacterial strain was isolated from a patient, age less than 2 years with diarrhea who visited Dr. Soetomo Hospital as an outpatient. Bacterial identification was based on several criteria as morphology of bacteria under light microscope, characteristics of the colony and of the growth of bacteria, oxidase test, biochemical reactions, motility test and sensitivity of nalidixic acid.

A group of male Wistar rats weighing between 100 and 150 grams were inoculated intragastrically with a supernatant of 2 X 24 hours broth culture. Similarly, a group of male Wistar rats which were inoculated with sterile medium were used as control. Observations were made for four hours after the inoculation for the possibility of diarrhea and excess accumulation of fluid in the lumen of the gut. The ratio of gut weight to the remaining body weight were then calculated.

A second group of rats meeting the same criteria as

the first group were inoculated intragastrically with a suspension of 10^9 - 10^7 viable bacteria. Similarly, a group of male Wistar rats which were inoculated with sterile aquadest were used as control. Observations were made for five days for the possibility of diarrhea and pathologic changes of the gut. Electron microscopic studies were made to visualize the presence of bacteria in the mucosa of small intestines.

The results show that in the first group of rats that were inoculated intragastrically with the supernatant fluid of broth culture exhibit no difference with the control group.

While in the second group of rats inoculated intragastrically with live bacterial suspension, accumulation of excess fluid in the lumen of the small intestine, stomach and caecum were observed. Bacteria surrounded by acute inflammatory reaction were also found by electron microscope studies in all samples taken from the small intestines.

From this study the invasion of bacteria into the mucosa of small intestines would be apparently the causative mechanism of gastroenteritis.

BAB IX

SARAN

Sesudah diketahui dengan jelas adanya invasi kuman *Campylobacter fetus subspecies jejuni* ke dalam mukosa usus tikus Wistar jantan dewasa, langkah selanjutnya adalah mengetahui ada tidaknya bakteremia dan kapan bakteremia tersebut terjadi.

Walaupun uji kepekaan antibiotika yang dilakukan hanya melibatkan sejumlah 5 strain kuman subyek penelitian, namun mengingat hasil yang diperoleh serupa dengan hasil penelitian sebelumnya, maka hasil ini paling tidak dapat dipakai untuk membantu pemilihan antibiotika yang efektif.