

- ENTEROBACTERIALEAE
- FIMBRIAE, BACTERIAL

kk
Tkd. 15/04
Jan
P

TESIS

**PERANAN PROTEIN *FIMBRIAE* DAN LIPOPOLISAKARIDA
TERHADAP PERLEKATAN BAKTERI *Enterohemorrhagic Escherichia coli*
(EHEC) O157 PADA ENTEROSIT KELINCI SECARA *INVITRO***



DEWI SANTOSANINGSIH



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2003**

Lembar pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 28 JULI 2003

Oleh

Pembimbing Ketua



DR. dr. H. Eddy Bagus Wasito, MS, SpMK
NIP. 130 676 011

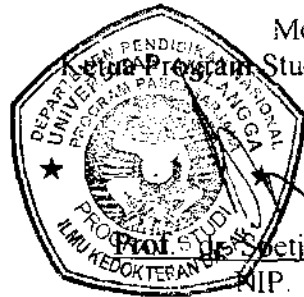
Pembimbing



DR. dr. Suparno, SpMK
NIP. 130 809 130

Mengetahui

~~Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar~~



Prof. dr. Setiipri, MS, Ph.D
NIP. 130 687 606

T E S I S

**PERANAN PROTEIN *FIMBRIAE* DAN LIPOPOLISAKARIDA
TERHADAP PERLEKATAN BAKTERI *Enterohemorrhagic Escherichia coli*
(EHEC) O157 PADA ENTEROSIT KELINCI SECARA *INVITRO***



**DEWI SANTOSANINGSIH
090114226-M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2003**

**PERANAN PROTEIN *FIMBRIAE* DAN LIPOPOLISAKARIDA
TERHADAP PERLEKATAN BAKTERI *Enterohemorrhagic Escherichia coli*
(EHEC) O157 PADA ENTEROSIT KELINCI SECARA *INVITRO***

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh :

DEWI SANTOSANINGSIH
NIM : 090114226-M

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
Tanggal 28 Juli 2003

iii

Telah diuji pada
Tanggal 28 Juli 2003

PANITIA PENGUJI TESIS

1. Prof. dr. Kuntoro, MPH, DPH (Ketua)
2. DR. dr. Eddy Bagus Wasito, MS, SpMK
3. DR. dr. Sumarno, SpMK
4. dr. Sjoekcer M. Dzen, SpMK
5. DR. dr. Subijanto Marto Sudarmo, SpAK



UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadiran Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada DR. dr. Eddy Bagus Wasito, MS, SpMK, Pembimbing Ketua sekaligus Ketua Minat Studi Mikrobiologi Kedokteran, yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan, dan saran kepada saya. Dari beliau saya banyak mendapatkan masukan wawasan keilmuan yang dapat digunakan untuk memecahkan masalah yang timbul selama proses penyusunan tesis ini. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayah serta melipat gandakan pahalaNya kepada beliau

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada DR. dr. Sumarno, SpMK selaku pembimbing sekaligus mantan Kepala Laboratorium Mikrobiologi FK Unibraw yang telah memberikan ijin kepada saya untuk menempuh Program Magister di Universitas Airlangga dan dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan bimbingan dan saran utamanya dalam bidang teknik laboratorium yang terkait dengan penelitian saya ini.

Ucapan terima kasih tidak lupa saya sampaikan kepada Prof. dr. Kuntoro, MPH, DPH selaku konsultan metodologi dan statistik yang telah banyak membantu dan memberikan masukan yang berkaitan dengan analisis data.

Kepada panitia penguji usulan penelitian dan tesis, dr.Sjoekoer,M.Dzen, SpMK yang sekaligus sebagai senior saya di Laboratorium Mikrobiologi FK Unibraw, serta DR. dr. Subijanto Marto Sudarmo, SpAK saya sampaikan rasa terima kasih yang sedalam-dalamnya atas segala dorongan semangat, bimbingan, dan saran yang diberikan kepada saya.

Saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Pendidikan Nasional yang telah memberikan bantuan finansial, sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada :

- Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Med. dr. Puruhito, SpB TKV atas kesempatan bagi saya untuk mengikuti pendidikan Program Magister di Universitas Airlangga.
- Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. DR. dr. H. Muh. Amin, SpP yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Magister di Universitas Airlangga.

Rasa terima kasih juga saya sampaikan kepada Prof. dr. Soetjpto, MS, PhD, sebagai Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ungkapan rasa terima kasih saya sampaikan kepada Rektor Universitas Brawijaya Prof. DR. Ir. Bambang Guritno dan mantan Rektor Universitas Brawijaya

Prof. DR. H. Eka Afnan Troena, SE atas ijin dan bantuan finansial yang diberikan kepada saya sehingga saya dapat mengikuti pendidikan Program Magister di Universitas Airlangga.

Kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dr. Hariyanto, MPH dan mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dr. Achmad Rudijanto, SpPD KE, saya ucapkan terima kasih atas ijin dan dorongan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Magister di Universitas Airlangga.

Ungkapan rasa terima kasih saya sampaikan kepada Kepala Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. DR. dr. Sanarto Santoso, SpMK yang memberi ijin dan senantiasa memberi semangat kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan Program Magister di Universitas Airlangga tepat waktu.

Kepada senior-senior saya di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dr. Roekistmingsih, MS, SpMK, dr. Noorhamdani, SpMK, dr. Samsul Islam, SpMK, sekaligus sebagai Pembantu Dekan II FK Unibraw. Dra. Sri Winarsih, Apt. MSi, dan Drh. Sri Murwani, MP, saya sampaikan terima kasih yang sedalam-dalamnya atas segala perhatian, masukan-masukan dalam substansi keilmuan yang saya tekuni, dorongan semangat yang tiada hentinya serta pengertian yang luar biasa selama saya mengikuti pendidikan Program Magister. Kepada seluruh karyawan Laboratorium Mikrobiologi FK Unibraw juga saya ucapkan terima kasih atas bantuannya selama saya menempuh pendidikan program Magister.

Kepada mantan Kepala Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Prof. DR. dr. Mulyohadi Ali yang sekarang menjabat sebagai Pembantu Dekan I FK Unibraw, saya sampaikan terima kasih atas ijin yang diberikan kepada saya untuk menggunakan fasilitas laboratorium yang beliau pimpin. Sekaligus saya ucapkan terima kasih kepada seluruh staf dan karyawan Laboratorium Biomedik atas segala bantuan dan kerja samanya selama penelitian yang saya lakukan.

Ungkapan rasa terima kasih saya sampaikan kepada para dosen saya yang telah menambah pengetahuan dan wawasan keilmuan saya selama mengikuti pendidikan Program Magister .

Kepada teman-teman sekelas peserta Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar khususnya Minat Studi Mikrobiologi Kedokteran Akhmad Mukhlisin, SPd, MKes, drg. Atik Kurniawati, dr. Bambang Susilo, drh. Dharwin Siswanto, Erni Yohani Mahtuti, SPd. Laksmin Kadir, SPd. dr. Retno Budiarti, dr. Yunita Arliny, Nikmah Madjid, SPd. drg. Zulfika Indira S, dan drh. Rosmelati, MKes, saya mengucapkan terima kasih yang tak terhingga atas kebersamaan berbagi rasa suka dan duka, berbagi pengalaman dalam keilmuan serta kerja samanya yang baik.

Ungkapan rasa terima kasih dan penghargaan yang tiada tara saya haturkan kepada ayah saya Drs. M.S. Rochadi dan ibu saya Supadmi atas segala kasih sayang, pengertian, dan doa yang telah diberikan kepada saya sehingga saya mampu menyelesaikan pendidikan Program Magister. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat serta hidayahNya kepada ayah dan ibu tercinta. Demikian pula

RINGKASAN

Penyakit diare merupakan salah satu penyebab utama kematian dan kesakitan masa anak-anak di negara berkembang. Salah satu bakteri enteropatogen penyebab diare adalah *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC). *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) serotipe O157 : H7 merupakan kelompok *Escherichia coli* (*E. coli*) patogen yang paling sering menyebabkan terjadinya *hemorrhagic colitis* (HC) dan komplikasinya berupa *hemolytic uremic syndrome* (HUS) terutama pada anak. Bakteri tersebut menghasilkan *Shiga toxin* sehingga termasuk dalam kelompok *Shiga toxin producing Escherichia coli* (STEC). Morbiditas dan mortalitas yang terjadi pada beberapa wabah infeksi STEC menunjukkan bahwa mikroorganisme tersebut mengancam kesehatan masyarakat.

Pengembangan strategi terapi dan pencegahan untuk menanggulangi infeksi gastrointestinal oleh STEC membutuhkan pengetahuan yang mendalam tentang mekanisme bakteri tersebut dalam berkolonisasi di traktus intestinal manusia dan dalam menyebabkan perubahan patologis secara lokal maupun sistemik. Sejauh ini satu-satunya faktor perlekatan yang diketahui penting untuk berkolonisasi di usus adalah intimin, suatu *outer membrane protein* dengan berat molekul 94-97 kDa yang dikode oleh gen *eae*. Namun demikian dalam jumlah sedikit tetapi bermakna, ditemukan isolat STEC dari penderita HC dan HUS yang tidak mengandung gen *eae*. Walaupun tidak mengandung gen *eae*, bakteri tersebut menyebabkan gejala yang berat pada penderita. Hal ini mengindikasikan bahwa intimin bukan satu-satunya faktor virulensi yang penting untuk perlekatan STEC.

Faktor perlekatan yang dimiliki oleh bakteri intestinal patogen, selain *outer membrane protein* adalah *fimbriae* dan lipopolisakarida (LPS). Sehingga tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa selain intimin, *protein fimbriae* dan LPS turut berperan sebagai adhesin pada perlekatan bakteri EHEC O157. Untuk itu telah dilakukan isolasi *crude protein fimbriae* dan LPS dari bakteri EHEC O157 yang dilanjutkan dengan uji hemaglutinasi dengan metode mikrotiter dan uji adhesi. Pada uji adhesi, *crude protein fimbriae* dan LPS EHEC O157 disalutkan pada enterosit kelinci dengan konsentrasi semakin menurun mulai dari konsentrasi 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, dan 0 atau kontrol. Dari uji adhesi diperoleh nilai indeks adhesi yaitu banyaknya bakteri yang melekat pada enterosit dihitung sampai seratus enterosit dan dibuat reratanya.

Hasil penelitian menunjukkan adanya reaksi hemaglutinasi pada *crude protein fimbriae* maupun LPS EHEC O157 yang berarti bahwa di dalam kedua komponen permukaan bakteri tersebut mengandung adhesin. Diduga adhesin pada *crude protein fimbriae* diperankan oleh protein dengan berat molekul 31 kDa dan 24 kDa, sedangkan pada LPS adhesin diperankan oleh *O side chain region*. Hasil uji adhesi *crude protein fimbriae* EHEC O157 menunjukkan bahwa semakin kecil konsentrasi *crude protein fimbriae* yang disalutkan pada enterosit, maka indeks adhesi bakteri tersebut semakin tinggi. Hal ini ditunjang oleh hasil analisis regresi bahwa terdapat pengaruh yang nyata konsentrasi *crude protein fimbriae* EHEC O157 terhadap indeks adhesi bakteri EHEC O157 pada enterosit dengan nilai F sebesar 78,852 ($p < 0,05$).

Demikian juga hasil uji adhesi LPS EHEC O157 yang menunjukkan bahwa semakin kecil konsentrasi LPS yang disalutkan pada enterosit, maka indeks adhesi bakteri tersebut semakin tinggi. Hal ini ditunjang oleh hasil analisis regresi bahwa terdapat pengaruh yang nyata konsentrasi LPS terhadap indeks adhesi bakteri EHEC O157 pada enterosit dengan nilai F sebesar 97,315 ($p < 0,05$). Berdasarkan analisis regresi antara uji adhesi *crude protein fimbriae* dengan LPS terdapat perbedaan kekuatan pengaruh konsentrasi keduanya terhadap indeks adhesi EHEC O157. Konsentrasi lipopolisakarida nampaknya memiliki pengaruh yang sedikit lebih kuat terhadap indeks adhesi EHEC O157 dibandingkan konsentrasi *crude protein fimbriae*.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa protein *fimbriae* dan LPS mengandung adhesin. Adhesin di dalam *crude protein fimbriae* diduga diperankan oleh protein dengan berat molekul 31 kDa dan 24 kDa. Sedangkan adhesin di dalam LPS, diduga diperankan oleh *O side region*. Adhesin tersebut berperan terhadap perlekatan bakteri EHEC O157 pada enterosit kelinci. Dengan demikian pada EHEC O157 terdapat *multiple adherence factors* yang diperankan oleh oleh intimin (yang telah ditemukan lebih dahulu), protein *fimbriae* dan LPS.



SUMMARY

Diarrhea is one of the important cause of mortality and morbidity among childhood in developing countries. *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 are well known as causative agent of diarrhea, hemorrhagic colitis (HC), and the hemolytic uremic syndrome (HUS) especially at child. The bacteria yield Shiga toxin so that is included in group of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). The morbidity and mortality associated with several recent large outbreaks of gastrointestinal disease caused by STEC has highlighted the threat these organisms pose to public health.

Development of therapeutic and preventative strategies to combat STEC disease requires a thorough understanding of the mechanisms by which STEC organisms included EHEC O157 colonize the human intestinal tract and cause local and systemic pathological changes. For *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) O157, intimin, a 94-97 kDa outer membrane protein is the only bacterial adherence factor identified thus far as important for intestinal colonization encoded by *eae* gene. Notwithstanding the above, a significant minority of human STEC isolates, including those from patients with HC and HUS, do not contain *eae*, indicating that intimin is not essential for human virulence.

Factors implicated in the adherence of other enteric pathogens besides outer membrane protein are fimbriae and lipopolysaccharide (LPS). So that the main purposed of this research is to prove that besides intimin, the protein of fimbriae and LPS also play a role as adhesin for intestinal colonization of EHEC O157. Therefore, the crude of fimbrial protein and lipopolysaccharide (LPS) of EHEC O157 extraction had been done. It was continued with hemagglutination and adhesion assay. The hemagglutination assay in this research used microtiter method. In the adhesion assay, each crude of fimbrial protein or LPS was mounted at rabbit enterocyte with concentration progressively decline from 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, to 0. From the adhesion assay, it was obtained adhesion index that is the number of coherent bacteria at enterocyte counted until one hundred enterocytes and made its average.

This research shows the hemagglutination reaction in both crude of fimbrial protein and LPS, meaning that in the two surface components of the bacteria contain adhesin. It is suggested that the adhesin in crude of fimbrial protein is mediated by protein 31 kDa and 24 kDa, whereas the adhesin in LPS is mediated by O side chain region. The adhesion assay shows that lesser the crude of fimbrial protein concentration mounted at enterocyte higher the adhesion index of EHEC O157. It means that the crude of fimbrial protein concentration influences adhesion index of EHEC O157 and is supported by regression analysis with F value is 78.852 ($p < 0.05$). Likewise, the adhesion assay shows that lesser LPS concentration mounted at enterocyte higher the adhesion index of EHEC O157. It is also means that the LPS concentration influences adhesion index of EHEC O157 and is supported by regression analysis with F value is 97.315 ($p < 0.05$). Based on regression analysis there is a distinctive of influence power between crude of fimbrial protein and LPS

concentration to adhesion index of EHEC O157. It seems that LPS concentration little more influence than crude of fimbrial protein.

From this research, it could be concluded that fimbrial protein and LPS contain adhesin. It is suggested that adhesin in the crude of fimbrial protein is mediated by protein 31 kDa and 24 kDa. Whereas it is suggested that adhesin in the LPS is mediated by O side region. The adhesins play a role for EHEC O157 adherence to rabbit enterocyte. Thus, EHEC O157 has multiple adherence factors mediated by intimin (found previous), fimbrial protein, and LPS.



ABSTRACT

Intimin (encoded with *eae* gene) is the only bacterial adherence factor identified thus far as important for intestinal colonization in *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) O157. Notwithstanding the above, a significant minority of human STEC⁺ isolates, including those from patients with hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome, do not contain *eae* gene, indicating that intimin is not essential for human virulence. Therefore the main purposed of this research is to prove that besides intimin, the other adherence factors such as fimbrial protein and lipopolysaccharide (LPS) also play a role in the adherence mechanism of EHEC O157 to enterocyte.

The crude of fimbrial protein and lipopolysaccharide (LPS) of EHEC O157 extraction had been done. It was continued with hemagglutination and adhesion assay. The hemagglutination assay in this research used microtiter method. In the adhesion assay, each crude of fimbrial protein or LPS was mounted at rabbit enterocyte with concentration progressively decline from 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, to 0. From the adhesion assay, it was obtained adhesion index that is the number of coherent bacteria at enterocyte counted until one hundred enterocytes and made its average.

This research shows the hemagglutination reaction in both crude of fimbrial protein and LPS, meaning that in the two surface components of the bacteria contain adhesin. It is suggested that the adhesin in crude of fimbrial protein is mediated by protein 31 kDa and 24 kDa, whereas the adhesin in LPS is mediated by O side chain region. The adhesion assay shows the influence of crude of fimbrial protein concentration to the adhesion index of EHEC O157 at enterocyte supported by regression analysis with F value is 78.852 ($p < 0.05$). Likewise, the adhesion assay shows the influence of LPS concentration to the adhesion index of EHEC O157 at enterocyte with F value is 97.315 ($p < 0.05$). Based on the regression analysis, it seems that LPS concentration little more influence to adhesion index than crude of fimbrial protein concentration.

Keywords : EHEC O157, fimbrial protein, lipopolisakarida, adherence mechanism

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan.....	iv
Penetapan Panitia.....	v
Ucapan terima kasih.....	vi
Ringkasan.....	xi
Summary	xiii
Abstract.....	xv
Daftar isi.....	xvi
Daftar tabel.....	xix
Daftar gambar.....	xx
Daftar grafik	xxi
Daftar lampiran.....	xxii
Daftar singkatan.....	xxiii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Karakteristik Umum <i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i> (EHEC) O157.....	9
2.2 Faktor Virulensi EHEC O157.....	12
2.3 Pathogenesis <i>Hemorrhagic Colitis dan Hemolytic Uremic Syndrome</i>	25
2.4 Manifestasi Klinis Infeksi EHEC O157.....	27
2.5 Diagnosis Laboratorium Infeksi EHEC O157.....	27
2.6 Terapi Infeksi EHEC O157.....	29
2.7 Pencegahan Infeksi EHEC O157.....	30
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS.....	33
3.1 Kerangka Konseptual.....	33
3.2 Hipotesis.....	36

BAB 4 METODE PENELITIAN.....	37
4.1 Rancangan Penelitian.....	37
4.2 Sampel.....	38
4.3 Variabel Penelitian.....	39
4.4 Bahan Penelitian.....	40
4.4.1 Bahan untuk identifikasi bakteri EHEC O157.....	40
4.4.2 Bahan untuk isolasi <i>crude protein fimbriae</i>	40
4.4.3 Bahan untuk isolasi <i>crude outer membrane protein</i> (OMP).....	40
4.4.4 Bahan untuk isolasi lipopolisakarida.....	40
4.4.5 Bahan untuk uji hemaglutinasi.....	40
4.4.6 Bahan untuk isolasi enterosit kelinci.....	41
4.4.7 Bahan untuk uji adhesi.....	41
4.5 Instrumen Penelitian.....	41
4.5.1 Instrumen untuk identifikasi bakteri EHEC O157.....	41
4.5.2 Instrumen untuk isolasi <i>crude protein fimbriae</i>	41
4.5.3 Instrumen untuk isolasi <i>crude outer membrane protein</i> (OMP).....	41
4.5.4 Instrumen untuk isolasi lipopolisakarida.....	42
4.5.5 Instrumen untuk uji hemaglutinasi.....	42
4.5.6 Instrumen untuk isolasi enterosit kelinci.....	42
4.5.7 Instrumen untuk uji adhesi.....	42
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	42
4.6.1 Lokasi Penelitian.....	42
4.6.2 Waktu Penelitian.....	42
4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data.....	43
4.7.1 Prosedur identifikasi bakteri EHEC O157.....	43
4.7.2 Prosedur isolasi <i>crude protein fimbriae</i>	45
4.7.3 Prosedur isolasi <i>crude outer membrane protein</i> (OMP)....	45
4.7.4 Prosedur isolasi lipopolisakarida.....	46
4.7.5 Prosedur uji hemaglutinasi.....	47
4.7.6 Prosedur isolasi enterosit kelinci.....	48
4.7.7 Prosedur uji adhesi.....	49
4.7.8 Pengumpulan Data.....	50
4.8 Cara Analisis Data.....	52
KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN.....	53
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN.....	54
5.1 Uji Hemaglutinasi dan SDS PAGE.....	55
5.2 Uji Adhesi Hemaglutinin Bakterial.....	60
5.2.1 Uji Adhesi <i>Crude Protein Fimbriae</i> EHEC O157.....	61
5.2.2 Uji Adhesi Lipopolisakarida EHEC O157.....	64

5.2.3 Analisis Statistik Uji Adhesi	67
5.2.3.1 Analisis Statistik Uji Adhesi <i>Crude Protein Fimbriae</i> EHEC O157.....	67
5.2.3.2 Analisis Statistik Uji Adhesi Lipopolisakarida EHEC O157.....	70
BAB 6 PEMBAHASAN	74
6.1 Pengaruh Konsentrasi <i>Crude Protein Fimbriae</i> Terhadap Indeks Adhesi Bakteri EHEC O157.....	74
6.2 Pengaruh Konsentrasi Lipopolisakarida Terhadap Indeks Adhesi Bakteri EHEC O157.....	78
6.3 Peranan Protein <i>Fimbriae</i> Dan Lipopolisakarida Terhadap Proses Perlekatan Bakteri EHEC O157.....	80
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	82
7.1 Kesimpulan	82
7.2 Saran	83
DAFTAR PUSTAKA.....	84
LAMPIRAN	90



DAFTAR TABEL

	Halaman	
Tabel 4.1	Titer hemaglutinasi <i>crude protein fimbriae</i> , <i>outer membrane protein</i> , dan lipopolisakarida EHEC O157.....	50
Tabel 4.2	Indeks adhesi EHEC O157 pada enterosit kelinci yang disalut <i>crude protein fimbriae</i>	51
Tabel 4.3	Indeks adhesi EHEC O157 pada enterosit kelinci yang disalut lipopolisakarida.....	51
Tabel 5.1	Ringkasan hasil indeks adhesi EHEC O157 pada enterosit disalut <i>crude protein fimbriae</i>	68
Tabel 5.2	Ringkasan hasil indeks adhesi EHEC O157 pada enterosit disalut lipopolisakarida	70



DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Struktur sel bakteri.....	9
Gambar 2.2	Struktur dinding sel bakteri Gram negatif.....	10
Gambar 2.3	Bakteri <i>E. coli</i> O157 dilihat dengan <i>transmission electron micrograph</i>	11
Gambar 2.4	Mekanisme perlekatan bakteri dimana vaksin anti-adhesin potensial untuk menghambat kolonisasi dan infeksi.....	16
Gambar 2.5	Pola perlekatan <i>E. coli</i> pada sel Hep-2.....	18
Gambar 2.6	Perlekatan bakteri menggunakan <i>fimbriae</i> (pili).....	20
Gambar 2.7	<i>Adhesive tip</i> dari <i>fimbriae</i> (pili) bakteri berikatan dengan reseptor sel hos.....	21
Gambar 5.1	Biakan EHEC O157 pada Sorbitol MacConkey (SMAC) agar.....	54
Gambar 5.2	Titer hemaglutinasi <i>crude protein fimbriae</i> EHEC O157.....	56
Gambar 5.3	Titer hemaglutinasi lipopolisakarida EHEC O157.....	56
Gambar 5.4	Hasil SDS PAGE <i>crude protein fimbriae</i> dengan metode pewarnaan <i>silver staining</i>	58
Gambar 5.5	Perlakuan kontrol uji adhesi <i>crude protein fimbriae</i> EHEC O157.....	61
Gambar 5.6	Perlakuan <i>crude protein fimbriae</i> konsentrasi $\frac{1}{8}$	62
Gambar 5.7	Perlakuan <i>crude protein fimbriae</i> konsentrasi $\frac{1}{2}$	63
Gambar 5.8	Perlakuan <i>crude protein fimbriae</i> konsentrasi 1.....	63
Gambar 5.9	Perlakuan kontrol uji adhesi lipopolisakarida EHEC O157.....	64
Gambar 5.10	Perlakuan lipopolisakarida konsentrasi $\frac{1}{8}$	65
Gambar 5.11	Perlakuan lipopolisakarida konsentrasi $\frac{1}{2}$	66
Gambar 5.12	Perlakuan lipopolisakarida konsentrasi 1.....	66

DAFTAR GRAFIK

	Halaman
Grafik 5.1	Gambaran spektrofotometri LPS EHEC O157 dibandingkan LPS <i>E. coli</i> O127 60
Grafik 5.2	Grafik uji regresi linier sederhana antara konsentrasi <i>crude protein fimbriae</i> dengan indeks adhesi EHEC O157 69
Grafik 5.3	Grafik uji regresi linier sederhana antara konsentrasi lipopolisakarida dengan indeks adhesi EHEC O157 72



DAFTAR LAMPIRAN

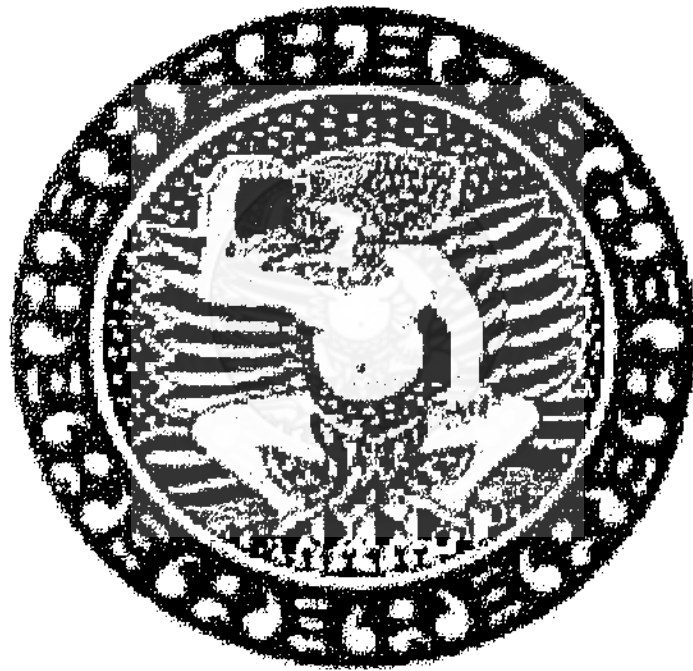
	Halaman
Lampiran 1 : Jadwal Kegiatan Penelitian	90
Lampiran 2 : Hasil identifikasi <i>E. coli</i> dengan Microbact system	91
Lampiran 3 : Hasil indeks adhesi EHEC O157 disalut <i>crude protein fimbriae</i>	92
Lampiran 4 : Hasil indeks adhesi EHEC O157 disalut LPS	94
Lampiran 5 : Hasil uji – t berpasangan antara indeks adhesi ulasan 1 dan ulasan 2	96
Lampiran 6 : Hasil perhitungan uji regresi linier sederhana antara konsentrasi <i>crude protein fimbriae</i> dengan indeks adhesi EHEC O157 (SPSS 10.0).....	97
Lampiran 7 : Hasil perhitungan uji regresi linier sederhana antara konsentrasi LPS dengan indeks adhesi EHEC O157 (SPSS 10.0).....	101

DAFTAR SINGKATAN

Anova	:	Analysis of Variance
BHI	:	Brain Heart Infusion
BSA	:	Bovine Serum Albumine
Chaps	:	[3-((3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio)-1-propanesulfonate]
EDTA	:	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
EHEC	:	Enterohemorrhagic Escherichia coli
ELISA	:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FK UNIBRAW	:	Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
Gb3	:	Globotriaocylceramide
HA-F36	:	Hemagglutinin-Fimbriae 36 kDa
HA-O36	:	Hemagglutinin-OMP 36 kDa
HC	:	Hemorrhagic Colitis
HUS	:	Hemolytic Uremic Syndrome
kDa	:	kilo Dalton
LPS	:	Lipopolysaccharide
OD	:	Optical Density
OMP	:	Outer Membrane Protein
PBS	:	Phosphate Buffer Saline
RSSA	:	Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar

SDS PAGE	:	Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SMAC	:	Sorbitol MacConkey
STEC	:	Shiga Toxin-Producing <i>Escherichia coli</i>
Stx	:	Shiga toxin
TCA	:	Trichloroacetic acid
TCG	:	Thiaproline Carbonat Glutamat

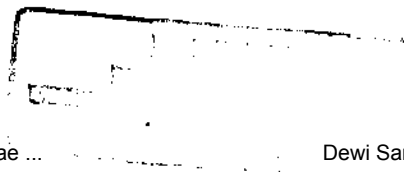




BAB 1**PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang**

Penyakit diare merupakan salah satu penyebab utama kematian dan kesakitan masa anak-anak di negara berkembang. Diperkirakan diare menyebabkan kematian sebanyak 5 juta anak balita setiap tahunnya. Kematian yang berkaitan dengan diare merupakan bagian terbesar tingginya angka kematian bayi dan anak di banyak negara berkembang. Diare juga menyebabkan tingginya angka kesakitan anak di negara berkembang. Diperkirakan 1000 juta kejadian diare terjadi setiap tahun pada anak balita. Hasil survey di Indonesia menunjukkan bahwa angka kesakitan diare untuk seluruh golongan umur adalah berkisar antara 120-360 per 1000 penduduk dan untuk balita menderita satu atau dua kali episode diare setiap tahunnya atau 60% dari semua kesakitan diare. Kasus diare merupakan bagian besar jumlah penderita pada hampir semua rumah sakit di negara berkembang, penderita yang berobat jalan, dan praktek dokter. Akibatnya penyakit diare menimbulkan beban yang sangat berat bagi sarana kesehatan dan anggaran kesehatan nasional (Sunoto, 1990).

Salah satu bakteri enteropatogen penyebab diare adalah *Escherichia coli* (*E. coli*). Menurut Sunoto, 1990, *Escherichia coli* merupakan 25% penyebab seluruh diare di negara berkembang. Profil isolat bakteri yang berasal dari tinja



penderita diare yang dirawat di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang 1994-1998 menunjukkan 38% adalah *E. coli* (Sumarno, 2000). Sedangkan hasil penelitian Sjoekoer dkk, (2000) menunjukkan bahwa 64,5% isolat bakteri dari tinja anak penderita diare usia 4 hari – 9 th yang diperiksa di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada tahun 1999 hingga 2000 adalah *E. coli*. Telah dikenal lima kelompok *E. coli* patogen yaitu *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC), *Enteropathogenic E. coli* (EPEC), *Enteroinvasive E. coli* (EIEC), *Enterobacteriaceae Aggregative E. coli* (EAggEC), dan *Enterohemorrhagic E. coli* (EHEC) (Joklik et al., 1988).

Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) sebagai suatu kelompok *E. coli* patogen diperkenalkan oleh dua penelitian epidemiologik yang penting. Pertama, Riley *et al.*, (1983) meneliti dua kejadian wabah dari penyakit saluran pencernaan yang ditandai oleh nyeri abdomen yang berat, diare profus disertai darah dan tanpa atau disertai demam. Penyakit ini selanjutnya dinamakan *hemorrhagic colitis* (yang selanjutnya ditulis dengan HC), yang berhubungan dengan konsumsi daging yang tidak dimasak sempurna di berbagai rumah makan siap saji di Amerika Serikat. Kultur tinja dari penderita menunjukkan hasil *E. coli* serotipe O157:H7 yang sebelumnya jarang diisolasi dari penderita diare. Penelitian penting yang kedua adalah Karmali *et al.*, (1983) melaporkan hubungan antara kasus sporadik *hemolytic uremic syndrome* (yang selanjutnya ditulis dengan HUS) dengan sitotoksin dalam tinja dan *E. coli* di dalam tinja yang menghasilkan sitotoksin tersebut. *Hemolytic uremic syndrome* (ditandai dengan trias gagal ginjal akut, trombositopenia, dan anemia hemolitik

mikroangiopatik) didahului oleh diare disertai darah yang sama dengan gejala HC. Dua penemuan di bidang mikrobiologi tersebut mengawali pengenalan terhadap suatu kelompok bakteri enteropatogen yang menyebabkan penyakit pada usus dan ginjal (Nataro and Kaper, 1998).

Dari berbagai penelitian yang terus menerus dilakukan, ditemukan bahwa sitotoksin yang dihasilkan oleh *E. coli* O157:H7 menimbulkan efek sitopatik pada kultur *Vero cells* sehingga disebut *Verotoxigenic-producing E. coli* (VTEC). Nama lain yang digunakan adalah *Shiga toxin-producing E. coli* (STEC) karena salah satu dari sitotoksin yang dihasilkan oleh bakteri tersebut memiliki kemiripan baik secara genetik maupun kandungan proteinnya dengan *Shiga toxin* yang dihasilkan oleh *Shigella dysenteriae 1* (Nataro and Kaper, 1998). *Shiga toxin-producing E. coli* (STEC) terdiri dari sekitar 60 serotipe (Paton and Paton, 1998) diantaranya O26:H11, O26:H-, O103:H2, O111:H-, O121:H19, O145:H-, O157:H7, dan O157:H- yang sering menimbulkan gejala penyakit yang berat (Fukushima *et al.*, 2000).

Morbiditas dan mortalitas yang terjadi pada beberapa wabah infeksi STEC menunjukkan bahwa mikroorganisme tersebut mengancam kesehatan masyarakat. Beberapa wabah justru terjadi di negara dengan sistem perawatan kesehatan yang maju. Wabah di belahan barat Amerika Serikat terjadi pada tahun 1993 dimana 700 orang menderita infeksi STEC serotipe O157:H7 dan 50 kasus berkembang menjadi HUS dengan 4 orang meninggal. Wabah terbesar terjadi di Sakai, Jepang pada tahun 1996 dimana 6000 orang menderita HC dan

lebih dari 100 orang berkembang menjadi HUS dengan 12 orang meninggal yang juga disebabkan oleh serotipe O157:H7 (Paton and Paton, 1998).

Enterohemorrhagic E.coli (EHEC) O157:H7 dapat ditularkan melalui makanan, air dan dari orang ke orang. Sebagian besar kasus disebabkan oleh konsumsi makanan yang terkontaminasi, terutama makanan yang berasal dari bahan dasar daging sapi (Nataro and Kaper, 1998). Selain daging sapi, kuman ini dapat berasal dari daging domba, kambing, dan babi. Bahan makanan lain yang merupakan sumber infeksi kuman tersebut adalah susu yang tidak dipasteurisasi, produk daging yang difermentasi atau dikeringkan seperti *salami* dan *jerky* serta buah dan sayuran yang terkontaminasi pada saat pengolahan (Paton and Paton, 1998).

Pengembangan strategi terapi dan pencegahan untuk menanggulangi infeksi gastrointestinal oleh STEC membutuhkan pengetahuan yang mendalam tentang mekanisme bakteri STEC dalam berkolonisasi di traktus intestinal manusia dan dalam menyebabkan perubahan patologis secara lokal maupun sistemik (Paton and Paton, 1998). Infeksi oleh *E. coli* penghasil *Shiga toxin* ini diawali dengan kolonisasi bakteri di usus. Pada bakteri tersebut, satu-satunya faktor perlekatan yang diketahui penting untuk kolonisasi di usus adalah *intimin*, suatu *outer membrane protein* dengan berat molekul 94-97 kDa yang dikode oleh gen *eae*. Gen *eae* dimiliki oleh sebagian besar strain STEC, khususnya yang patogen bagi manusia (Kaper and O'Brien, 1998).

Namun demikian, dalam jumlah sedikit tetapi bermakna, ditemukan isolat STEC dari penderita HC dan HUS yang tidak mengandung gen *eae*. Di

rumah sakit *Clermont-Ferrand* Perancis antara bulan Agustus 1996 sampai Mei 1997 ditemukan 14 kasus HUS. Dari 14 kasus HUS tersebut, 6 bahan pemeriksaan tinja dianalisis dengan PCR dan hasilnya menunjukkan bahwa semua isolat mengandung bakteri STEC yang kesemuanya tidak mengandung gen *eae*. Walaupun tidak memiliki gen pengkode *intimin*, bakteri tersebut menyebabkan gejala yang berat pada penderita. Hal ini ditandai dengan penurunan kadar hemoglobin penderita HUS tersebut berkisar 5,9 – 9,8 g/dl, jumlah platelet tinggal 22.000 – 94.000/ μ l, dan kadar kreatinin meningkat menjadi 240 – 1127 μ mol/liter (Bonnet et al., 1998). Hal ini berarti bahwa *intimin* bukan satu-satunya faktor virulensi yang penting untuk perlekatan (Paton and Paton, 1998). Tidak adanya gen *eae* pada isolat STEC dari bahan pemeriksaan klinis menunjukkan bahwa terdapat faktor perlekatan tambahan yang belum diketahui dengan jelas peranannya (Kaper and O'Brien, 1998).

Menurut Paton and Paton, (1998), faktor perlekatan yang dimiliki oleh bakteri intestinal patogen selain *outer membrane protein* adalah *fimbriae* dan lipopolisakarida (LPS). Interaksi spesifik bakteri dengan reseptor glikoprotein atau glikolipid di permukaan sel hos diperankan oleh satu dari tip protein yang disebut dengan adhesin. Adhesin dari *E. coli* berada pada *fimbriae*-nya. Sebagai contoh, FimH adhesin yang dibentuk oleh sebagian besar *Enterobacteriaceae*, berperan dalam perlekatan *fimbriae* tipe 1 terhadap reseptor *D-mannosides*, sementara FimG adhesin berperan dalam perlekatan *fimbriae* tipe Pap terhadap reseptor *D-gal β -D-Gal* di permukaan sel hos (Wizemann, 1999). Pada

mulanya *fimbriae* diperkirakan sebagai struktur homopolimer tersusun dari sekitar 1000 kopi subunit struktural (fimbrin) yang dikemas dalam bentuk *helical array*. Namun demikian, banyak *fimbriae* yang telah terkarakterisasi dengan baik seperti *fimbriae* tipe I dan tipe Pap yang diekspresikan oleh *E. coli* dan *Enterobacteriaceae* yang lain, merupakan struktur heteropolimer dengan *minor tip fibrillae protein* yang terletak di ujung distal dari *fimbriae* (Wizemann, 1999). Sebagian besar *fimbriae* mengandung residu asam amino hidrofobik dalam jumlah besar, sehingga dianggap berperan dalam membentuk hidrofobitas permukaan sel yang penting untuk perlekatan bakteri (Donlan, 2002). Protein adhesin apabila ditinjau dari keberadaannya disamping terdapat pada bagian *fimbriae* bakteri, ditemukan juga pada *outer membrane protein* (Ward, 1980). Sedangkan LPS merupakan komponen dinding sel bakteri Gram negatif yang mengandung struktur yang potensial untuk membantu perlekatan bakteri (Todar, 2002).

Pada bakteri EHEC O157:H7, *intimin* yang merupakan *outer membrane protein* diketahui sebagai satu-satunya faktor perlekatan bakteri pada permukaan enterosit, sedangkan peranan *fimbriae* dan LPS sebagai faktor perlekatan bakteri tersebut masih perlu diteliti lebih lanjut (Kaper and O'Brien, 1998). Untuk itu dalam penelitian ini dilakukan uji adhesi terhadap *crude protein fimbriae* dan LPS dari bakteri EHEC O157 dengan konsentrasi yang berbeda dan dianalisis pengaruhnya terhadap indeks adhesi EHEC O157.

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang tersebut di atas ditarik suatu rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah terdapat pengaruh konsentrasi *crude protein fimbriae* EHEC O157 yang disalutkan pada enterosit kelinci secara *invitro* terhadap indeks adhesi bakteri tersebut?
2. Apakah terdapat pengaruh konsentrasi *crude LPS* EHEC O157 yang disalutkan pada enterosit kelinci secara *invitro* terhadap indeks adhesi bakteri tersebut?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan umum:

Untuk membuktikan bahwa protein *fimbriae* dan LPS berperan pada kolonisasi bakteri EHEC O157 di enterosit.

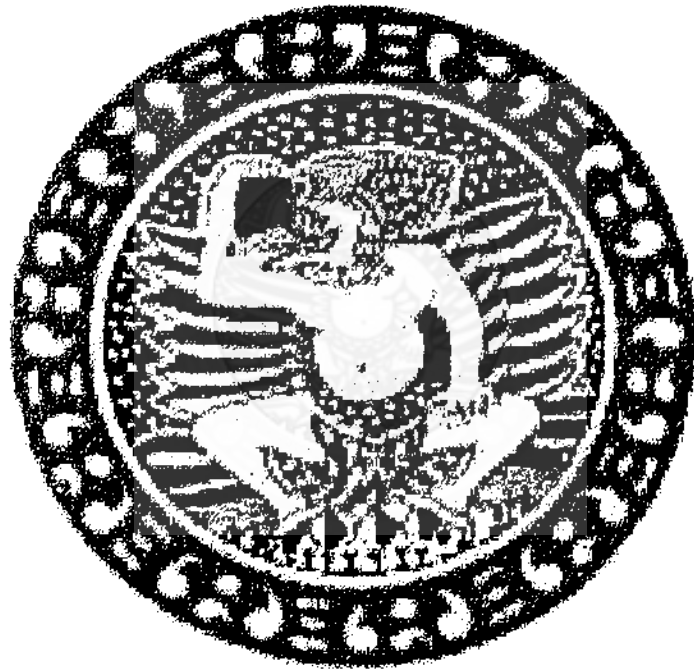
Tujuan khusus:

1. Untuk membuktikan bahwa terdapat pengaruh konsentrasi *crude protein fimbriae* EHEC O157 yang disalutkan pada enterosit kelinci secara *invitro* terhadap indeks adhesi bakteri tersebut.
2. Untuk membuktikan bahwa terdapat pengaruh konsentrasi *crude LPS* EHEC O157 yang disalutkan pada enterosit kelinci secara *invitro* terhadap indeks adhesi bakteri tersebut.

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan mampu menyumbangkan pengetahuan tentang:

- a) Mekanisme kolonisasi EHEC O157 pada traktus intestinal yang diawali oleh proses perlekatan pada sel epitel usus. Pengetahuan tentang mekanisme kolonisasi tersebut penting untuk strategi terapi dan prevensi infeksi oleh bakteri EHEC O157.
- b) Kemungkinan pengembangan vaksin untuk menghambat perlekatan EHEC O157 yang berasal dari komponen protein adhesin *fimbriae* dan LPS bakteri tersebut.
- c) Pengembangan prosedur diagnostik EHEC O157 yang menggunakan komponen protein adhesin *fimbriae* dan LPS bakteri tersebut.

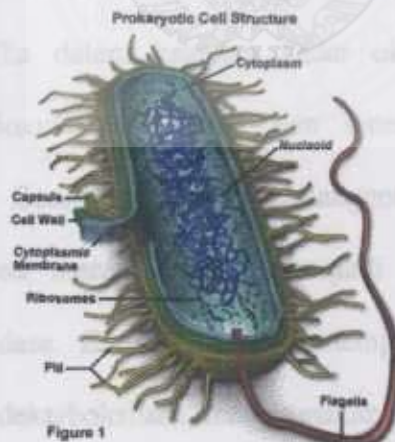


BAB 2

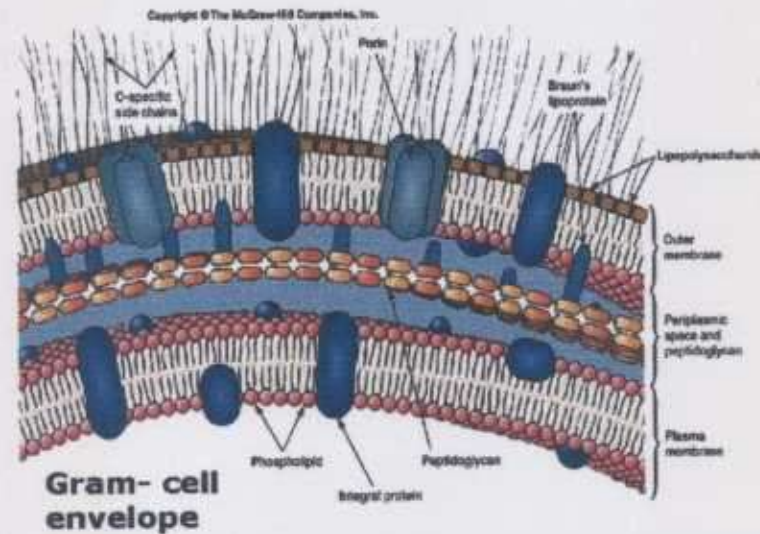
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karakteristik umum *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) O157

Enterohemorrhagic E.coli (EHEC) tergolong famili *enterobacteriaceae*, mempunyai karakteristik umum yang sama dengan anggota famili *enterobacteriaceae* yang lain. Kuman ini berukuran antara 0,5 – 3,0 μm , berbentuk batang Gram negatif, tidak membentuk spora, bergerak dengan *peritrichous flagella*. Selain itu kuman ini mempunyai *fimbriae* yang berguna dalam proses perlekatan antara kuman dengan kuman yang lain, dengan sel hos ataupun dengan bakteriofaga. Dinding selnya tersusun dari murein, lipoprotein, fosfolipid, protein dan lipopolisakarida (Joklik *et al.*, 1988).



Gambar 2.1 Struktur sel bakteri (Davidson, 1995).



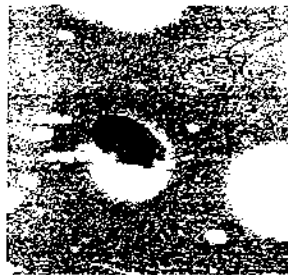
Gambar 2.2 Struktur dinding sel bakteri Gram negatif (Chisholm et al., 2002).

Famili *enterobacteriaceae* merupakan organisme fakultatif anaerob. Dalam keadaan anaerob atau kadar oksigen yang rendah, bakteri ini memfermentasi karbohidrat, tetapi jika dalam keadaan kadar oksigen yang cukup, bakteri menggunakan *tricarboxylic acid cycle* dan sistem transpor elektron untuk menghasilkan energi. Secara umum semua anggota famili *enterobacteriaceae* memfermentasi glukosa, mereduksi nitrat menjadi nitrit, dan tidak mempunyai enzim sitokrom oksidase. *Escherichia coli* mempunyai karakteristik biokimia berupa produksi lisin dekarboksilase, menggunakan asetat sebagai sumber karbon, dan menghidrolisis triptofan menjadi indol (Joklik et al., 1988).

Terdapat beberapa karakteristik biokimia dari *E. coli* O157 yang digunakan dalam isolasi dan identifikasi serotipe tersebut. Karakteristik penting dari serotipe O157 adalah tidak memfermentasi D-sorbitol dengan cepat, berbeda dengan 75 hingga 94% strain *E. coli* yang lain. *Escherichia coli* O157 juga tidak memfermentasi rhamnose pada lempeng agar, dimana 60% *E. coli* yang tidak

memfermentasi sorbitol dapat memfermentasi rhamnose. Karakteristik lain dari *E. coli* O157 yang membedakan dengan serotipe *E. coli* yang lain adalah ketidakmampuannya menghasilkan beta glukoronidase, yang menghidrolisis 4 *methyl-umbelliferyl-D-glucoronide* (MUG) dan bahan-bahan sejenisnya. *Escherichia coli* O157 juga tidak dapat tumbuh dengan baik pada suhu 44-45,5°C, suatu rentang temperatur dimana *E. coli* dari sampel makanan dan air dapat tumbuh (Nataro and Kaper, 1998).

Serotipe dari *E. coli* terutama berdasarkan pada penentuan tipe antigen O, antigen H, dan antigen K. Terdapat lebih dari 150 antigen O, 90 antigen K, dan 50 antigen H yang dimiliki oleh *E. coli*. Penentuan profil antigenik dari berbagai strain berguna dalam studi epidemiologis, dan terdapat beberapa penelitian yang menghubungkan tipe antigen tertentu dengan berbagai jenis diare. Sebagai contoh serotipe O157 terbukti menghasilkan *verotoxin* yang menyebabkan *hemorrhagic colitis* (HC), dan O78:H11 serta O78:H12 terbukti merupakan *Enterotoxigenic E. coli*. Tipe antigenik lain seperti O111a,111b:H2 berhubungan dengan diare pada bayi baru lahir, sementara O124:H30 merupakan *Enteroinvasive E. coli* dan menyebabkan disentri basiler seperti *Shigella* (Joklik et al., 1988).



Gambar 2.3 Bakteri *E. coli* O157 dilihat dengan *transmission electron micrograph* (Todar, 2002).

Enterohemorrhagic E.coli O157 disebut juga sebagai *verotoxigenic E.coli* atau *Vero cytotoxin-producing E.coli*. Istilah ini berasal dari pengamatan Konowalchuk,1977 bahwa ternyata strain ini menghasilkan toksin *Shiga toxin* (Stx) 1 dan Stx2 yang bersifat sitotoksik terhadap *Vero cells*. Nama lainnya adalah *Shiga toxin-producing E.coli* (STEC) yang menunjukkan bahwa satu dari dua toksin yang dihasilkan yaitu Stx1 memiliki kemiripan secara genetik maupun kandungan asam amino dengan *shiga toxin* yang dihasilkan oleh *Shigella dysenteriae type 1* (Kaper and O'Brien,1998).

2.2 Faktor Virulensi EHEC O157

2.2.1 *Shiga toxin*

Faktor virulensi utama dari EHEC O157 adalah *Shiga toxin* (Stx). Sitotoksin ini merupakan faktor penyebab kematian dan berbagai gejala lain pada penderita yang terinfeksi EHEC O157 (Nataro and Kaper, 1998).

Shiga toxin (Stx) mengandung dua komponen utama, yang secara imunologis tidak bereaksi silang, yaitu Stx1 dan Stx2 yang dikode secara kromosomal melalui bakteriofaga (Paton and Paton, 1998). Satu strain EHEC dapat mengekspresikan Stx1 saja, Stx2 saja, atau keduanya atau bahkan bentuk multipel dari Stx2. *Shiga toxin*1 dari EHEC identik dengan *Shiga toxin* dari *S. dysenteriae* 1 (Nataro and Kaper, 1998). Hasil penelitian Fukushima *et al.*, (2000) menunjukkan bahwa 64% EHEC O157 mengekspresikan Stx1 dan Stx2. Prototipe Stx1 dan Stx2 memiliki kemiripan sekuens 55 dan 57% pada subunit A dan B. Jika Stx1 tidak bervariasi, berbeda halnya dengan Stx2 yang memiliki variasi sekuens. Variasi yang berbeda

tersebut dilambangkan dengan Stx2c, Stx2v, Stx2vhb, Stx2e dan seterusnya (Kaper and O'Brien, 1998).

Struktur dasar subunit A-B sama untuk semua *Shiga toxin*. Subunit A merupakan protein dengan berat molekul 32 kDa yang dapat dipecah menjadi subunit A1 28 kDa dan subunit A2 4 kDa. Subunit A1 berperan dalam aktivitas enzimatis dan subunit A2 berperan dalam membentuk ikatan dengan pentamer subunit B yang identik dengan bobot molekul masing-masing 7,7 kDa. Subunit B berperan dalam membentuk ikatan antara toksin dengan reseptor glikolipid spesifik, *globotriaosylceramide* atau Gb3, yang terdapat di permukaan sel eukaryota (Kaper and O'Brien, 1998).

Setelah ikatan terbentuk, holotoksin (70 kDa) mengalami endositosis dan diangkut menuju *Golgi apparatus* selanjutnya ke *endoplasmic reticulum*. Kemudian subunit A diangkut ke sitoplasma, bekerja pada ribosom subunit 60S. Secara khusus subunit A1 yang mengandung *N-glycosidase* menghilangkan satu basa nukleotida adenin dari rRNA 28S ribosom eukaryota sehingga menghambat sintesis protein akibatnya terjadi kematian sel epitel intestinal, sel Vero dan HeLa ataupun sel lain yang mempunyai reseptor Gb3 (Nataro and Kaper, 1998). Karena STEC tidak mampu mengadakan invasi sel epitel, maka timbulnya gejala sistemik disebabkan oleh translokasi Stx ke jaringan yang lebih dalam dan masuk ke dalam sirkulasi darah (Paton and Paton, 1998). Bukti-bukti menunjukkan bahwa *human microvascular endothelial cells* termasuk endothel glomerulus sensitif terhadap Stx, akibatnya terjadi kematian sel endothel glomerulus di ginjal (Kaper and O'Brien, 1998).

2.2.2 Enterohemolisin

Plasmid 60 MDa yang secara umum ditemukan dalam EHEC O157 mengandung gen yang mengkode hemolisin (*ehxA*) yang kemudian disebut sebagai enterohemolisin. Peranan enterohemolisin dalam patogenesis penyakit masih berupa dugaan. Eritrosit yang lisis secara *invivo* akan melepaskan heme dan hemoglobin yang memacu pertumbuhan dan merupakan sumber zat besi bagi *E. coli* O157 (Nataro and Kaper, 1998).

2.2.3 Faktor perlekatan

Tahap pertama dari infeksi mikroba adalah kolonisasi, yaitu menetapnya bakteri patogen pada tempat masuk yang sesuai. Bakteri patogen biasanya berkolonisasi pada jaringan hos yang berhubungan dengan lingkungan eksternal, seperti traktus gastrointestinal, traktus respiratorius, konjungtiva, dan traktus urogenital. Organisme yang menginfeksi tempat ini biasanya mempunyai mekanisme perlekatan pada jaringan dan kemampuan untuk bertahan dari sistem pertahanan tubuh hos di permukaan mukosa (Todar, 2002).

Perlekatan bakteri pada sel eukaryota atau pada permukaan jaringan membutuhkan peranan dari 2 faktor, yaitu reseptor dan adhesin. Sejauh ini diketahui bahwa biasanya reseptor berupa residu peptida dan karbohidrat spesifik pada permukaan sel eukaryota. Sedangkan adhesin bakteri adalah komponen makromolekul pada permukaan sel bakteri yang berinteraksi dengan reseptor sel hos seperti *fimbriae*, *outer membrane protein*, dan lipopolisakarida. Adhesin dan reseptor biasanya berinteraksi secara spesifik (Todar, 2002 ; Ryley, 2000).

Mekanisme perlekatan bakteri pada permukaan sel atau jaringan terdiri dari 2 tahap, yaitu :

1. Perlekatan nonspesifik

Perlekatan ini merupakan perlekatan bakteri pada permukaan sel eukaryotik yang bersifat reversibel. Kadang-kadang disebut dengan *locking*. Perlekatan non spesifik ini dapat terjadi oleh karena berbagai gaya atau interaksi seperti: interaksi hidrofobik, gaya elektrostatik, getaran atom atau molekul, dan gerak Brown.

2. Perlekatan spesifik.

Perlekatan spesifik merupakan perlekatan bakteri pada permukaan sel atau jaringan yang bersifat ireversibel. Kadangkala disebut dengan *anchoring*. Perlekatan ini dapat terjadi oleh karena adanya ikatan spesifik antara molekul reseptor dengan molekul adhesin. Beberapa penelitian membuktikan bahwa molekul reseptor dan atau molekul adhesin berperan dalam spesifisitas perlekatan bakteri pada sel atau jaringan hos. Hasil penelitian tersebut diantaranya :

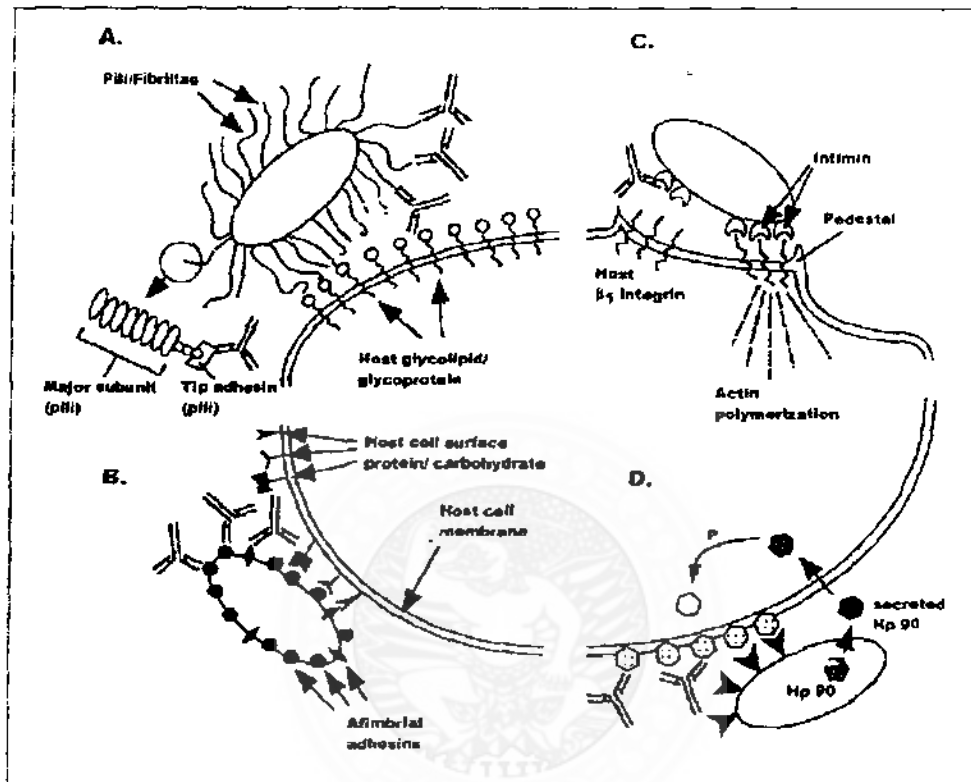
- (a) Bakteri berikatan dengan reseptor atau analog dari reseptor yang telah diisolasi.
- (b) Adhesin atau analog dari adhesin yang telah diisolasi akan berikatan dengan permukaan sel eukaryota.

(c) Perlekatan bakteri pada permukaan sel eukaryota dihambat oleh:

- Molekul adhesin atau reseptor yang telah diisolasi
- Analog dari adhesin atau reseptor
- Enzim dan bahan kimia yang merusak adhesin atau reseptor secara spesifik

- Antibodi yang spesifik pada komponen permukaan (seperti adhesin atau reseptor).

(Todar, 2002).



Gambar 2.4 Mekanisme perlekatan bakteri dimana vaksin anti-adhesin potensial untuk menghambat kolonisasi dan infeksi (Wizemann et al., 1999).

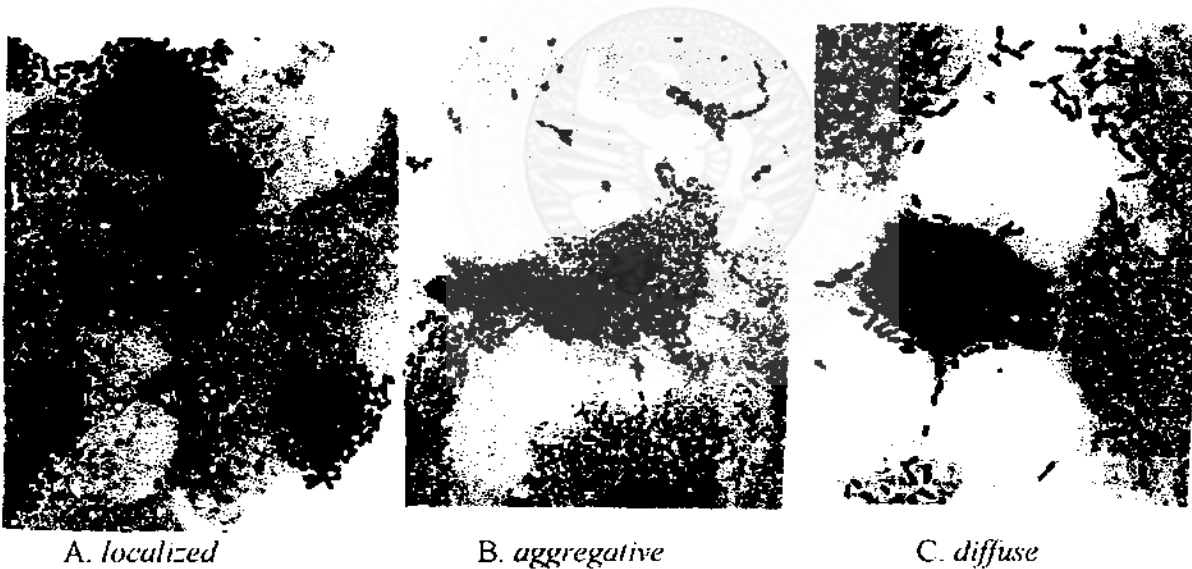
Pada kebanyakan bakteri Gram negatif, faktor perlekatan diperankan oleh suatu protein yang mampu mengaglutinasi eritrosit mamalia yang disebut protein hemaglutinin, misalnya protein adhesin *Klebsiella pneumoniae* diperankan oleh protein hemaglutinin 29 kDa (Martino et al., 1995), adhesin *Vibrio parahaemolyticus* diperankan oleh hemaglutinin 26 kDa (Nagayama et al., 1995), adhesin *Anaplasma marginale* diperankan oleh hemaglutinin 38 kDa (Mcgarrey and Alfred., 1994), dan adhesin *Salmonella typhi* diperankan oleh hemaglutinin 36 kDa

(Sanarto dkk., 1999). Ada kalanya proses adhesi ini diperankan oleh lebih dari satu protein adhesin, misalnya pada *Helicobacter pylori* yang diperankan oleh protein hemagglutinin dengan berat molekul 20 kDa dan 32 kDa (Winarsih dkk., 1997).

Untuk membuktikan bahwa suatu protein merupakan protein adhesin dilakukan uji adhesi. Protein yang diduga sebagai protein adhesin disalutkan pada sel hos dengan konsentrasi yang semakin meningkat. Penyalutan protein ini dimaksudkan untuk menjenuhi reseptor yang terlibat pada proses perlekatan. Dari uji adhesi diperoleh nilai indeks adhesi yaitu banyaknya bakteri yang menempel pada sel hos dihitung sampai seratus sel dan dibuat reratanya. Pada uji adhesi protein hemagglutinin *fimbriae* 36 kDa (HA-F36) dan protein hemagglutinin OMP 36 kDa (HA-O36) dari bakteri *Salmonella typhi* diperoleh hasil adanya penurunan yang nyata dari jumlah bakteri yang melekat pada sel enterosit dengan makin meningkatnya dosis protein HA-F36 dan HA-O36 (Sanarto, 2002). Sedangkan pada uji adhesi protein hemagglutinin *fimbriae* 50,3 kDa dari bakteri *Vibrio cholerae* O1 M094V diperoleh hasil adanya hubungan antara indeks adhesi dengan berbagai dosis protein hemagglutinin *fimbriae* 50,3 kDa adalah menurun secara eksponensial dengan semakin meningkatnya dosis. Berdasarkan konsep mekanisme adhesi, fakta empirik ini mendukung hipotesis bahwa protein hemagglutinin *fimbriae* 50,3 kDa merupakan molekul adhesi (Sumarno, 2000).

Strain *E. coli* secara in vitro pada sel epitel seperti halnya HeLa atau Hep-2 dapat menunjukkan tiga pola adhesi yang karakteristik ialah, (1) tipe *localized* (LA), mikrokoloni terbentuk pada satu atau beberapa tempat tertentu pada permukaan sel. Sifat ini tampaknya diperankan oleh *bundle forming pilus* (BFP).

Strain ini kemudian dikenal sebagai *localized-adhering E. coli* (LAEC). (2) Tipe *diffuse* (DA), bakteri tampak menyelimuti permukaan sel. Ada 2 adhesin yang dapat diidentifikasi pada strain ini ialah *a plasmid – encoded outer membrane protein* (100 kDa), disebut *afimbrial adhesin* (AFA) yang terlibat pada adhesi *diffuse*, dan *a chromosomally encoded fimbrial adhesin*, F1845 yang merupakan anggota dari adhesin *Dr family*. Strain ini disebut *diffuse-adhering E. coli* (DAEC). (3) Tipe *aggregative* (AggA), bakteri tampak membuat bentukan seperti susunan batu bata pada permukaan sel. Ada 2 plasmid yang menyandi *fimbriae*, AAF/I dan AAF/II. Strain bakteri ini disebut *aggregative – adhering E. coli* (AAEC) (Hernandez et al., 1997 ; Gonzalez et al., 1997).



Gambar 2.5 Pola perlekatan *E. coli* pada sel Hep-2 (Nataro and Kaper, 1998).

Faktor perlekatan dari EHEC O157 yang dapat mendukung proses kolonisasi adalah :

a. *Intimin*

Satu-satunya faktor perlekatan potensial yang dimiliki EHEC O157 yang terbukti berperan pada kolonisasi intestinal secara *invivo* pada hewan coba adalah *intimin*, suatu *outer membrane protein* dengan berat molekul 94 – 97 kDa, yang dikode oleh gen *eae* (Nataro and Kaper, 1998). Dilihat secara histopatologi gen *eae* yang terdapat dalam bakteri tersebut menginduksi *attaching and effacing lesion* (lesi A/E) untuk selanjutnya berkolonisasi di *tractus digestivus* (Kaper and O'Brien, 1998).

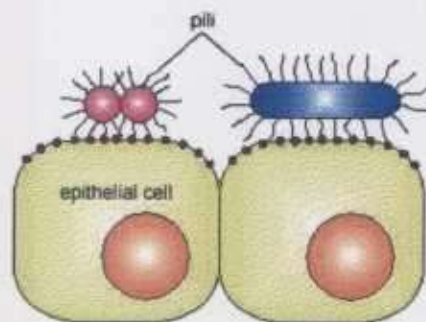
b. *Fimbriae*

Faktor perlekatan lain, sebagaimana dimiliki oleh bakteri enteropatogen, adalah *fimbriae* atau pili (Davis *et al.*, 1990). Sebenarnya istilah *fimbriae* merupakan istilah yang tepat untuk adhesin permukaan yang berbentuk batang, karena istilah pili ditujukan untuk struktur yang lebih panjang dan lebih fleksibel yang digunakan untuk konjugasi bakteri. Namun perbedaan istilah tersebut sering diabaikan (Salyers and Whitt, 1994).

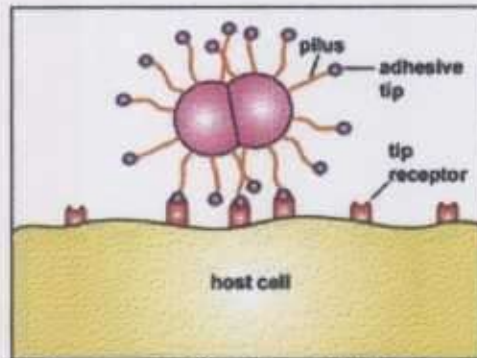
Fimbriae berbentuk batang kaku, pendek, dan lebih halus dari flagella, tersusun dari *single, highly hydrophobic protein* yaitu pilin yang membantu proses perlekatan bakteri (berat molekul 17000-25000 dalton) (Davis *et al.*, 1990). Protein pilin (fimbrin) dikemas dalam bentuk heliks membentuk struktur silindris yang panjang. Ujung dari *fimbriae* (*adhesive tip*) membantu perlekatan bakteri dengan

cara melekat pada molekul reseptor di permukaan sel hos (Salyers and Whitt, 1994).

Reseptor *fimbriae* pada sel hos secara umum berupa residu karbohidrat dari glikoprotein atau glikolipid. Ikatan antara *fimbriae* dengan sel hos yang menjadi target perlekatannya sangat spesifik. Spesifisitas ini penting karena dengan adanya reseptor yang sesuai akan menentukan bagian tubuh yang terinfeksi oleh bakteri. Pada beberapa kasus, ikatan spesifik antara ujung *fimbriae* dengan karbohidrat sel hos dibantu oleh struktur khusus pada ujung *fimbriae* yang terdiri dari beberapa protein yang berbeda dengan pilin. Pada kasus yang lain ikatan tersebut diperankan oleh pilin itu sendiri. Tidak mudah untuk menentukan apakah suatu *fimbriae* mempunyai struktur khusus pada ujungnya karena lebih dari 99% protein penyusun *fimbriae* adalah pilin. Sehingga protein minor yang menyusun struktur khusus di ujung *fimbriae* tidak terdeteksi pada saat analisa biokimia terhadap komposisi *fimbriae* (Salyers and Whitt, 1994).



Gambar 2.6 Perlekatan bakteri menggunakan *fimbriae* (pili) (Kaiser, 1998).



Gambar 2.7 *Adhesive tip* dari *fimbriae* (pili) bakteri berikatan dengan reseptor sel hos (Kaiser, 1998).

Pembentukan *fimbriae* oleh bakteri merupakan proses kompleks yang membutuhkan peranan dari sejumlah protein. Tahap pertama adalah sekresi pilin dan protein khusus pada ujung *fimbriae* melintasi *inner membrane* menuju ke *periplasmic space*. Di periplasma suatu protein khusus yang disebut *chaperon* membawa pilin menuju kompleks *outer membrane protein* tempat dimana pembentukan struktur pilin dimulai. Struktur perlekatan di ujung *fimbriae* terbentuk dan memanjang terlebih dahulu, kemudian batang *fimbriae* terbentuk oleh adanya subunit pilin di dasar *fimbriae* yang mendorong bagian yang telah terbentuk ke luar dari permukaan sel bakteri. Tahap akhir adalah protein periplasma yang memberikan kode bahwa proses pemanjangan *fimbriae* telah berakhir dan menstabilkan *fimbriae* yang telah terbentuk di dinding sel (Salyers and Whitt, 1994).

Sepanjang pertumbuhan bakteri, terjadi pelepasan dan pembentukan *fimbriae* secara teratur. Pembentukan *fimbriae* baru yang kontinu terjadi karena fragilitas *fimbriae*, yang mudah patah dan terlepas. Penggantian *fimbriae* tersebut

penting, paling tidak untuk beberapa bakteri, karena memudahkan bakteri untuk melepaskan diri dari sistem pertahanan tubuh hos.

Mengapa bakteri menggunakan *fimbriae* yang fragil ini untuk melekat? Jawabannya masih belum jelas. Satu hipotesis adalah karena baik permukaan bakteri maupun sel hos sama-sama bermuatan negatif, dengan adanya *fimbriae* memungkinkan bakteri untuk berikatan dengan sel hos tanpa harus berada cukup dekat mengingat adanya gaya tolak menolak yang mencegah perlekatan keduanya. Namun hal ini bukan merupakan satu-satunya penjelasan karena bakteri mampu mengadakan ikatan yang lebih erat dengan permukaan sel hos sehingga terjadi kontak antara permukaan sel bakteri dengan permukaan sel hos (Salyers and Whitt, 1994).

Kebanyakan bakteri patogen menggunakan dua tahap proses perlekatan, pertama menggunakan *fimbriae* dalam bentuk ikatan yang longgar (*docking*) diikuti dengan ikatan yang lebih kuat (*anchoring*) menggunakan *outer membrane protein* (Salyers and Whitt, 1994). Pada proses perlekatan bakteri *Enteropathogenic E. coli* (EPEC) pada mukosa usus, juga terdiri dari 2 proses. Proses pertama diperankan oleh *fimbriae* dan proses kedua diperankan oleh *intimin*. Jika proses pertama tidak terjadi maka proses perlekatan selanjutnya yang diperankan oleh *intimin* bersifat terbatas (Krejany *et al.*, 2000).

c. Lipopolisakarida (LPS)

Selain *fimbriae*, faktor perlekatan yang sering dimiliki oleh bakteri enteropatogen adalah LPS (Paton and Paton, 1998). Lipopolisakarida merupakan

bagian dari *outer membrane* dinding sel bakteri Gram negatif yang terdiri dari 3 komponen, yaitu:

Lipid A

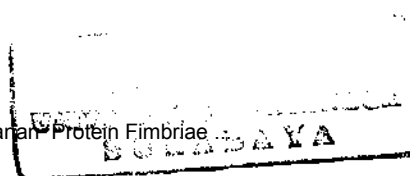
Lipid A adalah komponen lipid dari LPS. Komponen ini mengandung molekul hidrofobik, merupakan bagian dari LPS yang melekat pada *outer membrane*. *Lipid A* terdiri dari dimer *phosphorylated N-acetylglucosamine* (NAG) yang dilekati oleh 6 atau 7 asam lemak jenuh. Di antara asam lemak tersebut ada yang melekat langsung pada dimer NAG, ada pula yang teresterifikasi menjadi *3-hydroxy fatty acid*.

Core (R) antigen atau R polysaccharide

Komponen ini melekat di enam tempat dari satu NAG. Antigen R terdiri dari gula rantai pendek, sebagai contoh: KDO – Hep – Hep – Glu – Gal – Glu – GluNAc-. Dua jenis gula yang biasanya dijumpai adalah heptose dan 2-keto-3-deoxyoctonic acid (KDO) pada inti polisakarida. Gula KDO bersifat unik dan selalu dijumpai pada LPS sehingga merupakan indikator untuk menguji keberadaan LPS (endotoksin).

Somatic (O) antigen atau O polysaccharide

Komponen ini melekat pada *core polysaccharide*. Terdiri dari ulangan subunit oligosakarida yang tersusun dari 3-5 monosakarida. Panjang rantai bervariasi hingga 40 unit ulangan. *O polysaccharide* jauh lebih panjang dari *core polysaccharide* dan mempertahankan kandungan hidrofilik dari molekul LPS. Penentu antigenik utama dari dinding sel bakteri Gram negatif terletak dalam *O polysaccharide*.



Jenis gula tertentu khususnya pada bagian terminal dari *O polysaccharide* menentukan spesifisitas imunologi dari *O antigen* dan morfologi koloni yang halus dari suatu strain. Hilangnya *O antigen* menyebabkan hilangnya virulensi bakteri, diduga komponen ini merupakan komponen yang penting dalam interaksi antara hos dan parasit. Beberapa kemungkinan yang menunjang dugaan tersebut adalah bahwa *O antigen* :

- (a) Memungkinkan organisme melekat secara spesifik pada jaringan tertentu, khususnya jaringan epitel
- (b) Menyebabkan resistensi bakteri terhadap fagositosis
- (c) Bersifat hidrofilik dan dapat berperan sebagai pembawa *lipid A* yang toksik
- (d) Melindungi bakteri dari antibodi dan komplemen

(Todar, 2002).

Berdasarkan bukti penelitian bahwa LPS yang telah diisolasi dapat menghambat adhesi bakteri, timbul dugaan LPS dari bakteri Gram negatif berpartisipasi dalam proses adhesi mikroorganisme pada fagosit nonprofesional termasuk sel mukosa (Jacques, 1996 ; Abraham et al., 1999). Sebagai reseptor dari LPS adalah lektin yang diekspresikan di permukaan sel epitel mamalia (Ofek et al., 1995).

Strain *Shiga toxinogenic Escherichia coli* serotipe O157 penting sebagai bakteri patogen pada manusia, tetapi dasar genetik ekspresi antigen O157 dan peranan *O side chain* dari LPS dalam perlekatan bakteri pada sel epitel belum diketahui (Bilge et al., 1996).

2.3 Patogenesis *Hemorrhagic Colitis* dan *Hemolytic Uremic Syndrome*

Enterohemorrhagic E. coli O157 yang termasuk dalam *Shiga toxin-producing Escherichia coli* (STEC) merupakan penyebab dari kasus-kasus sporadik maupun wabah dari *hemorrhagic colitis* dan *hemolytic uremic syndrome* terutama pada anak-anak. Patogenesisnya terdiri dari beberapa tahapan yang tergantung pada interaksi antara kuman dengan faktor hos (Paton and Paton, 1998).

Setelah masuk ke dalam tubuh secara per oral, STEC melampaui barier asam lambung dan selanjutnya berkompetisi dengan mikroorganisma dalam usus. Apabila kuman dapat melampaui sistem kekebalan tubuh alami tersebut, maka kuman mengadakan perlekatan pada sel epitel usus dan berkolonisasi. Tipe perlekatan STEC adalah *attaching and effacing lesion* (lesi A/E) yang ditandai dengan kerusakan membran mikrovili sel epitel usus sehingga terjadi kontak yang erat antara kuman yang menginfeksi dengan membran plasma sel hos. Pada bagian membran plasma sel yang dilekati oleh kuman, terdapat akumulasi *polymerized actin* sehingga kuman melekat pada struktur permukaan sel yang mirip dengan pelana kuda (Kaper and O'Brien, 1998).

Hilangnya mikrovili di permukaan sel epitel usus menyebabkan peningkatan kadar Ca^{2+} intraseluler, yang secara langsung menyebabkan malabsorpsi dan mendorong keluarnya ion dan air dari dalam sel ke lumen usus. Selain itu peningkatan kadar Ca^{2+} intraseluler dan molekul *second messenger* yang lain dapat menstimulasi sekresi Cl^- dalam usus dan menghambat absorpsi Na^+ dan Cl^- , sehingga terjadi diare (Kaper and O'Brien, 1998).

Selain itu terdapat berbagai macam data yang menunjukkan keterlibatan Stx pada terjadinya diare dan *enterocolitis*, diawali dengan pembuktian awal bahwa Stx murni dapat menyebabkan akumulasi cairan dan kerusakan jaringan jika disuntikkan dalam usus yang diligasi. Mekanisme yang mungkin menyebabkan sekresi cairan tersebut adalah Stx yang merusak vili-vili epitel usus (Nataro and Kaper, 1998).

Shiga toxin-producing E.coli (STEC) tidak mampu mengadakan invasi pada sel epitel usus. Komplikasi sistemik seperti *hemolytic uremic syndrome* (HUS) dapat terjadi akibat translokasi *Shiga toxin* yang diproduksi oleh kuman yang berkolonisasi di usus, ke jaringan sekitar dan peredaran darah. Setelah melampaui barier epitel dan masuk ke peredaran darah, *Shiga toxin* bergerak menuju jaringan yang mengekspresikan glikolipid *globotriaocylceramide* (Gb3) yang merupakan reseptornya (Paton and Paton, 1998). Jaringan tubuh manusia yang mengekspresikan reseptor Gb3 dalam jumlah besar adalah glomerulus ginjal. *Shiga toxin* diyakini merusak sel endothel glomerulus sehingga terjadi penyempitan lumen kapiler dan *glomerular microvasculature occlusion* oleh platelet dan fibrin. Selanjutnya terjadi penurunan laju filtrasi glomerulus yang menyebabkan gagal ginjal akut. Akibat *microvasculature occlusion* juga menyebabkan sel darah merah rusak/hancur menjadi sel yang terfragmentasi. (Nataro and Kaper, 1998). Perlekatan trombosit pada endothel glomerulus yang rusak akan meningkatkan agregasi trombosit dan menurunkan jumlah hitung trombosit (trombositopenia) (Kaper and O'Brien, 1998).

2.4 Manifestasi Klinis Infeksi EHEC O157

Masa inkubasi diare yang disebabkan oleh *strain* EHEC ini biasanya berkisar 3-4 hari. Gejala awal yang timbul biasanya diare tanpa disertai darah meskipun disertai nyeri abdomen dan demam. Dalam 1-2 hari berikutnya, diare disertai darah (sehingga disebut *hemorrhagic colitis*) dan penderita mengalami peningkatan nyeri abdomen. Gejala ini dapat terjadi antara 4-10 hari. Pada sebagian besar penderita, diare yang disertai darah ini akan sembuh total, namun sekitar 10% dari penderita dengan usia di bawah 10 tahun, penyakit ini berkembang menjadi *hemolytic uremic syndrome (HUS)* (Nataro and Kaper, 1998).

Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) ditandai oleh trias: anemia hemolitik, trombositopenia dan gagal ginjal; gejala klinis awal berupa oliguri atau anuri, edema, demam dan kadang disertai kejang (Nataro and Kaper, 1998).

2.5 Diagnosis Laboratorium Infeksi EHEC O157

Metode yang digunakan untuk diagnosis infeksi EHEC meliputi 3 kategori, yaitu (i) isolasi EHEC O157 dari tinja (ii) deteksi bakteri yang menghasilkan Stx atau tinja yang mengandung Stx, dan (iii) deteksi peningkatan kadar antibodi terhadap O157 LPS atau antigen EHEC lain dalam serum (Nataro and Kaper, 1998).

Keberhasilan mengisolasi EHEC O157 dari tinja tergantung pada perbenihannya di awal perjalanan penyakit. Sayangnya banyak penderita tidak memeriksakan dirinya secara intensif sampai mereka mengalami gejala HUS, yang biasanya mulai tampak beberapa hari setelah timbulnya diare. Pada saat gejala HUS tampak, dua per tiga dari penderita tidak lagi membawa bakteri EHEC O157

di dalam tinjanya. Sedangkan sepertiga penderita lain masih membawa organisme tersebut dalam tinjanya dalam waktu berminggu-minggu atau berbulan-bulan setelah infeksi, oleh karena itu perlu dilakukan perbenihan ulang dalam jangka waktu lama untuk satu penderita (Nataro and Kaper, 1998).

Medium agar yang paling umum digunakan untuk isolasi EHEC O157 adalah SMAC agar yang banyak tersedia di pasaran. Medium ini mengandung 1% sorbitol menggantikan laktosa pada medium *MacConkey*. Koloni yang tidak memfermentasi sorbitol, menunjukkan koloni EHEC O157, merupakan koloni yang tidak berwarna pada medium tersebut (Nataro and Kaper, 1998).

Deteksi bakteri yang menghasilkan Stx (selain O157) atau tinja yang mengandung Stx pada umumnya lebih mahal daripada metode kultur untuk mendeteksi strain O157. Selain itu metode ini mempunyai kesulitan karena ketidakstabilan phage yang membawa gen *stx*. Karch *et al.*, (1992) menguji stabilitas gen *stx* dari 45 strain yang mengandung gen *stx* pada isolasi awal. Setelah dilakukan pasase pada *Trypticase soy agar*, 15 dari 45 strain kehilangan gen *stx1* dan *stx2*.

Deteksi antibodi serum bukan merupakan deteksi yang biasa digunakan untuk diagnosis infeksi yang disebabkan oleh strain *diarrheagenic E. coli* yang lain, tetapi tehnik serodiagnostik dapat menyajikan informasi diagnostik yang berharga untuk infeksi EHEC, terutama karena banyak kasus HUS tidak terdeteksi hingga tidak lagi ditemukan organisme di dalam feses penderita. Antigen yang paling banyak diteliti untuk pendekatan serodiagnostik tersebut adalah LPS. Chart *et al.*, (1991) membuktikan dalam satu penelitiannya bahwa dari 60 penderita

HUS, Stx atau strain *E. coli* penghasil Stx dapat dideteksi hanya dari 23% tinja penderita, sedangkan 73% penderita menunjukkan respon IgM terhadap O157 LPS. Dalam situasi epidemik, *immunoassay* berdasarkan respon IgG terhadap LPS mempunyai sensitivitas dan spesifisitas lebih dari 90% untuk penderita yang terbukti positif terinfeksi berdasarkan perbenihan bakteri (Nataro and Kaper, 1998). Uji yang sekarang banyak dikembangkan adalah ELISA, imunobloting, dan *indirect hemagglutination* (Chart *et al*, 1991). Antibodi terhadap antigen lain dari serotipe O157 yaitu antigen flagela H7 tidak terdeteksi pada penderita HUS (Nataro and Kaper, 1998).

2.6 Terapi Infeksi EHEC O157

Tujuan dari terapi penderita yang terinfeksi oleh *Shiga toxin-producing E.coli* adalah : (i) menurunkan tingkat beratnya dan lamanya gejala penyakit (ii) mencegah timbulnya komplikasi HUS (iii) mencegah transmisi lebih lanjut. Terapi yang diberikan antara lain : pemberian cairan (hidrasi) , antibiotika, dan antidiare (Kaper and O'Brien, 1998).

Antibiotika yang diberikan diharapkan dapat memenuhi tujuan terapi yaitu mengurangi gejala, mencegah komplikasi dan mencegah penularan. Antibiotika yang pernah diberikan kepada penderita di beberapa negara seperti Amerika Serikat, Kanada, Argentina, dan Jepang adalah tetrasiklin, trimetoprim-sulfametoksazol, ampicilin, kloramfenikol dan fosfomisin (Kaper and O'Brien, 1998).

Sedangkan antidiare yang diberikan adalah kaolin, attapulgit dan preparat bismuth. Bisa diberikan sendiri atau bersama dengan antimotilitas. Hanya saja

pemberian antimotilitas pada penderita diare masih diperdebatkan (Kaper and O'Brien, 1998).

2.7 Pencegahan Infeksi EHEC O157

Saat ini belum ditemukan terapi yang efektif untuk menanggulangi penyakit yang disebabkan oleh infeksi EHEC O157. Sehingga pencegahan infeksi menjadi fokus dari proyek kesehatan masyarakat menggunakan strategi yang bertujuan untuk menetapkan standar pemrosesan makanan, penyuluhan masyarakat tentang pengolahan dan cara memasak makanan, serta perbaikan sistem pengawasan (Butterton and Calderwood, 1998). Tindakan yang saat ini harus diutamakan untuk mencegah atau mengendalikan infeksi EHEC O157 adalah sebagai berikut:

- Memperbaiki manajemen rumah potong hewan untuk memperkecil kontaminasi daging oleh isi usus hewan
- Pasteurisasi susu dan produk makanan sehari-hari seperti sari buah apel dan jus buah lain.
- Pemanasan yang sempurna dengan temperatur internal 160°F, dalam hal ini dianjurkan penggunaan termometer daging. Daging yang dimasak dengan baik memberikan tekstur serat yang kasar dan berlapis, sedangkan daging yang masih mentah memiliki tekstur serat yang halus, empuk tanpa memperhatikan warna dagingnya.
- Klorinasi kolam renang dan menjaga kebersihannya
- Memastikan tingkat kebersihan anak yang baik di pusat penitipan anak
- Penarikan produk makanan yang palsu
- Penyinaran daging sapi, khususnya daging sapi cacah

(Hollingsworth and Kaplan, 1998).

Selain cara pencegahan tersebut di atas, saat ini mulai dikembangkan strategi baru untuk mencegah penyakit yang disebabkan oleh infeksi EHEC O157 dengan cara imunisasi melawan bakteri tersebut (Butterton and Calderwood, 1998). Terdapat berbagai cara strategi imunisasi yang mungkin digunakan untuk mengurangi angka kejadian dan atau akibat dari infeksi EHEC O157 pada manusia. Pilihan pertama adalah vaksinasi hewan reservoir untuk mengurangi kandungan EHEC O157 dalam tubuhnya dan memperkecil masuknya bakteri ke dalam rantai makanan manusia. Namun demikian, cara ini membutuhkan vaksinasi sejumlah besar hewan dan identifikasi faktor yang berperan dalam kolonisasi bakteri EHEC O157 di saluran pencernaan hewan reservoir. Pilihan lain adalah vaksinasi terhadap manusia dalam hal ini termasuk menghambat transmisi bakteri dan mencegah proses patogenik. Strategi tentang hal ini dijelaskan di bawah ini (Paton and Paton, 1998).

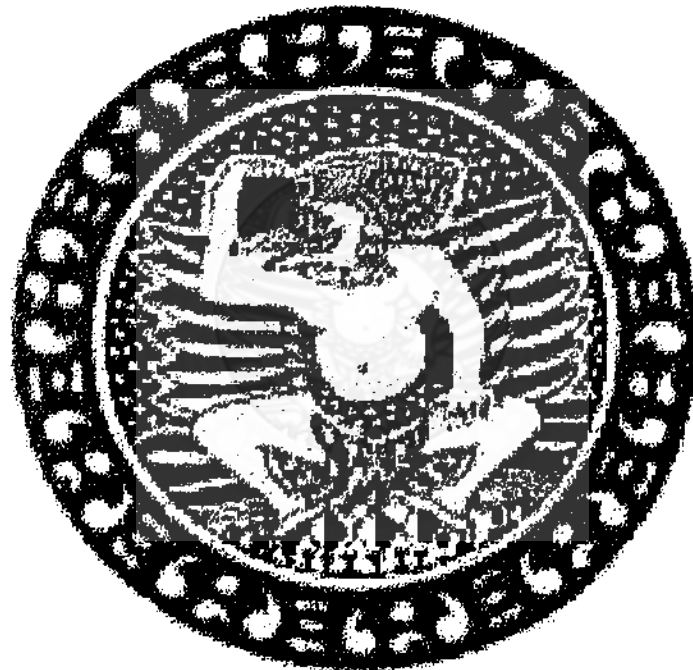
Vaksinasi Menggunakan *Shiga Toxin (Stx)*

Vaksinasi menggunakan *Shiga toxin* diperkirakan efektif untuk mencegah timbulnya HUS pada penderita yang terinfeksi EHEC O157 dan dapat juga mencegah timbulnya gejala gastrointestinal yang berat. Hal ini didukung oleh hasil penelitian tentang protektifitas dan efektivitas vaksin menggunakan *Shiga toxin (Stx) 2e* untuk melindungi babi dari penyakit edema (Paton and Paton, 1998). MacLeod and Gyles, 1991, menunjukkan bahwa imunisasi dengan Stx2e yang dibuat toxoid dengan penambahan glutaraldehida melindungi kelinci dari toxin murni yang disuntikkan intravena.

Vaksin untuk mencegah kolonisasi EHEC O157 pada mukosa usus

Vaksin berdasarkan Stx di atas diharapkan dapat mencegah komplikasi sistemik berupa HUS , namun tidak dapat mencegah kolonisasi EHEC O157 di mukosa usus. Vaksin yang langsung menghambat kolonisasi bakteri di usus diharapkan lebih efektif, namun saat ini pengetahuan tentang faktor kolonisasi bakteri masih belum lengkap. *Intimin* yang merupakan *outer membrane protein* dari EHEC O157 dapat menjadi target vaksinasi yang sesuai minimal bagi sebagian besar bakteri yang membentuknya.

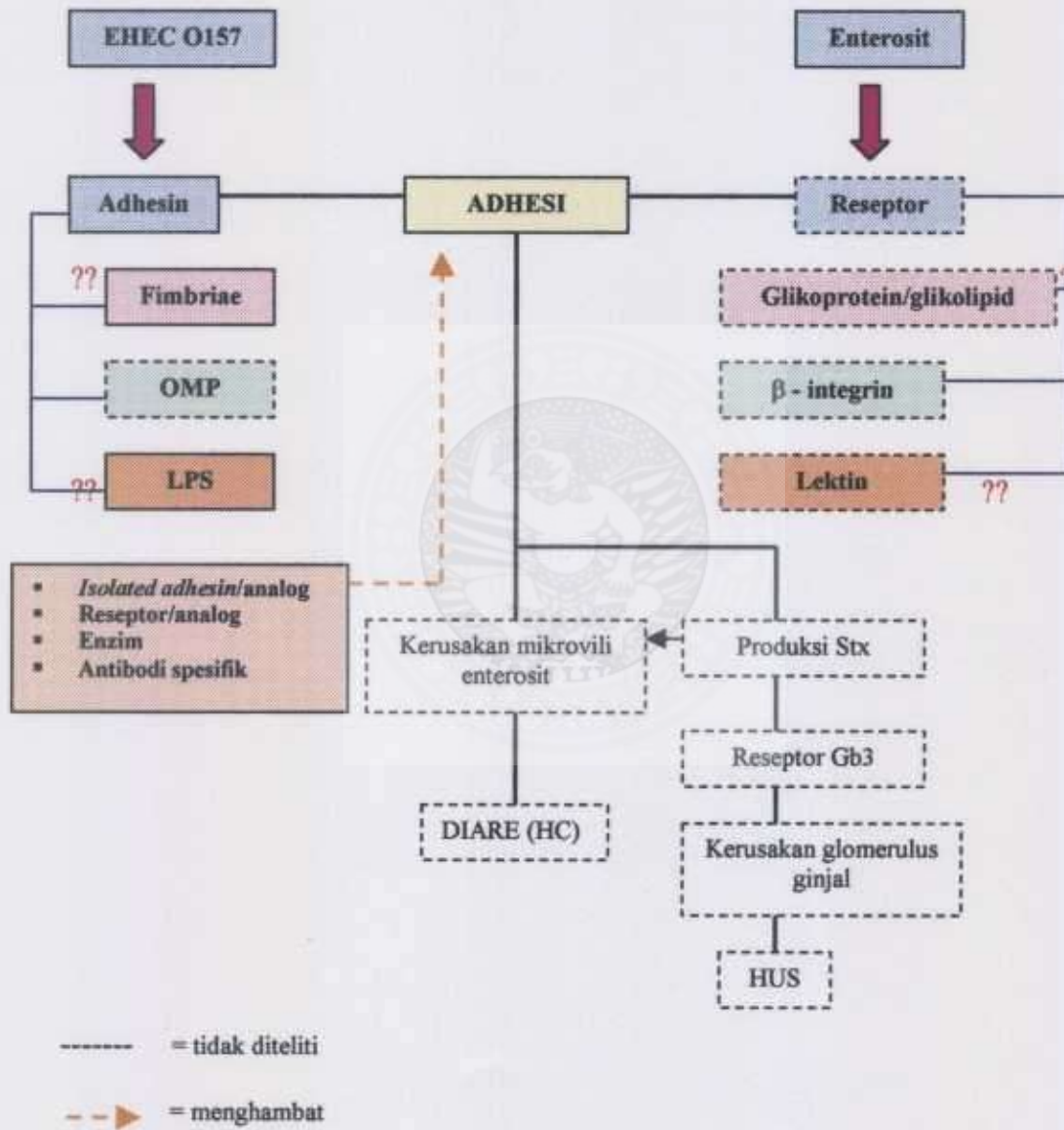
Vaksin LPS mungkin juga efektif melawan infeksi EHEC O157, karena berdasarkan penelitian pada bakteri patogen enterik yang lain IgG serum yang spesifik terhadap LPS nampaknya masuk ke dalam lumen usus dalam jumlah yang cukup untuk menghambat kolonisasi bakteri. Percobaan klinis fase satu terhadap O antigen O157 yang dikonjugasi dengan *protein carrier* (untuk meningkatkan imunogenisitas) menunjukkan bahwa vaksin tersebut aman dan imunogenik. Namun ditekankan bahwa vaksin LPS hanya bermanfaat untuk proteksi serotipe spesifik (Paton and Paton, 1998).



BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 KERANGKA KONSEPTUAL



Tahap awal dari infeksi mikroba adalah kolonisasi yaitu berkembangnya bakteri patogen pada tempat masuknya yang sesuai. Bakteri patogen biasanya berkolonisasi di jaringan hos yang terpapar dengan lingkungan eksternal. Tempat masuknya bakteri pada manusia antara lain traktus urogenital, traktus digestivus, traktus respiratorius dan konjungtiva. Organisme yang menginfeksi tempat-tempat tersebut biasanya mampu berkembang dengan mekanisme perlekatan jaringan dan beberapa kemampuannya untuk mengatasi mekanisme pertahanan hos di permukaan mukosa.

Dalam bentuk yang paling sederhana, perlekatan bakteri atau perlekatan pada sel eukaryota atau permukaan jaringan membutuhkan partisipasi dua faktor yaitu reseptor dan adhesin. Sejauh ini reseptor dinyatakan sebagai karbohidrat spesifik atau residu peptida pada permukaan sel eukaryota. Adhesin bakteri adalah komponen makromolekul dari permukaan sel bakteri yang berinteraksi dengan reseptor sel hos. Adhesin dan reseptor pada umumnya berinteraksi secara spesifik (Tedar, 2002).

Berdasarkan hasil penelitian terdapat tiga tipe utama interaksi adhesin – reseptor. Tipe yang pertama yang terjadi pada sebagian besar bakteri patogen adalah interaksi antara lektin – karbohidrat dimana lektin berada pada tubuh bakteri atau pada permukaan mukosa. Lektin dapat dalam bentuk struktur *fimbriae*, atau kapsul, atau komponen *outer membrane* pada bakteri Gram negatif. Lektin berikatan dengan glikoprotein dan atau glikolipid pada permukaan sel. Tipe yang kedua adalah antara protein bakteri dengan protein komplementer di permukaan mukosa. Tipe ketiga adalah interaksi antara unsur

hidrofobik protein dengan lipid dimana lipid berada pada sel hos atau pada permukaan sel bakteri (Abraham, 1999).

Perlekatan spesifik melibatkan pembentukan ikatan spesifik *lock – and – key* antara molekul komplementer pada permukaan sel eukaryota. Setelah ikatan terbentuk, dalam kondisi fisiologis perlekatan tersebut bersifat ireversibel. Beberapa penelitian yang membuktikan bahwa reseptor dan atau molekul adhesin berperan dalam spesifisitas perlekatan bakteri pada sel hos atau jaringan di antaranya :

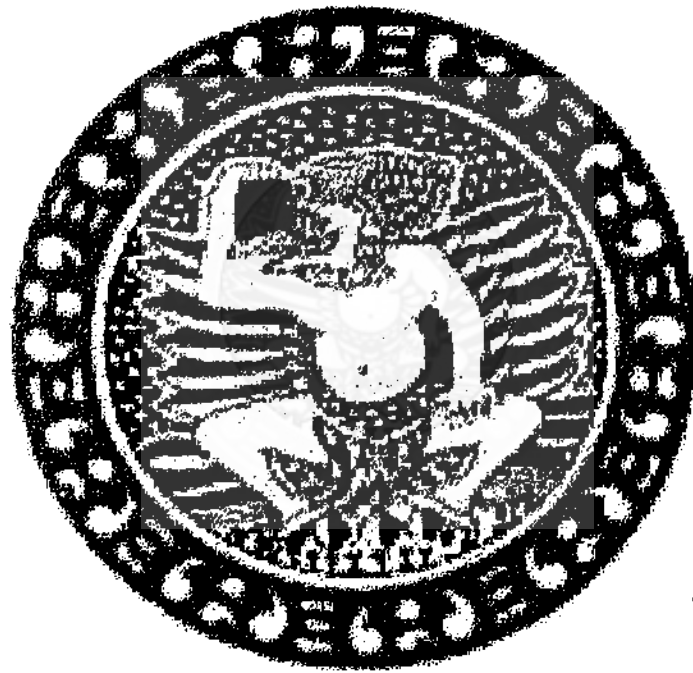
- 1) Bakteri akan mengikat *isolated receptors* atau analog reseptor.
 - 2) *Isolated adhesin* atau analog adhesin akan berikatan dengan permukaan sel eukaryota.
 - 3) Adhesi (dari bakteri pada permukaan sel eukaryota) dihambat oleh :
 - *Isolated adhesin* atau molekul reseptor
 - Adhesin atau analog reseptor.
 - Enzim dan bahan kimia yang secara spesifik merusak adhesin atau reseptor.
 - Spesifik antibodi terhadap komponen permukaan (adhesin atau reseptor)
- (Todar, 2002).

3.2 HIPOTESIS

Berdasarkan rumusan masalah dan kajian teori yang telah dilakukan, maka dapat ditentukan hipotesis penelitian yaitu sebagai berikut:

1. Terdapat pengaruh konsentrasi *crude protein fimbriae* yang disalutkan pada enterosit kelinci secara *invitro* terhadap indeks adhesi bakteri EHEC O157.
2. Terdapat pengaruh konsentrasi *crude LPS* yang disalutkan pada enterosit kelinci secara *invitro* terhadap indeks adhesi bakteri EHEC O157.



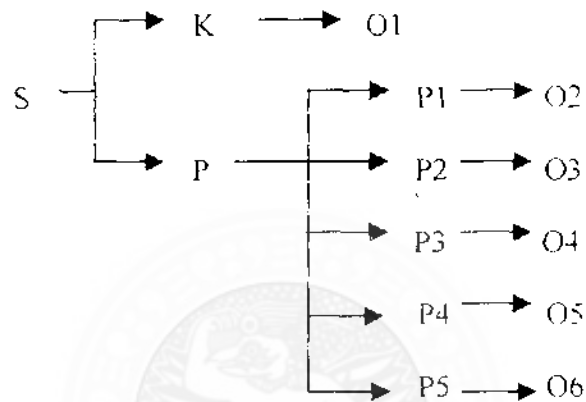


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorik, dengan desain eksperimen “*The Posttest - Only Control Group Design*”. Rancangan ini dapat digambarkan sebagai berikut:



Keterangan :

S : sampel

K : kelompok kontrol

P : kelompok perlakuan (P1, P2, P3, P4, P5 kelompok perlakuan berbeda berdasarkan perbedaan konsentrasi *crude protein fimbriae* dan *crude lipopolisakarida (LPS)* yang digunakan untuk uji adhesi)

O : observasi

Kelompok kontrol adalah:

kelompok bakteri EHEC O157 yang dilakukan uji adhesi tanpa penambahan *crude protein fimbriae* atau *crude LPS* (konsentrasi 0).

Kelompok perlakuan adalah:

kelompok bakteri EHEC O157 yang dilakukan uji adhesi dengan konsentrasi *crude protein fimbriae* atau *crude LPS* yang berbeda.

P1 : kelompok perlakuan tanpa pengenceran konsentrasi *crude protein fimbriae* dan LPS (konsentrasi 1).

P2 : kelompok perlakuan dengan pengenceran 2 kali dari P1 (konsentrasi $\frac{1}{2}$).

P3 : kelompok perlakuan dengan pengenceran 2 kali dari P2 (konsentrasi $\frac{1}{4}$).

P4 : kelompok perlakuan dengan pengenceran 2 kali dari P3 (konsentrasi $\frac{1}{8}$).

P5 : kelompok perlakuan dengan pengenceran 2 kali dari P4 (konsentrasi $\frac{1}{16}$).

4.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) O157 yang diperoleh dari bahan pemeriksaan klinik berupa tinja penderita diare yang diperiksa di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2.1 Besar sampel (n)

Besar sampel berdasarkan perhitungan menurut uji korelasi dengan $r = -0,733$ antara protein *fimbriae* HA-F36 dengan indeks adhesi dari *Salmonella typhi* sebagai prediktor protein adhesin, sehingga didapat jumlah 12 sampel yang akan diukur indeks adhesinya. Perhitungannya adalah sebagai berikut :

$$n = \left[\frac{1,960 + 0,842}{\frac{1}{2} \cdot \ln \left(\frac{1 + (-0,733)}{1 - (-0,733)} \right)} \right]^2 + 3 = 12$$

(Peni, M., 1998)

Keterangan :

r (koefisien korelasi) = - 0,733 berasal dari penelitian Protein Adhesin *Salmonella typhi* Sebagai Faktor Virulensi Berpotensi Immunogenik Terhadap Produksi S-IgA Protektif yang ada pada disertasi Sanarto Santoso, 2002.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah :

a. Variabel bebas

Yang menjadi variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi *crude protein fimbriae* dan *crude LPS* bakteri EHEC O157.

b. Variabel tergantung

Yang menjadi variabel tergantung dalam penelitian ini adalah indeks adhesi EHEC O157 pada enterosit kelinci.

c. Variabel kendali

Yang menjadi variabel kendali dalam penelitian ini adalah konsentrasi 1 *crude protein fimbriae*, *crude outer membran protein (OMP)*, dan *crude LPS* yang ditambahkan pada semua kelompok perlakuan.

Definisi operasional:

Indeks adhesi adalah jumlah bakteri yang menempel pada tiap enterosit kelinci (dihitung dari setiap 100 enterosit dan dibuat reratanya).

Konsentrasi 1 dari *crude protein fimbriae*, *crude LPS*, dan *crude OMP* ditentukan dengan spektrofotometri.

4.4 Bahan Penelitian

4.4.1 Bahan untuk identifikasi bakteri EHEC O157 (metode Baron *et al.*, 1994 ; Nataro and Kaper, 1998):

Bahan warna untuk pengecatan Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), medium perbenihan *Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar*, *Latex reagent kit* untuk deteksi antigen O157.

4.4.2 Bahan untuk isolasi *crude protein fimbriae* (metode Ehara *et al.*, 1989):

Thiaproline Carbonat Glutamat (TCG) agar, *Bruin Heart Infusion (BHI) broth*, *trichloroaceticacid (TCA) 3%*, *Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4*.

4.4.3 Bahan untuk isolasi *crude OMP* (metode Sanarto dkk., 1999):

Thiaproline Carbonat Glutamat (TCG) agar, *Bruin Heart Infusion (BHI) broth*, *trichloroaceticacid (TCA) 3%*, *Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4*, *3-((3-Cholamidopropyl)-dimethyl - ammonio)-1-propane sulfonate (Chaps)*

4.4.4 Bahan untuk isolasi *crude LPS* (metode Westphal and Jann diambil dari Westerman, 1997):

Suspensi bakteri dalam *Luria broth media* yang mengandung *triptone* dan *yeast extract*, *deionized water*, *larutan fenol 88%*, *ethanol 95%*, *sodium asetat 0,15 gram*.

4.4.5 Bahan untuk uji hemaglutinasi (metode Hanne and Findkelstein, 1982):

Darah kelinci, *Phosphate Buffer Saline pH 7.4*, *EDTA*, *crude protein fimbriae*, *crude OMP*, dan *crude LPS*.

4.4.6 Bahan untuk isolasi enterosit kelinci (metode modifikasi Weisler diambil dari Nagayama, 1995):

Kelinci usia 4 minggu dengan berat badan 1 kg, larutan eter, larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,4, *Dithiothreitol* 1mM, KCl 1,5 mM, NaCl 9,6 mM, Na-Citrat 27 mM, KH₂PO₄ 8 mM, Na₂HPO₄ 5,6 mM, EDTA 1,5 mM, *Bovine Serum Albumine* (BSA)1%, Aquadest

4.4.6

4.4.7 Bahan untuk uji adhesi (metode Nagayama *et al.*, 1995):

Nutrient broth, larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,4, *Bovine Serum Albumine* (BSA)1%, suspensi bakteri EHEC O157 10⁸/ml, suspensi enterosit kelinci 10⁶ ml, *crude protein fimbriae* EHEC O157, *crude* LPS EHEC O157, *crude* OMP EHEC O157, minyak imersi, bahan warna untuk pengecatan Gram: (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), aquades.

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Instrumen untuk identifikasi bakteri EHEC O157 (metode Baron *et al.*, 1994 ; Nataro and Kaper, 1998):

Ose, lampu Bunsen, cawan petri steril, gelas obyek, pipet *Pasteur* steril, mikroskop cahaya binokuler.

4.5.2 Instrumen untuk isolasi *crude protein fimbriae* (metode Ehara *et al.*, 1989):

Modifikasi *Omnimixer*, tabung reaksi, *sentrifuge* dingin, mikropipet,

4.5.3 Instrumen untuk isolasi *crude* OMP (metode Sanarto dkk., 1999):

Modifikasi *Omnimixer*, tabung reaksi, *sentrifuge* dingin, mikropipet, membran dialisa, klem dialisa, *magnetic stirrer*, *hot plate*.

4.5.4 Instrumen untuk isolasi *crude* LPS EHEC O157 (metode Westphal and Jann diambil dari Westerman, 1997):

Tabung reaksi, inkubator, *vortex*, *water bath*, *sentrifuge*, tabung *sentrifuge* 50 ml, *beaker glass*, membran dialisa, klem dialisa, *magnetic stirrer*.

4.5.5 Instrumen untuk uji hemaglutinasi (metode Hanne and Findkelstein, 1982):

Mikroplate dasar V, mikropipet, *sentrifuge*, tabung *sentrifuge* 10 ml, *shaker*.

4.5.6 Instrumen untuk isolasi enterosit kelinci (metode modifikasi Weisler diambil dari Nagayama, 1995):

Benang, *shaking incubator*, inkubator, tabung *sentrifuge* 10 ml, *beaker glass*, *shaking waterbath*, *hemocytometer*, botol, mikropipet, *sentrifuge* dingin.

4.5.7 Instrumen untuk uji adhesi (metode Nagayama et al., 1995):

Shaking incubator, inkubator, tabung *sentrifuge* 10 ml, *sentrifuge* dingin, *spektrofotometri*, *shaking waterbath*, tabung reaksi, *ependorf*, gelas obyek, mikroskop cahaya binokuler, alat penghitung (*counter*).

4.6 Lokasi dan waktu penelitian

4.6.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.6.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 6 bulan antara bulan Januari 2003 sampai dengan bulan Juni 2003.

4.7 Prosedur pengambilan dan pengumpulan data

4.7.1 Prosedur Identifikasi Bakteri EHEC O157 (metode Baron *et al*, 1994 ; Nataro and Kaper, 1998).

1. Pemeriksaan Mikroskopis:

1.1 Pembuatan hapusan bakteri pada gelas obyek:

- a. Satu tetes aquades steril atau larutan saline diteteskan pada gelas obyek.
- b. Dengan ose jarum yang steril, diambil sedikit koloni bakteri yang tumbuh pada medium padat kemudian disuspensikan dengan satu tetes aquades sterile atau larutan saline yang sudah diteteskan terlebih dahulu pada gelas obyek.
- c. Hapusan sebaiknya dibuat tipis dengan diameter 15 – 20 mm.
- d. Hapusan dibiarkan kering di udara.

1.2 Pengecatan Gram

- a. Hapusan yang sudah kering di udara difiksasi dengan cara melewatkan gelas obyek di atas api Bunsen beberapa kali, kemudian dibiarkan dingin sejenak.
- b. Hapusan dituangi dengan kristal violet, dibiarkan selama 10-30 detik.
- c. Bilas dengan air mengalir hingga bersih.
- d. Hapusan dituangi dengan lugol dan biarkan selama 20 detik atau selama dua kali lama pemberian kristal violet.
- e. Bilas dengan air mengalir hingga bersih.

- f. Hapusan dituangi dengan alkohol 96% selama 10 detik dan bilas segera dengan air mengalir. Prosedur ini diulangi hingga warna biru tidak nampak pada hapusan. Semakin tebal hapusan, maka membutuhkan prosedur *decolorizing* lebih lama.
- g. Hapusan dituangi dengan bahan warna pembanding yaitu safranin, biarkan selama 30 detik.
- h. Bilas dengan air mengalir dan keringkan gelas obyek dengan kertas penghisap.
- i. Hapusan diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000x menggunakan minyak imersi.

Bakteri *Escherichia coli* nampak berbentuk batang berwarna merah sesuai dengan sifatnya terhadap pewarnaan Gram berupa bakteri batang Gram negatif (Baron *et al.*, 1994).

2. Perbenihan:

Isolat bakteri ditanam pada *Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar* yang merupakan medium diferensial untuk EHEC O157. Pada medium ini bakteri tersebut tumbuh sebagai koloni yang tidak berwarna (*colorless*) setelah diinkubasi selama 18-24 jam karena tidak memfermentasi sorbitol (Nataro and Kaper, 1998).

3. Serotyping

Satu koloni terpisah yang tumbuh pada SMAC Agar diuji dengan *slide agglutination* dengan antisera O157. Dalam hal ini digunakan *latex*

reagent kit untuk identifikasi EHEC yang mengekspresikan antigen O157 LPS (Nataro and Kaper, 1998).

4.7.2 Prosedur isolasi *crude protein fimbriae* (metode Ehara *et al.*, 1999).

Bakteri diperbanyak pada medium bifasik TCG *agar* – BHI *broth*. Setelah inkubasi semalam, bagian *broth* dikumpulkan, ditambah TCA 3% dan diletakkan pada suhu kamar selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi 15000 g (6000 rpm) pada 4°C selama 15 menit. Supernatan dibuang, endapan disuspensi dengan PBS 10 kali volume. Kemudian dilakukan pemotongan *fimbriae* menggunakan alat modifikasi *omnimixer*. Suspensi disentrifus pada 32000 g (12000 rpm) selama 30 menit suhu 4°C. Supernatan yang merupakan *crude protein fimbriae* dipisahkan. Endapan diresuspensi dengan PBS 10 kali volume dan dilakukan pemotongan *fimbriae* lagi.

4.7.3 Prosedur isolasi *crude OMP* (Sanarto dkk., 1999).

Bakteri diperbanyak pada medium bifasik TCG *agar* - BHI *broth*. Setelah inkubasi semalam, bagian *broth* dikumpulkan, ditambah TCA 3% dan diletakkan pada suhu kamar selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi 15000 g (6000 rpm) pada 4°C selama 15 menit. Supernatan dibuang, endapan diresuspensi dengan PBS 10 kali volume. Setelah dilakukan pemotongan *fimbriae* (sesuai dengan prosedur pemotongan *fimbriae*), supernatan yang merupakan *crude protein fimbriae* dipisahkan dari endapan. Kemudian endapan disuspensi kembali dengan PBS 10 kali volume dan ke dalam suspensi ditambahkan *Chaps* sehingga konsentrasinya 0,5%, dikocok selama 5 menit. Kemudian campuran disentrifus dengan kecepatan 32000g (12000 rpm)

pada 4°C selama 30 menit. Endapan dibuang, supernatan diambil dilakukan dialisa dengan PBS pH 7,4 selama 48 jam. Cairan dialisa yang mengandung *crude* OMP diganti 2 kali dan dialisat disimpan -20°C untuk pemeriksaan selanjutnya.

4.7.4 Prosedur isolasi *crude* LPS EHEC O157 (Metode Westphal and Jann diambil dari Westerman, 1997).

1. Bakteri ditanam dalam Luria *broth* yang mengandung *triptone* dan *yeast extract* kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 16-18 jam.
2. Suspensi bakteri sebanyak 500 ml disentrifus dengan putaran 15000 g (6000 rpm) selama 1 jam.
3. Pelet yang diperoleh, diresuspensi dalam 10 ml *deionized water* (yang sudah dipanaskan pada suhu 72-75°C).
4. Kemudian suspensi tersebut divorteks selama 20 detik dan diletakkan dalam *water bath* dengan suhu 72-75°C dengan mulut tabung terbuka.
5. Ditambahkan 10 ml larutan fenol 88% (sebelumnya dipanaskan pada suhu 72-75°C) kemudian tabung divorteks dan diinkubasikan selama 15 menit dalam *waterbath*.
6. Tabung divorteks ulang setiap beberapa menit selama waktu inkubasi 15 menit kemudian didinginkan di suhu ruang.
7. Setelah dilakukan sentrifugasi 500 g (1000 rpm) selama 10 menit, fase air yang terletak di lapisan atas dipindahkan dan disimpan.
8. Lapisan tengah yang merupakan fase fenol dipanaskan pada suhu 72-75°C, dan ditambahkan 10 ml *deionized water* kemudian prosedur diulang kembali.

9. Fase air dari 2 kali prosedur ekstraksi digabungkan dan dipanaskan lagi pada suhu 72-75°C.
10. Fenol 88% (sebelumnya dipanaskan pada suhu 72-75°C) sebanyak 5 ml ditambahkan dan campuran tersebut diinkubasi selama 15 menit (pada suhu 72-75°C) dengan dilakukan vorteks secara periodik dan proses ekstraksi diulang.
11. Lapisan tengah yang mengandung protein yang terpresipitasi dibuang dan adanya fase fenol dibuktikan dengan sentrifugasi 15000 g (6000 rpm) selama 20 menit.
12. Fase air didialisis dalam air (pada suhu 4°C) sampai seluruh sisa fenol hilang.
13. Lipopolisakarida dipresipitasi dari fase air dengan 6 kali volume 95% ethanol (yang mengandung 0.15 sodium asetat per 50 ml) pada suhu - 20°C semalam.
14. Pelet diresuspensi dalam 1 ml air dan disimpan pada suhu - 20°C.

4.7.5 Prosedur Uji Hemaglutinasi (metode Hanne and Findkelstein, 1982).

Uji hemaglutinasi dilakukan pada mikropelat dasar V menggunakan eritrosit kelinci (0,5%). Sampel berupa suspensi bakteri, *crude protein fimbriae* dan *crude OMP*. Sebagai larutan pengencer digunakan PBS pH 7,4 dan dilakukan pengenceran sampel 2 kali untuk setiap sumur. Mikropelat diinkubasikan selama 15 menit, kemudian didiamkan dan titer dibaca dibandingkan dengan kontrol negatif (PBS).

4.7.6 Prosedur Isolasi Enterosit Kelinci (Modifikasi Weisler yang diambil dari Nagayama, 1995).

- 1) Kelinci dibunuh dengan menggunakan larutan eter/ CHCl_3
- 2) Intestine diambil, dipotong sepanjang 5 cm dan dibuka dengan cara memotong melintang (mulai di bawah gaster, sebelum usus besar diikat supaya fekes tidak keluar)
- 3) Dicuci dengan PBS pH 7,4 (mengandung 1 mM *dithiothreitol*) pada suhu 4°C sampai bersih
- 4) Dimasukkan dalam cairan yang mengandung 1,5 mM KCl, 9,6 mM NaCl, 27 mM NaCitrat, 8 mM KH_2PO_4 dan 5,6 mM Na_2HPO_4 dengan pH 7,3.
- 5) Digoyang pada *shaking incubator* 37°C selama 20 menit.
- 6) Jaringan dipindahkan dalam cairan PBS mengandung 1,5 mM EDTA dan 0,5 mM *dithiothreitol*.
- 7) Digojog kuat selama 20 menit suhu 37°C pada *shaking water bath*.
- 8) Jaringan dicuci sampai 3 kali dengan PBS (dengan sentrifugasi 900 g (1500 rpm) selama 5 menit suhu 4°C).
- 9) Isolasi enterosit diperoleh dengan cara membuat suspensi jaringan menggunakan PBS yang mengandung BSA 1% (ambil bagian cairan sebagai stok enterosit)
- 10) Enterosit disiapkan dengan konsentrasi $10^6/\text{ml}$ (menggunakan *hemocytometer*). Simpan pada suhu 4°C , siap untuk digunakan.

4.7.7 Prosedur uji adhesi (Modifikasi Nagayama *et al.*, 1995).

- 1) Suspensi bakteri EHEC O157 dalam *nutrient broth* digoyang pada *shaking incubator* suhu 37°C selama 3 jam.
- 2) Kemudian dilakukan sentrifugasi 15000 g (6000 rpm) selama 10 menit suhu 4°C.
- 3) Endapan ditambah dengan PBS yang mengandung BSA 1%. Kandungan bakteri dibuat 10⁸/ml (OD = 1.0 pada $\lambda = 600$ nm).
- 4) *Crude protein fimbriae* EHEC O157 masing-masing sebanyak 300 μ l dari konsentrasi 1, 1/2, 1/4, 1/8, dan 1/16, ditambahkan dalam suspensi enterosit 10⁶/ml sebanyak 300 μ l kemudian digoyang di *shaking waterbath* kecepatan 50 rpm selama 30 menit suhu 37°C. Untuk kontrol tidak dilakukan penambahan *crude protein fimbriae* (konsentrasi 0).
- 5) Suspensi bakteri 10⁸/ml sebanyak 300 μ l ditambahkan ke dalam suspensi enterosit 10⁶/ml sebanyak 300 μ l.
- 6) Campuran tersebut digoyang pada *shaking water bath* dengan goyangan pelan (kecepatan 50 rpm) selama 30 menit suhu 37°C.
- 7) Dilakukan sentrifugasi 900 g (1500 rpm) 2 menit suhu 4°C.
- 8) Pelet dicuci dengan BSA 1% sebanyak 2 kali (sentrifugasi 900 g (1500 rpm) 2 menit 4°C).
- 9) Pelet diambil dan dibuat hapusan pada gelas obyek.
- 10) Dilakukan pewarnaan Gram.

11) Diamati di bawah mikroskop cahaya binokuler dengan obyektif 100x dan minyak imersi.

4.7.8 Prosedur uji adhesi menggunakan *crude* LPS EHEC O157 sama dengan uji adhesi menggunakan *crude protein fimbriae*.

Untuk mengendalikan pengaruh faktor perlekatan lain yang tidak diuji, maka enterosit disalut terlebih dahulu dengan ketiga unsur faktor perlekatan yaitu *crude protein fimbriae*, *crude* OMP dan *crude* LPS dengan konsentrasi 1, volume yang sama sebesar 300 μ l. Selanjutnya untuk faktor perlekatan yang diuji, konsentrasi diturunkan sesuai prosedur.

4.8 Pengumpulan Data

Untuk mengetahui peranan protein *fimbriae* dan LPS pada perlekatan bakteri EHEC O157 dilakukan uji adhesi menggunakan *crude protein fimbriae* dan *crude* LPS. Data yang dikumpulkan adalah data hasil uji hemaglutinasi dan indeks adhesi dari uji adhesi. Selanjutnya data disajikan dalam bentuk tabel sebagai berikut:

Tabel. 4.1 Titer Hemaglutinasi *Crude Protein Fimbriae* dan Lipopolisakarida EHEC O157.

Materi	Sumur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
		(1/2)	(1/4)	(1/8)	(1/16)	dst.						K
<i>Crude protein fimbriae</i>												
Lipopolisakarida												

Tabel 4.2 Indeks Adhesi EHEC O157 pada enterosit kelinci yang disalut dengan *crude protein fimbriae*

Konsentrasi	Sampel (n)	Hapusan-1 per 100 sel	Hapusan-2 per 100 sel	Rerata per 100 sel	Rerata per sel
Kontrol (0)	1				
	2				
	3				
1/16	1				
	2				
	3				
1/8	1				
	2				
	3				
...	1				
	2				
	3				
1	1				
	2				
	3				

Tabel 4.3 Indeks adhesi EHEC O157 pada enterosit kelinci yang disalut lipopolisakarida

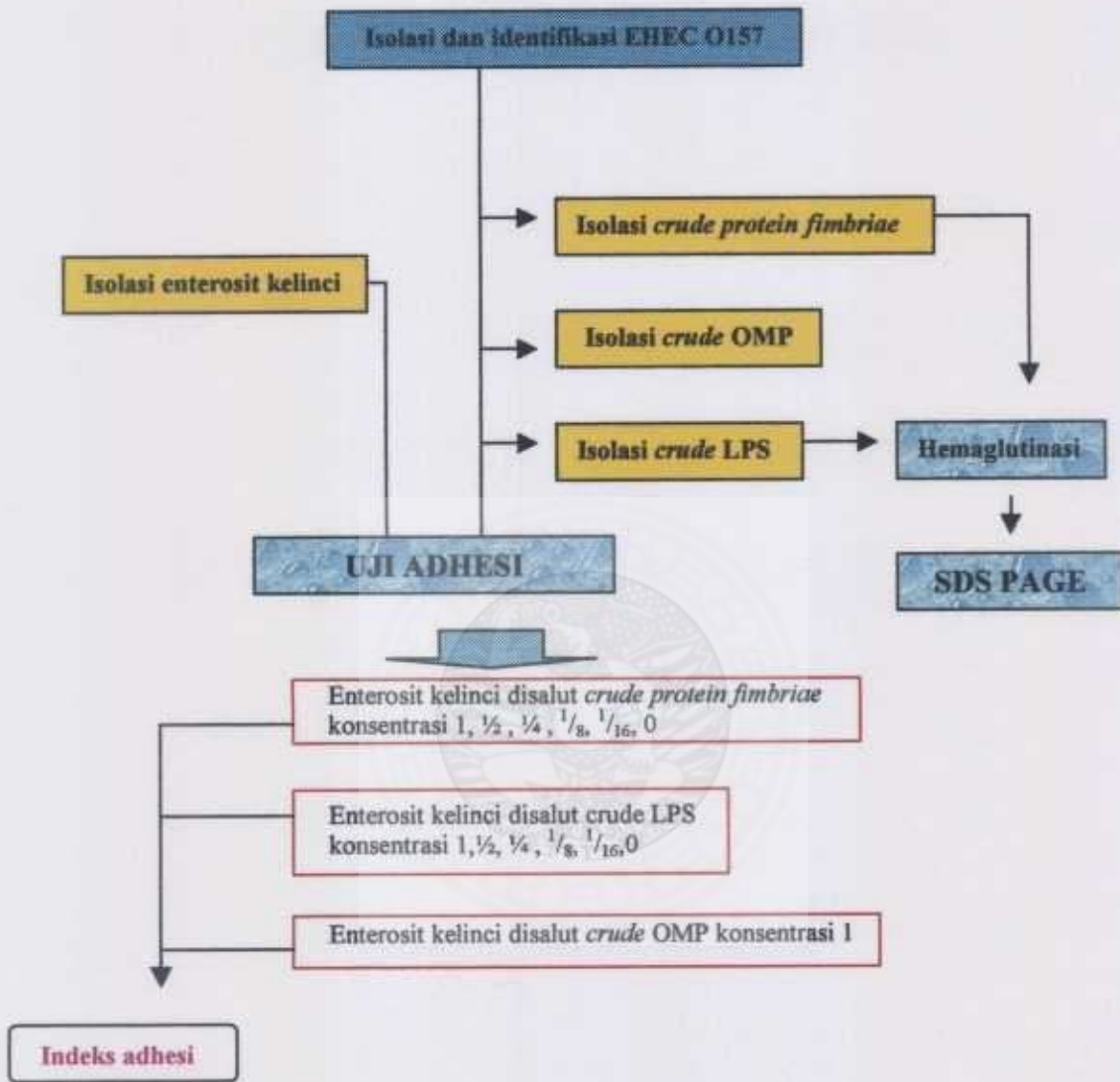
Konsentrasi	Sampel (n)	Hapusan-1 per 100 sel	Hapusan-2 per 100 sel	Rerata per 100 sel	Rerata per sel
Kontrol (0)	1				
	2				
	3				
1/16	1				
	2				
	3				
1/8	1				
	2				
	3				
...	1				
	2				
	3				
1	1				
	2				
	3				

4.9 Cara analisis data

- a) Peranan *fimbriae* pada perlekatan bakteri EHEC O157 dianalisis dengan uji regresi sederhana antara konsentrasi *crude protein fimbriae* dengan indeks adhesi bakteri.
- b) Peranan lipopolisakarida pada perlekatan bakteri EHEC O157 dianalisis dengan uji regresi sederhana antara konsentrasi *crude LPS* dengan indeks adhesi bakteri.



KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN





BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

Bagian ini memuat data penelitian yang relevan dengan tujuan dan hipotesisnya. Penyajian data hasil penelitian berupa tabel, grafik, dan foto yang disusun sesuai dengan urutan kerangka operasional penelitian yang terdiri dari dua tahap penelitian, yaitu tahap uji hemaglutinasi dan tahap uji adhesi. Adapun materi yang diuji dalam penelitian ini berasal dari bakteri *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) O157 yang diisolasi dari feses satu penderita diare disertai febris dengan nomor register laboratorium 9517 yang dirawat di Rumah Sakit Umum Lavaellette Malang. Identifikasi *Escherichia coli* menggunakan *microbact system* yang lazim digunakan di Laboratorium Mikrobiologi RSSA/FK UNIBRAW (lampiran 1). Sedangkan serotipe O157 ditentukan dengan perbenihan bakteri *E. coli* pada medium *Sorbitol Mac Conkey* (SMAC) agar dilanjutkan dengan uji aglutinasi lateks menggunakan *latex agglutination kit* untuk *E. coli* O157 yang diproduksi oleh Sigma.



Gambar 5.1 Biakan EHEC O157 pada *Sorbitol MacConkey* (SMAC) agar

Keterangan gambar :

Tanda panah menunjukkan koloni terpisah EHEC O157, tidak berwarna (*colorless*), diameter sekitar 2 mm.

5.1 Uji Hemaglutinasi & SDS – PAGE

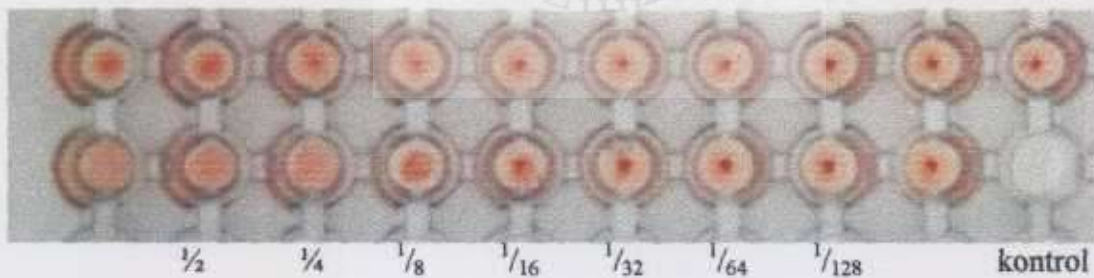
Uji hemaglutinasi bertujuan untuk mencari hemaglutinin bakterial yang dimiliki oleh EHEC O157. Hemaglutinin bakterial yang menyebabkan aglutinasi eritrosit tersebut berperan aktif dalam perlekatan bakteri pada mukosa usus karena membran eritrosit diyakini memiliki kemiripan dengan substansi mukosa usus yang terlibat dalam perlekatan bakteri (Alam et al., 1997). Komponen permukaan sel yang digunakan untuk mencari hemaglutinin bakteri EHEC O157 dalam penelitian ini adalah *crude protein fimbriae* dan lipopolisakarida (LPS).

Dari gambaran uji hemaglutinasi pada *crude protein fimbriae* (gambar 5.2) tampak adanya fenomena yang menyerupai fenomena prozon atau *antibody excess* pada reaksi serologis, yaitu fenomena dimana secara visual tidak terjadi aglutinasi pada antibodi dengan konsentrasi tinggi (Mayer, G., 2003). Dalam penelitian ini, *crude protein fimbriae* pada titer $\frac{1}{2}$ sampai dengan titer $\frac{1}{16}$ tidak menunjukkan hemaglutinasi secara visual. Hal ini dapat terjadi karena tidak semua *crude protein fimbriae* yang dapat berikatan dengan eritrosit mengadakan ikatan dengan eritrosit. Keadaan ini tidak dapat dilihat dengan reaksi hemaglutinasi makroskopik karena secara makroskopik pengamatan dilakukan terhadap keseluruhan reaksi dari sejumlah besar *fimbriae* dan tempat perlekatan ganda pada tiap eritrosit (Deneke et al, 1979). Hemaglutinasi baru tampak secara visual pada titer $\frac{1}{32}$ sampai dengan titer $\frac{1}{64}$, karena pada titer tersebut mulai diperoleh perbandingan yang seimbang antara *crude protein fimbriae* dan eritrosit yang berikatan. Titer hemaglutinasi ditentukan berdasarkan pengenceran maksimal yang menunjukkan gambaran aglutinasi secara visual (Mayer, G., 2003). Dalam penelitian ini titer hemaglutinasi untuk *crude*

protein fimbriae adalah $\frac{1}{64}$. Sedangkan uji hemaglutinasi untuk lipopolisakarida (LPS) EHEC O157 menunjukkan titer hemaglutinasi $\frac{1}{16}$ (gambar 5.3). Kemampuan hemaglutinasi dari LPS EHEC O157 sesuai dengan yang ditunjukkan oleh LPS pembanding yang diambil dari *E. coli* O127. Hanya terdapat perbedaan titer hemaglutinasi, pada LPS *E. coli* O127 titer hemaglutinasi lebih rendah yaitu sebesar $\frac{1}{8}$. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa dari uji hemaglutinasi diperoleh titer $\frac{1}{64}$ untuk *crude protein fimbriae* dan titer $\frac{1}{16}$ untuk LPS. Hasil tersebut menunjukkan bahwa bakteri EHEC O157 memiliki hemaglutinin bakterial baik yang berasal dari *crude protein fimbriae* maupun dari LPS.



Gambar 5.2 Titer hemaglutinasi *crude protein fimbriae* EHEC O157



Gambar 5.3 Titer hemaglutinasi lipopolisakarida EHEC O157

Keterangan Gambar 5.3 :

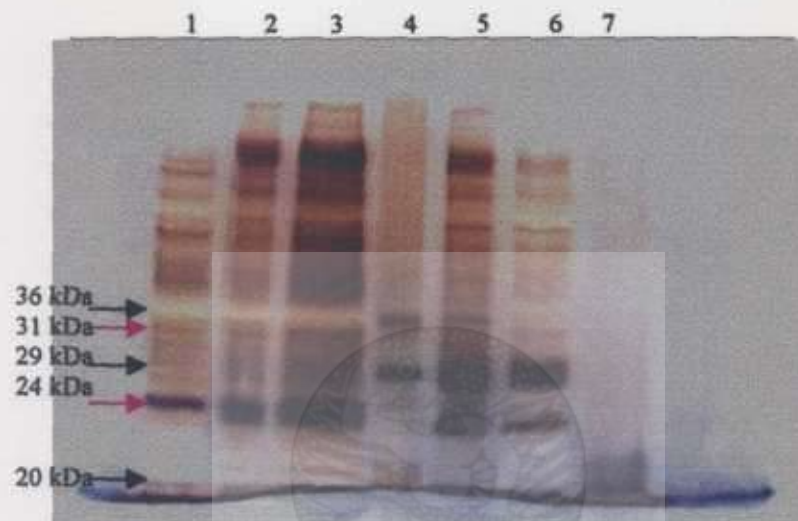
Baris 1 : LPS *E. coli* O127 (sebagai pembanding)

Baris 2 : LPS EHEC O157 (sampel)

Untuk memperkuat dugaan adanya reaksi hemaglutinasi yaitu ikatan antara eritrosit dengan *crude protein fimbriae* dilakukan SDS-PAGE (gambar 5.4). Sebelum dilakukan elektroforesis, *crude protein fimbriae* direaksikan dengan eritrosit. Kemudian dari aglutinat yang telah terbentuk, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit sehingga didapatkan endapan aglutinat dan supernatan aglutinat dari *crude protein fimbriae*. Sebagai sampel yang dimasukkan ke dalam sumur gel elektroforesis adalah *crude protein fimbriae* yang belum direaksikan dengan eritrosit, endapan aglutinat *crude protein fimbriae*, supernatan aglutinat *crude protein fimbriae*, serta eritrosit yang sudah dilisis.

Gambar 5.4 sumur 1 menunjukkan bahwa ketika dilakukan pemotongan *fimbriae* secara mekanik yang disertai dengan sentrifugasi, maka fraksi supernatan yang dihasilkan mengandung struktur *fimbriae* yang berlimpah (Bertin et al., 1996). Struktur *fimbriae* yang berlimpah tersebut ditunjukkan oleh banyaknya pita protein *crude protein fimbriae* dari berat molekul besar hingga berat molekul kecil. Namun berdasarkan data empiris, pada umumnya berat molekul protein *fimbriae* bakteri tidak lebih dari 50 kDa. Sehingga pita protein dengan berat molekul lebih dari 50 kDa kemungkinan merupakan bentuk polimer dari *fimbriae* yang tidak terpisah secara sempurna dengan metode pemisahan SDS PAGE yang sangat kompleks ini (Du et al., 1997). Kemungkinan lain adalah bahwa di antara pita protein *crude protein fimbriae* terdapat kontaminasi *outer membrane protein*, walaupun telah diantisipasi dengan metode sentrifugasi untuk memisahkan kedua protein tersebut. Kemungkinan yang kedua tersebut merupakan keterbatasan dari penelitian ini, sehingga untuk penelitian

selanjutnya lebih baik bila dilakukan pemurnian terhadap protein *fimbriae* yang telah diekstraksi.



Gambar 5.4 Hasil SDS-PAGE *crude protein fimbriae* dengan metode pewarnaan *silver staining*

Keterangan gambar :

- Sumur 1 : *Crude protein fimbriae* EHEC O157
 2 : Endapan aglutinat *crude protein fimbriae*
 3 : Endapan aglutinat *crude protein fimbriae* *)
 4 : Protein perunut (Sigma **)
 5 : Eritrosit manusia yang sudah dilisis
 6 : Supernatan aglutinat *crude protein fimbriae*
 7 : Lipopolisakarida EHEC O157

*) pretreated dengan SDS

***) 36 kDa : glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase ; 29 kDa : carbonic anhydrase ;
 24 kDa : trypsinogen ; 20 kDa : trypsin inhibitor

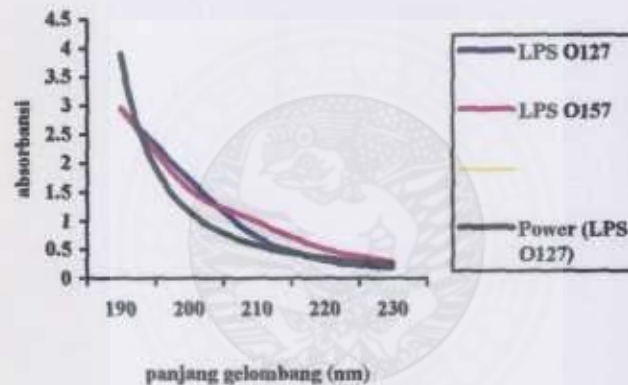
→ menunjukkan perkiraan berat molekul protein yang diduga sebagai protein adhesin

Selain itu gambar 5.4 menunjukkan adanya ikatan antara *crude protein fimbriae* dengan eritrosit. Analisis dari hasil SDS-PAGE tersebut (Deneke et al., 1979) adalah sebagai berikut. Pada gambar 5.4 sumur 5, eritrosit yang belum direaksikan dengan *crude protein fimbriae* tidak menunjukkan pita protein yang dimiliki oleh *crude protein fimbriae*. Selain itu pada sumur 6, yaitu pada supernatan aglutinat *crude protein fimbriae* tidak tampak pita protein yang dimiliki oleh *crude protein fimbriae*. Diduga bahwa *crude protein fimbriae* terikat dengan eritrosit di endapan aglutinat *crude protein fimbriae*. Pada saat endapan aglutinat *crude protein fimbriae* dipisahkan dengan SDS, selain pita protein eritrosit tampak pula pita protein dari *crude protein fimbriae* (gambar 5.4 sumur 2 dan 3). Dari sekian banyak pita protein yang dimiliki oleh *crude protein fimbriae* terdapat 2 pita protein yang tampak di sumur 1 memiliki karakteristik posisi berat molekul yang sama dengan pita protein yang tampak pada endapan aglutinat *crude protein fimbriae* (sumur 2 dan 3). Diduga kedua pita protein tersebut merupakan protein adhesin yang terdapat di dalam *crude protein fimbriae* dengan perkiraan berat molekul 31 kDa dan 24 kDa.

Sedangkan untuk LPS EHEC O157, dengan metode SDS-PAGE cara Laemmli tampak bayangan hitam kabur di sekitar berat molekul 20 kDa dan tidak dapat menunjukkan gambaran pemisahan berupa pita seperti pita protein pada *crude protein fimbriae* (gambar 5.4 sumur 7), sehingga uji hemaglutinasi metode mikrotiter tidak dapat diikuti dengan analisis SDS-PAGE. Gambaran SDS-PAGE tersebut sama dengan hasil penelitian Bilge et al., (1996). Hal ini disebabkan oleh ketidakmampuan SDS (*sodium dodecyl sulfate*) untuk memecah LPS dengan baik.

Untuk memastikan adanya kandungan LPS, dilakukan spektrofotometri terhadap LPS yang diekstraksi dari EHEC O157 dibandingkan dengan LPS baku dari *E. coli* O127 yang diproduksi oleh Sigma (grafik 5.1). Dari gambaran spektrofotometri tampak bahwa panjang gelombang maksimum untuk mendeteksi kedua lipopolisakarida tersebut sama yaitu sekitar 190 nm dan terdapat kemiripan profil kurva absorbansi untuk panjang gelombang yang lebih tinggi.

Gambaran spektrofotometri
LPS O157 dibandingkan LPS O127 (baku)



Grafik 5.1 Gambaran spektrofotometri LPS EHEC O157 dibandingkan LPS *E. coli* O127

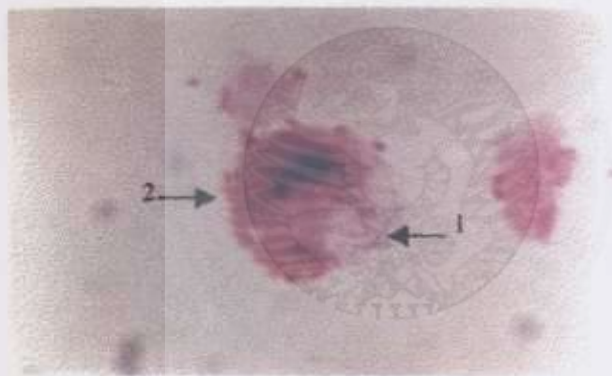
5.2 Uji Adhesi Hemaglutinin Bakterial

Uji adhesi bertujuan untuk membuktikan bahwa hemaglutinin bakterial yang berasal dari *crude protein fimbriae* dan dari LPS merupakan adhesin yang memiliki kemampuan untuk melekatkan EHEC O157 pada sel hospes, dalam hal ini sel enterosit kelinci. Dalam uji adhesi ini, sebagai variabel bebas adalah konsentrasi *crude protein fimbriae* dan konsentrasi LPS. Masing-masing dibuat 6 macam

konsentrasi, yaitu konsentrasi 0 (kontrol), konsentrasi $1/16$, konsentrasi $1/8$, konsentrasi $1/4$, konsentrasi $1/2$, dan konsentrasi 1 dengan pengulangan masing-masing 12 kali. Sedangkan sebagai variabel tergantung adalah indeks adhesi. Untuk menghitung indeks adhesi ini diperlukan pewarnaan sediaan secara Gram dan pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali. Penghitungan indeks adhesi dilakukan secara duplo (dua ulasan).

5.2.1 Uji Adhesi *Crude Protein Fimbriae* EHEC O157

Beberapa foto hasil uji adhesi *crude protein fimbriae* seperti yang terlihat di bawah ini merupakan hasil foto mikroskop merk Nikon.



Gambar 5.5 Perlakuan kontrol uji adhesi *crude protein fimbriae* EHEC O157

Keterangan gambar :

- 1) Enterosit ; 2) Sel bakteri EHEC O157
Sediaan diwarnai dengan pewarnaan Gram

Gambar 5.5 menunjukkan perlakuan kontrol dimana enterosit yang disalut dengan *crude outer membrane protein* dan LPS direaksikan dengan bakteri EHEC O157. Upaya penyalutan dengan kedua komponen permukaan bakteri tersebut

dimaksudkan untuk menyingkirkan pengaruh perlekatan bakteri yang diperankan oleh *outer membrane protein* dan LPS, sehingga perlekatan bakteri yang terjadi semaksimal mungkin diperankan oleh protein *fimbriae*. Di sini tampak sel enterosit kelinci berwarna merah dengan inti berwarna ungu dilekati oleh bakteri EHEC O157 yang berbentuk batang Gram negatif dengan tipe adhesi lokal. Pada penghitungan indeks adhesi, yang dihitung adalah banyaknya bakteri yang melekat pada permukaan setiap sel enterosit, dihitung sampai seratus sel enterosit dan dibuat reratanya.

Di bawah ini adalah contoh foto dengan perlakuan konsentrasi $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{2}$, dan 1 secara berurutan.



Gambar 5.6 Perlakuan *crude protein fimbriae* konsentrasi $\frac{1}{8}$.

Keterangan gambar:

- 1) Enterosit ; 2) Sel bakteri EHEC O157
Sediaan diwarnai dengan pewarnaan Gram

Pada gambar 5.6 tampak masih banyak bakteri EHEC O157 yang melekat pada sel enterosit dengan tipe adhesi lokal.



Keterangan gambar :

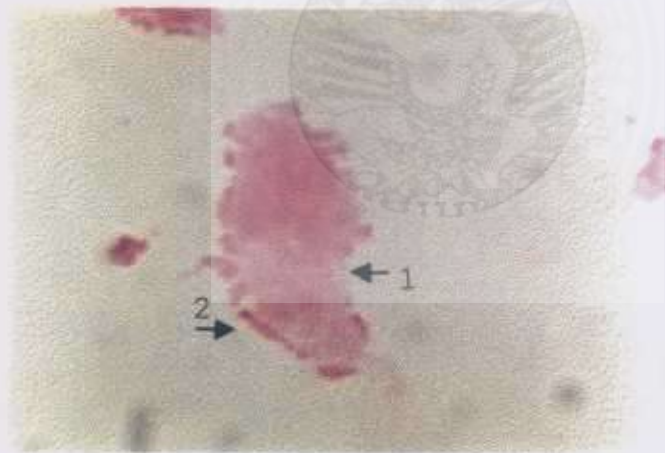
1) Enterosit

Tidak tampak sel bakteri EHEC O157 yang melekat pada enterosit
Selain diwarnai dengan pewarnaan Gram

Dari rekaman gambar 5.5 sampai dengan 5.8 tampak bahwa dengan makin meningkatnya konsentrasi *crude protein fimbriae* makin sedikit bakteri EHEC O157 yang melekat pada sel enterosit. Hasil lengkap indeks adhesi EHEC O157 pada enterosit yang disalut *crude protein fimbriae* adalah seperti yang terlihat pada lampiran 3, sedangkan ringkasannya terdapat pada tabel 5.1.

5.2.2 Uji Adhesi Lipopolisakarida EHEC O157

Seperti halnya pada uji adhesi *crude protein fimbriae*, pada uji adhesi lipopolisakarida (LPS) EHEC O157 juga dilakukan pengambilan contoh foto sebagaimana yang terlihat di bawah ini.



Gambar 5.9 Perlakuan kontrol uji adhesi lipopolisakarida EHEC O157

Keterangan gambar :

1) Enterosit 2) Sel bakteri EHEC O157
Sediaan diwarnai dengan pewarnaan Gram

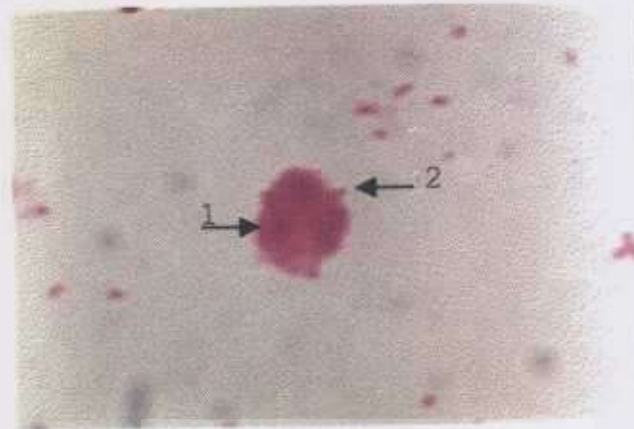
Gambar 5.9 menunjukkan perlakuan kontrol dimana enterosit yang disalut dengan *crude protein fimbriae* dan *crude outer membrane protein* direaksikan dengan sel bakteri EHEC O157. Upaya penyalutan dengan kedua komponen permukaan bakteri tersebut dimaksudkan untuk menyingkirkan pengaruh perlekatan bakteri yang diperankan oleh *protein fimbriae* dan *outer membrane protein*, sehingga perlekatan bakteri yang terjadi semaksimal mungkin diperankan oleh LPS. Pada gambar tersebut tampak enterosit kelinci berwarna merah dengan inti berwarna ungu dilekati oleh bakteri EHEC O157 yang berbentuk batang Gram negatif dengan tipe adhesi lokal.



Gambar 5.10 Perlakuan lipopolisakarida konsentrasi $\frac{1}{8}$

Keterangan gambar :

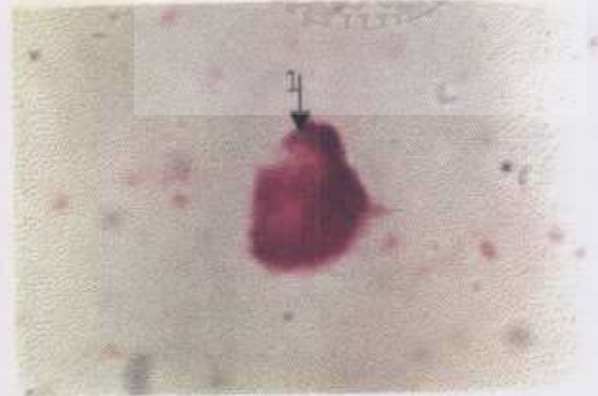
1) Enterosit 2) Sel bakteri EHEC O157
Sediaan diwarnai dengan pewarnaan Gram



Gambar 5.11 Perlakuan lipopolisakarida konsentrasi $\frac{1}{2}$

Keterangan gambar :

1) Enterosit 2) Sel bakteri EHEC O157
Sediaan diwarnai dengan pewarnaan Gram



Gambar 5.12 Perlakuan lipopolisakarida konsentrasi 1

Keterangan gambar :

1) Enterosit
Tidak tampak sel bakteri EHEC O157 yang melekat pada sel enterosit
Sediaan diwarnai dengan pewarnaan Gram

Seperti juga pada perlakuan *crude protein fimbriae* EHEC O157, dengan meningkatnya konsentrasi pada perlakuan LPS bakteri EHEC O157 yang melekat pada sel enterosit semakin sedikit (gambar 5.9 sampai dengan gambar 5.12). Hasil lengkap indeks adhesi EHEC O157 pada enterosit yang disalut LPS adalah seperti pada lampiran 3, sedangkan ringkasannya terdapat pada tabel 5.2.

5.2.3 Analisis Statistik Uji Adhesi

Hasil lengkap pengamatan indeks adhesi dari penelitian ini disajikan pada lampiran 3 dan 4, sedangkan ringkasannya terdapat pada tabel 5.1 dan tabel 5.2. Sebelum dilakukan analisis regresi linier sederhana, terlebih dahulu dilakukan uji t berpasangan antara indeks adhesi pada ulasan 1 dan ulasan 2 baik pada uji adhesi *crude protein fimbriae* maupun lipopolisakarida EHEC O157. Hasil uji t berpasangan tersebut disajikan pada lampiran 5. Analisis uji t berpasangan terhadap indeks adhesi antara ulasan 1 dan ulasan 2, baik pada uji adhesi *crude protein fimbriae* maupun lipopolisakarida menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna antara ulasan 1 dan ulasan 2, sehingga dilakukan uji regresi linier sederhana antara rerata indeks adhesi dengan konsentrasi *crude protein fimbriae* maupun dengan konsentrasi LPS.

5.2.3.1 Analisis Statistik Uji Adhesi *Crude Protein Fimbriae* EHEC O157

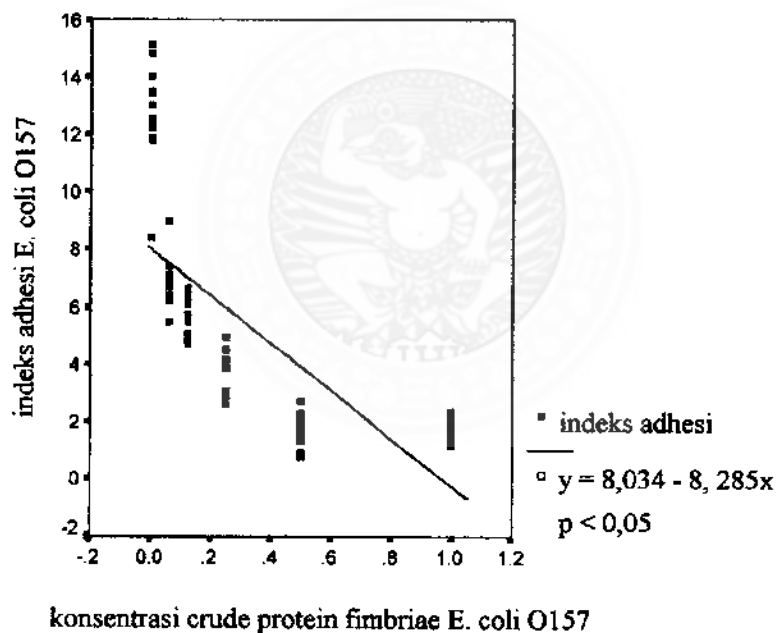
Hasil indeks adhesi EHEC O157 pada enterosit yang disalut *crude protein fimbriae* pada berbagai konsentrasi dapat dilihat pada lampiran 3 dan ringkasannya disajikan pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Ringkasan Hasil Indeks Adhesi EHEC O157 Pada Enterosit Disalut *Crude Protein Fimbriae*

Konsentrasi	<i>Crude protein fimbriae</i>	
	Rerata	Simpangan baku
0	12,73	1,7398
1/16 (0,0625)	6,90	0,8273
1/8 (0,125)	5,49	0,6910
1 / 4 (0,250)	3,67	0,7413
1 / 2 (0,5)	1,72	0,5818
1	1,63	0,3815

Untuk mengetahui adanya pengaruh konsentrasi *crude protein fimbriae* terhadap indeks adhesi bakteri EHEC O157 dilakukan uji regresi linier sederhana menggunakan program SPSS 10.0 (perhitungan SPSS terdapat pada lampiran 6). Dalam rangkaian uji regresi linier sederhana terlebih dahulu dilakukan uji Anova (lampiran 6 tabel Anova). Dari uji Anova atau *F test*, didapat *F* hitung adalah 78,852 dengan tingkat signifikansi 0,000. Karena probabilitas (0,000) jauh lebih kecil dari 0,05, maka dapat disimpulkan terdapat pengaruh konsentrasi *crude protein fimbriae* terhadap indeks adhesi bakteri EHEC O157. Hasil uji regresi linier sederhana antara konsentrasi *crude protein fimbriae* dengan indeks adhesi EHEC O157 pada enterosit disajikan pada grafik 5.2 (diproses dengan program SPSS 10.0).

Grafik 5.2 menggambarkan garis regresi dengan persamaan $y = 8,034 - 8,285x$, dimana y adalah indeks adhesi sedangkan x adalah konsentrasi *crude protein fimbriae* EHEC O157 (perhitungan SPSS di lampiran 6 tabel *coefficients*). Garis regresi tersebut menunjukkan bahwa terdapat penurunan indeks adhesi EHEC O157 yang menyertai peningkatan konsentrasi *crude protein fimbriae* EHEC O157. Untuk menguji signifikansi koefisien regresi dilakukan uji t .



Hasil uji t sebagaimana tampak pada tabel *Coefficient* di lampiran 6 pada kolom *sig/significance* adalah 8,880 atau probabilitas di bawah 0,05. Sehingga H_0 ditolak, atau koefisien regresi signifikan, atau konsentrasi *crude protein fimbriae* benar-benar berpengaruh secara signifikan terhadap indeks adhesi.

5.2.3.2 Analisis Statistik Uji Adhesi Lipopolisakarida EHEC O157

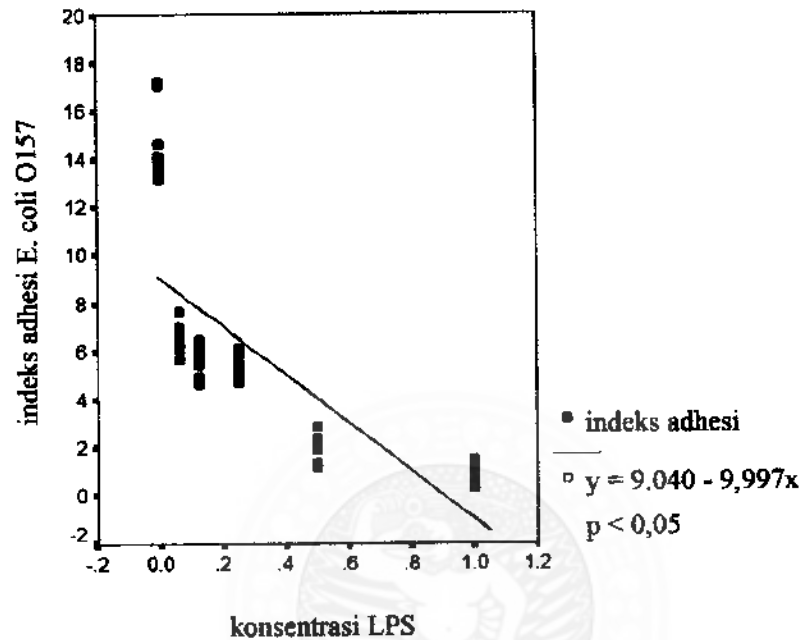
Hasil indeks adhesi EHEC O157 pada enterosit yang disalut LPS dengan berbagai konsentrasi tampak pada lampiran 4 dan ringkasannya disajikan pada tabel 5.3.

Tabel 5.2 Ringkasan Hasil Indeks Adhesi EHEC O157 Pada Enterosit Disalut Lipopolisakarida

Konsentrasi	Lipopolisakarida	
	Rerata	Simpangan baku
0	14,58	1,5892
1/16 (0,0625)	6,60	0,5137
1/8 (0,125)	5,64	0,6054
1/4 (0,250)	5,29	0,5263
1/2 (0,5)	1,99	0,4247
1	0,76	0,3911

Sebagaimana analisis statistik uji adhesi *crude protein fimbriae*, untuk mengetahui adanya pengaruh konsentrasi LPS terhadap indeks adhesi bakteri EHEC O157 dilakukan uji regresi linier sederhana menggunakan program SPSS 10.0 (perhitungan SPSS terdapat pada lampiran 7). Dalam rangkaian uji regresi linier sederhana terlebih dahulu dilakukan uji Anova atau *F test* (lampiran 7 tabel Anova). Dari uji Anova didapat *F* hitung 97,315 dengan tingkat signifikansi 0,000. Karena probabilitas (0,000) jauh lebih kecil dari 0,05, maka dapat disimpulkan bahwa konsentrasi LPS berpengaruh terhadap indeks adhesi bakteri EHEC O157. Selanjutnya hasil uji regresi linier sederhana antara konsentrasi LPS dengan indeks adhesi bakteri EHEC O157 disajikan pada grafik 5.3 di bawah ini.

Grafik 5.3 menggambarkan garis regresi dengan persamaan $y = 9,040 - 9,997x$, dimana *y* adalah indeks adhesi sedangkan *x* adalah konsentrasi LPS EHEC O157 (perhitungan SPSS di lampiran 7 tabel *Coefficients*). Garis regresi tersebut menunjukkan bahwa terdapat penurunan indeks adhesi EHEC O157 yang menyertai penurunan konsentrasi LPS EHEC O157. Untuk menguji signifikansi koefisien regresi dilakukan uji *t*. Hasil uji *t* tersebut sebagaimana tampak pada tabel *Coefficients* di lampiran 7 pada kolom *sig/significance* adalah 0,000 atau probabilitas di bawah 0,05. Sehingga H_0 ditolak, atau koefisien regresi signifikan, atau konsentrasi LPS benar-benar berpengaruh secara signifikan terhadap indeks adhesi.

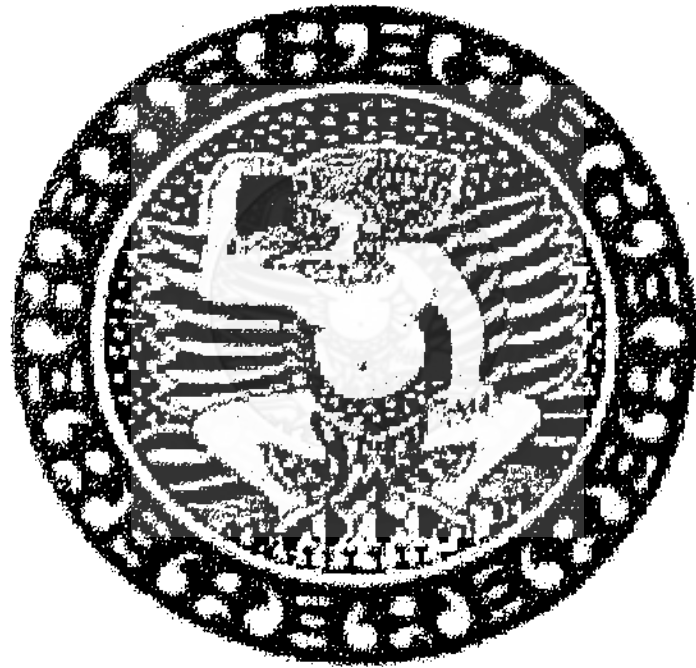


Grafik 5.3 Grafik uji regresi linier sederhana antara konsentrasi lipopolisakarida dengan indeks adhesi bakteri EHEC O157.

Dari hasil uji regresi linier sederhana antara konsentrasi *crude protein fimbriae* dengan indeks adhesi bakteri EHEC O157 dan antara konsentrasi LPS dengan indeks adhesi bakteri EHEC O157 diperoleh 2 persamaan regresi yang berbeda. Persamaan regresi pada uji regresi linier sederhana antara konsentrasi *crude protein fimbriae* dengan indeks adhesi bakteri EHEC O157 adalah $y = 8,034 - 8,285x$. Sedangkan persamaan regresi pada uji regresi linier sederhana antara konsentrasi LPS dengan indeks adhesi bakteri EHEC O157 adalah $y = 9,040 -$

9,997x. Dari kedua analisis regresi sederhana tersebut juga diperoleh 2 nilai beta (lampiran 6 tabel *Coeffisients*, lampiran 7 tabel *Coefficients*) dimana nilai beta pada uji regresi linier sederhana terhadap konsentrasi LPS sebesar 7,63 hampir sama dengan nilai beta pada uji regresi linier sederhana terhadap konsentrasi *crude protein fimbriae* sebesar 7,28. Berdasarkan kedua nilai beta tersebut dapat disimpulkan bahwa pengaruh konsentrasi LPS EHEC O157 terhadap indeks adhesi EHEC O157 hampir sama dengan pengaruh konsentrasi *crude protein fimbriae* EHEC O157 terhadap indeks adhesi bakteri tersebut.





BAB 6

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan serta mengarah pada upaya menjawab hipotesis maka pembahasan disusun menurut pendekatan sistematika pembuktian adanya pengaruh konsentrasi *crude protein fimbriae* terhadap indeks adhesi bakteri *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) O157 serta pembuktian adanya pengaruh konsentrasi lipopolisakarida (LPS) terhadap indeks bakteri EHEC O157.

6.1 Pengaruh Konsentrasi *Crude Protein Fimbriae* Terhadap Indeks Adhesi Bakteri EHEC O157

Perlekatan merupakan syarat bagi bakteri untuk berkolonisasi pada sel hos. Salah satu mekanisme perlekatan yang telah banyak diketahui adalah perlekatan yang diperankan oleh *fimbriae*, yaitu bagian dari permukaan bakteri yang berbentuk batang dan disusun oleh protein (Brunder, 2001). Sebagian besar dari *fimbriae* yang telah diteliti mengandung sejumlah besar residu asam amino hidrofobik. Oleh karena itu *fimbriae* mengambil peranan untuk membentuk hidrofobisitas permukaan sel. Hidrofobisitas dari permukaan sel tersebut sangat diperlukan dalam perlekatan bakteri karena keadaan hidrofobik tersebut akan mengatasi gaya tolak menolak antara sel bakteri dengan sel hos yang sama-sama bermuatan negatif (Donlan, 2002).

Bakteri dengan *fimbriae* di permukaan tubuhnya mampu mengadakan hemaglutinasi eritrosit (Deneke et al., 1979). Hemaglutinin bakterial yang menyebabkan aglutinasi eritrosit diduga berperan aktif dalam perlekatan bakteri pada mukosa usus

karena membran eritrosit diyakini mempunyai homologi dengan substansi mukosa yang terlibat dalam proses perlekatan (Alam et al., 1997). Oleh karena itu uji hemaglutinasi dipandang sebagai suatu model *in vitro* untuk mengetahui adanya peranan *fimbriae* dalam proses perlekatan (Evans et al., 1977).

Pada penelitian ini dilakukan uji hemaglutinasi terhadap *crude protein fimbriae* bakteri EHEC O157 untuk membuktikan adanya peranan *fimbriae* dari bakteri tersebut pada proses perlekatan. Menurut penelitian Brooks et al., (1989) baik *crude protein fimbriae* maupun *purified protein fimbriae* menunjukkan hasil uji hemaglutinasi yang tidak berbeda. Pada penelitian ini reaksi hemaglutinasi mulai tampak secara visual pada titer $1/32$ sampai titer $1/64$ (gambar 5.2). Mengingat titer hemaglutinasi ditentukan berdasarkan pengenceran maksimal yang menunjukkan gambaran aglutinasi secara visual (Mayer, G., 2003), maka dalam penelitian ini titer hemaglutinasi untuk *crude protein fimbriae* adalah $1/64$. Berdasarkan hasil tersebut maka dapat disimpulkan bahwa *crude protein fimbriae* bakteri EHEC O157 mengandung hemagglutinin bakterial yang diduga berperan aktif dalam perlekatan bakteri pada mukosa usus.

Untuk mendukung hasil uji hemaglutinasi tersebut pada penelitian ini dilakukan SDS-PAGE terhadap *crude protein fimbriae*, eritrosit, endapan aglutinat *crude protein fimbriae*, serta supernatan aglutinat *crude protein fimbriae* (gambar 5.4). Dari gambaran SDS-PAGE tersebut nampak adanya pita protein dari *crude protein fimbriae* dengan berat molekul berkisar 31 kDa dan 24 kDa pada endapan aglutinat *crude protein fimbriae*. Hal ini menunjukkan bahwa protein berat molekul 31 kDa dan 24 kDa melekat pada eritrosit karena memiliki reseptor di permukaan eritrosit. Diduga kedua protein tersebut merupakan hemagglutinin bakterial yang berperan aktif dalam perlekatan bakteri

EHEC O157 pada enterosit, mengingat membran eritrosit diyakini memiliki homolog dengan substansi mukosa usus yang terlibat dalam perlekatan bakteri (Alam et al., 1997).

Perlekatan bakteri pada permukaan mukosa berperan penting pada proses infeksi (Sokurenko et al., 1995). *Type-1 fimbriae* adalah penentu virulensi penting yang diekspresikan pada *E. coli* (Jones et al., 1996). *Type-1 fimbriae* ini juga dikatakan sebagai *mannose sensitive* karena *exogenous mannose* dapat memblokir ikatan pada reseptor sel darah merah (Arthur et al., 1989). *Type-1 fimbriae* disusun oleh subunit struktural mayor Fim A, dan sejumlah subunit minor seperti Fim F, Fim G, dan Fim H (Sokurenko et al., 1995). Subunit Fim H dengan berat molekul berkisar 28-31 kDa terletak pada ujung atau menyisip di sepanjang *fimbriae*. Pada penelitian ini, apabila diamati dari sisi intensitas warna pita protein pada gel SDS PAGE, di antara kedua pita protein tersebut maka pita protein dengan berat molekul 24 kDa tampak lebih jelas bahkan paling dominan di antara pita protein yang lain (gambar 5.4 sumur 1). Hal ini tidak jauh berbeda dengan penemuan Maneval et al., (2003) yang menunjukkan pita protein dominan dari protein *fimbriae* EHEC O157:H7 adalah pita protein dengan berat molekul 21 kDa. Kemungkinan protein tersebut merupakan subunit mayor *fimbriae* yang menyusun struktur batang *fimbriae* yang besar. Menurut Ham et al., (1995), dalam berbagai sistem *fimbriae*, subunit mayor membentuk struktur batang *fimbriae* sedangkan subunit minor sebagai protein adhesin, keduanya merupakan 2 molekul yang berbeda dimana protein adhesin terletak di ujung *fimbriae* atau dalam jumlah sedikit di sepanjang struktur *fimbriae*. Kadangkala subunit mayor pun dapat merupakan protein adhesin. Dalam penelitian ini diperoleh hasil adanya 2 protein dengan berat molekul yang berbeda. Diduga protein dengan berat molekul 24 kDa yang tampak dominan merupakan subunit mayor sedangkan protein dengan berat

molekul 31 kDa merupakan protein adhesin yang mungkin berada di ujung *fimbriae* atau dalam jumlah sedikit di sepanjang struktur *fimbriae*. Namun menurut hasil analisis SDS-PAGE di atas, protein dengan berat molekul 24 kDa tersebut selain diduga sebagai penyusun struktur batang *fimbriae*, protein tersebut juga merupakan protein adhesin. Untuk mendapatkan kepastian tentang hal itu maka perlu dilakukan penelitian lanjutan berupa uji hambatan hemagglutinasi dengan *exogenous mannose* untuk menentukan tipe *fimbriae* dan pemurnian protein dengan berat molekul 31 kDa dan 24 kDa dilanjutkan dengan *immunoblotting*.

Setelah ditemukan adanya hemagglutinin bakterial dalam *crude protein fimbriae* selanjutnya dilakukan uji adhesi untuk membuktikan adanya pengaruh konsentrasi *crude protein fimbriae* bakteri EHEC O157 terhadap indeks adhesi bakteri tersebut. Pada uji adhesi ini digunakan enam perlakuan konsentrasi *crude protein fimbriae*, yaitu konsentrasi 0 (kontrol), konsentrasi $1/16$, konsentrasi $1/8$, konsentrasi $1/4$, konsentrasi $1/2$, dan konsentrasi 1 yang disalutkan pada sel enterosit kelinci sebelum direaksikan dengan bakteri EHEC O157. Penyalutan dengan *crude protein fimbriae* bakteri EHEC O157 ini dimaksudkan untuk menjenuhi reseptor yang terlibat pada proses adhesi sehingga yang diharapkan adalah efek inhibisi dari percobaan tersebut (Nagayama et al., 1995). Dari rekaman gambar 5.5 sampai 5.8 tampak adanya penurunan yang nyata dari jumlah bakteri yang melekat pada sel enterosit dengan makin meningkatnya konsentrasi. Hasil uji regresi linier sederhana menunjukkan adanya pengaruh konsentrasi *crude protein fimbriae* terhadap indeks adhesi bakteri EHEC O157 yang ditunjukkan oleh nilai F 78,852 dengan tingkat signifikansi 0,000 dan persamaan regresi $y = 8,034 - 8,285x$. Hal ini berarti bahwa dengan makin meningkatnya konsentrasi, makin banyak protein yang

menjenuhi reseptor sehingga makin sedikit sel bakteri EHEC O157 yang mampu melekat pada sel enterosit atau dengan kata lain mencegah perlekatan bakteri pada sel enterosit. Hal ini mengindikasikan adanya reseptor khusus pada sel enterosit kelinci terhadap *crude protein fimbriae* EHEC O157. Dengan demikian *crude protein fimbriae* bakteri EHEC O157 berperan aktif dalam perlekatan bakteri tersebut pada enterosit.

6.2 Pengaruh Konsentrasi Lipopolisakarida Terhadap Indeks Adhesi Bakteri EHEC O157

Selain *fimbriae*, faktor perlekatan yang sering dimiliki oleh bakteri enteropatogen adalah lipopolisakarida (LPS) (Paton and Paton, 1998). Bukti-bukti yang telah terkumpul menunjukkan bahwa LPS yang berada di *outer membrane* dari bakteri gram negatif berperan dalam proses perlekatan mikroorganisme tersebut pada sel fagosit nonprofesional termasuk sel mukosa (Jacques, 1996). Pernyataan tersebut didukung oleh bukti adanya perbedaan adhesi antara bakteri dengan LPS yang dimutasikan dengan bakteri normal. Selain itu didukung pula oleh bukti bahwa LPS yang diekstraksi dari bakteri dapat menghambat adhesi bakteri. Sebagian besar penelitian yang telah dilakukan bertujuan untuk menentukan residu polisakarida yang merupakan bagian dari LPS karena bagian lipid A dari LPS tersisip di dalam *outer membrane* (Abraham et al., 1999).

Bukti peranan LPS pada proses perlekatan bakteri ditunjukkan oleh penelitian bahwa LPS *Vibrio mimicus* yang diisolasi (khususnya bagian polisakarida) menyebabkan hemaglutinasi eritrosit kelinci. Sebagaimana penjelasan terdahulu, hemaglutinin bakterial yang menyebabkan aglutinasi eritrosit diduga berperan aktif dalam perlekatan bakteri pada mukosa usus karena membran eritrosit diyakini mempunyai homologi dengan substansi mukosa usus yang terlibat dalam proses perlekatan (Alam et al., 1997).

Pada penelitian ini dilakukan uji hemaglutinasi terhadap LPS bakteri EHEC O157 untuk membuktikan adanya peranan LPS dari bakteri tersebut pada proses perlekatan. Hasil penelitian menunjukkan terjadinya reaksi hemaglutinasi pada LPS EHEC O157 dan pada LPS pembanding yang diambil dari *E. coli* O127 (SIGMA) (gambar 5.3) yang berarti bahwa di dalam LPS bakteri EHEC O157 mengandung hemaglutinin bakterial yang diduga berperan aktif dalam perlekatan bakteri pada mukosa usus.

Berbeda halnya dengan *crude protein fimbriae*, uji hemaglutinasi pada LPS tidak dapat diikuti dengan analisis menggunakan SDS-PAGE untuk menentukan perkiraan berat molekul unsur LPS yang berperan pada perlekatan bakteri. Hal ini disebabkan larutan SDS tidak dapat memisahkan LPS dengan baik. Para peneliti menduga perlekatan diperankan oleh *O side chain* yang merupakan unsur polisakarida dari LPS.

Setelah ditemukan adanya hemaglutinin bakterial dalam LPS selanjutnya dilakukan uji adhesi untuk membuktikan adanya pengaruh konsentrasi LPS bakteri EHEC O157 terhadap indeks adhesi bakteri tersebut. Pada uji adhesi ini digunakan enam perlakuan konsentrasi LPS yaitu konsentrasi 0 (kontrol), konsentrasi $\frac{1}{16}$, konsentrasi $\frac{1}{8}$, konsentrasi $\frac{1}{4}$, konsentrasi $\frac{1}{2}$, dan konsentrasi 1 yang disalutkan pada enterosit kelinci sebelum direaksikan dengan bakteri EHEC O157. Sebagaimana penyalutan dengan *crude protein fimbriae*, penyalutan dengan LPS bakteri EHEC O157 ini dimaksudkan untuk menjenuhi reseptor yang terlibat pada proses adhesi sehingga yang diharapkan adalah efek inhibisi dari percobaan tersebut (Nagayama et al., 1995). Dari rekaman gambar 5.9 sampai 5.12 tampak adanya penurunan yang nyata dari jumlah bakteri yang melekat pada sel enterosit dengan makin meningkatnya konsentrasi. Hasil uji regresi linier sederhana menunjukkan adanya pengaruh konsentrasi LPS terhadap indeks adhesi bakteri

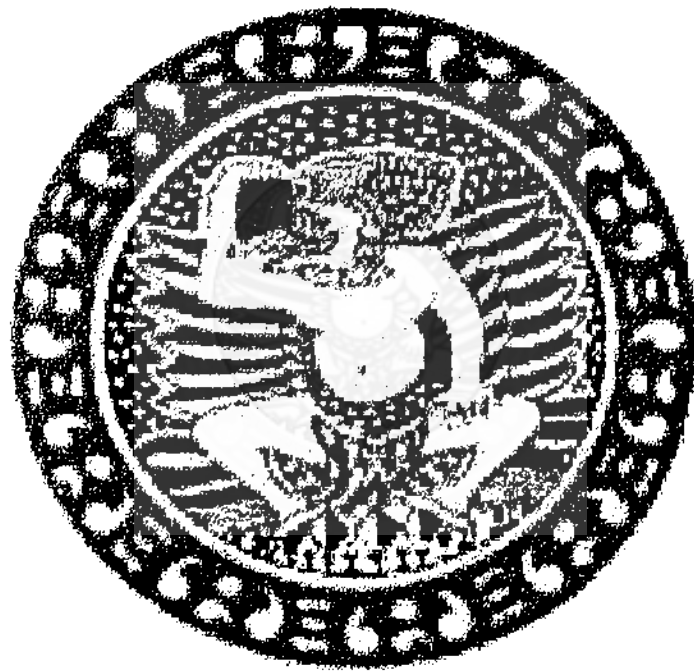
EHEC O157 yang ditandai dengan nilai F sebesar 97,315 dengan tingkat signifikansi 0,000 dan persamaan regresi $y = 9,040 - 9,997x$. Hal ini berarti bahwa dengan makin meningkatnya konsentrasi, makin banyak protein yang menjenuhi reseptor sehingga makin sedikit sel bakteri EHEC O157 yang mampu melekat pada sel enterosit atau dengan kata lain mencegah perlekatan bakteri pada sel enterosit. Hal ini mengindikasikan adanya reseptor khusus pada sel enterosit kelinci terhadap LPS EHEC O157. Dengan demikian LPS bakteri EHEC O157 berperan aktif dalam perlekatan bakteri tersebut pada enterosit.

6.3 Peranan *Protein Fimbriae* Dan Lipopolisakarida Terhadap Proses Perlekatan Bakteri EHEC O157

Sebagian besar bakteri patogen memiliki banyak molekul (adhesin) yang berperan dalam perlekatan pada sel hos dan matriks ekstraseluler. Adhesin tersebut seringkali bekerja secara sinergistik, sehingga meningkatkan kemampuan sel bakteri dalam melekat. Selain itu adhesin tersebut dapat diatur sedemikian rupa sehingga adhesin tertentu diekspresikan dalam kondisi lingkungan yang berbeda dengan ekspresi adhesin yang lain. Tidak semua adhesin merupakan faktor virulensi yang penting, dan peranan spesifik dari tiap-tiap adhesin sulit untuk dijelaskan karena keberadaan *multiple adherence factors* pada sebagian besar bakteri patogen. Banyak adhesin ditemukan baik pada strain non patogenik dan strain yang virulen. Namun demikian, pada sebagian besar kasus, adhesin berperan dalam terjadinya penyakit karena meningkatkan virulensi bakteri patogen. Jika lebih dari satu adhesin dihilangkan dari bakteri patogen, maka efek terhadap penurunan virulensi dari bakteri tersebut pada umumnya lebih jelas dibandingkan dengan jika satu adhesin yang dihilangkan (Finlay, 2002).

Hasil penelitian ini membuktikan adanya hemagglutinin bakterial pada bakteri EHEC O157 yang berasal dari fraksi *fimbriae* dan dari LPS. Hal ini menunjukkan bahwa pada bakteri EHEC O157 terdapat *multiple adherence factors* yang terdiri dari *outer membrane protein* (intimin) yang telah ditemukan lebih dulu, *fimbriae*, dan LPS. Penemuan ini sesuai dengan pendapat Paton and Paton, 1998 bahwa faktor perlekatan yang dimiliki oleh bakteri intestinal patogen selain *outer membrane protein* adalah *fimbriae* dan LPS. Diduga ketiga faktor perlekatan tersebut bekerja secara sinergis sehingga bermanfaat untuk meningkatkan kemampuan bakteri dalam melekat di permukaan sel enterosit hos.

Berdasarkan analisis statistik pada Bab 5, dapat ditarik kesimpulan bahwa pengaruh konsentrasi LPS terhadap indeks adhesi bakteri EHEC O157 hampir sama atau sedikit lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi *crude protein fimbriae*. Analisis sementara mengenai hal ini adalah bahwa sejumlah besar adhesin adalah spesifik terhadap karbohidrat dan dikenal sebagai lektin. Lektin ini akan mengikatkan bakteri ke unsur karbohidrat dari glikoprotein atau glikolipid yang terdapat pada sel epitel atau sel lain dari hos. Contoh ikatan lektin-karbohidrat adalah lektin (*type 1 fimbriae*) dengan reseptor glikoprotein (uroplakin pada sel kandung kemih). Pada umumnya afinitas gula terhadap adhesin lektin rendah dalam rentang milimolar (Abraham et al., 1999). Sehingga apabila sel epitel disalut dengan adhesin lektin maka ikatan antara keduanya mudah lepas dan memungkinkan bakteri untuk menempati reseptor adhesin. Namun demikian masih diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai ikatan protein *fimbriae* dan LPS dengan masing-masing reseptornya.



BAB 7**KESIMPULAN DAN SARAN****7.1 KESIMPULAN**

Dari analisis hasil penelitian dan pembahasan dapat dibuat kesimpulan yang berkaitan dengan hipotesis dalam rangka menjawab rumusan masalah, sebagai berikut. *Crude protein fimbriae* dan lipopolisakarida (LPS) dari bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) O157 mengandung adhesin. Adhesin pada *crude protein fimbriae E. coli* O157 diduga diperankan oleh protein dengan berat molekul 31 kDa dan 24 kDa. Sedangkan adhesin pada LPS diduga diperankan oleh *O side chain region*. *Crude protein fimbriae* dan LPS *E. coli* O157 yang mengandung adhesin berperan terhadap proses perlekatan bakteri tersebut pada enterosit. Dengan demikian disimpulkan bahwa pada bakteri *Escherichia coli* O157 terdapat *multiple adherence factors* yang terdiri dari intimin (yang telah ditemukan lebih dahulu), *fimbriae*, dan LPS.

Berdasarkan kesimpulan tersebut, maka hipotesis penelitian ini terbukti.

7.2 SARAN

Mengingat segala keterbatasan dalam penelitian ini maka perlu penelitian lebih lanjut di antaranya :

1. Untuk mempermudah penentuan berat molekul protein adhesin pada *fimbriae*, maka untuk penelitian serupa lebih baik apabila dilakukan pemurnian terhadap protein *fimbriae*.
2. Untuk menentukan tipe *fimbriae Escherichia coli (E. coli) O157* dilakukan uji hambatan hemaglutinasi dengan *mannose*.
3. Melalui penelitian ini belum dapat dibuktikan adanya adhesin yang non hemaglutinin, dengan demikian perlu dilakukan penelitian tentang kemungkinan keberadaan adhesin *E. coli O157* yang non hemaglutinin.
4. Perlu dilakukan penelitian untuk generalisasi *E. coli O157* atas kepemilikannya terhadap protein adhesin 31 kDa dan 24 kDa dari isolat yang diambil dari berbagai daerah.
5. Untuk mengetahui lebih dalam tingkat kekuatan ikatan antara adhesin yang diperankan oleh *crude protein fimbriae* dibanding dengan lipopolisakarida (LPS) terhadap reseptornya masing-masing, perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai substansi yang berperan dalam perlekatan baik dari sudut adhesin maupun dari sisi reseptornya.
6. Supaya hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan sebagai perangkat diagnostik maupun pencegahan perlu dilakukan uji imunogenisitas dan protektivitas dari adhesin *E. coli O157* baik intimin, *fimbriae*, maupun LPS.



DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, S.M., Sharon, N., Ofek, I., 1999, **Adhesion of Bacteria to Mucosal Surfaces**, In *Mucosal Immunology*, Academic Press, p. 31-42.
- Alam, M., Miyoshi, S., Tomochika, K., and Shinoda, S., 1997, ***Vibrio mimicus* Attaches to the Intestinal Mucosa by Outer Membrane Hemagglutinins Specific to Polypeptide Moieties of Glycoproteins**, *Infect.Immun* Vol. 65 No. 9, p. 3662-3665.
- Arthur, M., Johnson, C.E., Rubin, R.H., Arbeit, R.D., Campanelli, C., Kim, C., Steinbach, S., Agarwal, M., Wilkinson, R., Goldstein, R., 1989, **Molecular Epidemiology of Adhesin and Hemolysin Virulence Factor among Uropathogenic *Escherichia coli***, *Infect.Immun* Vol. 57, p. 303-313.
- Baron, E.J., Peterson, L.R., Finegold, S.M., 1994, **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**, Mosby, USA, p. 69.
- Bilge, S.S., Vary, J.C., Dowell, S.F., Tarr, P.I., 1996, **Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O Side Chain in Adherence and Analysis of an rfb Locus**, *Infect. Immun.* Vol 64 No.11, p. 4795-4801.
- Brooks, D.E., Cavanagh, J., Jayroe, D., Janzen, J., Snock, R., and Trust, T.J., 1989, **Involvement of the MN Blood Group Antigen in Shear-Enhanced Hemagglutination Induced by the *Escherichia coli* F41 Adhesin**, *Infect.Immun* Vol. 57 No. 2, p. 377-383.
- Brunder, W., Khan, A.S., Hacker, J., and Karch, H., 2001, **Novel Type of Fimbriae Encoded by the Large Plasmid of Sorbitol-Fermenting Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H₇**, *Infect.Immun* Vol.69 No.7, p. 4447-4457.
- Butterton, J.R., and Calderwood, S.B., 1998, **Live Oral Attenuated Vaccine Vectors For Prevention of Shiga Toxin – Producing *Escherichia coli* Infection**, In *Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga Toxin – Producing E. coli strains* edited by Kaper, J.B., and O' Brien, A.D., American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 423-430.

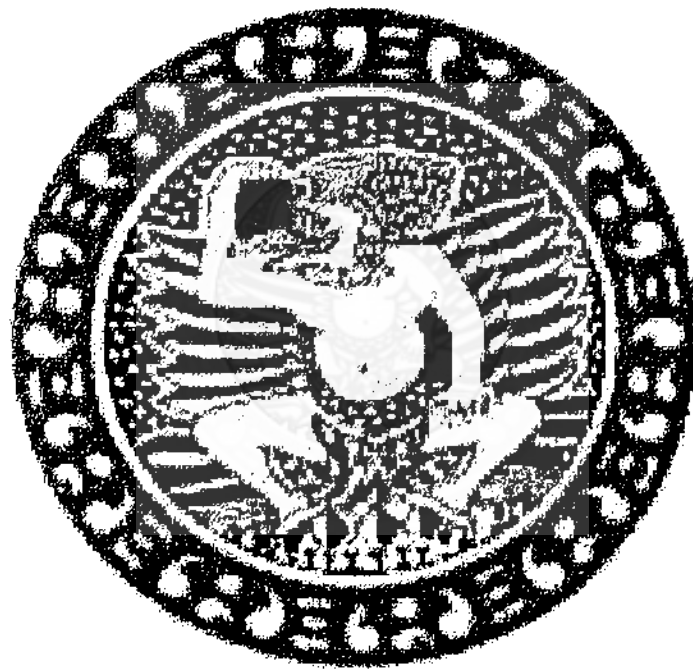
- Chart, H., Smith, H.R., Scotland, S.M., Rowe, B., Milford, D.V., and Taylor, C.M., 1991, **Serological identification of *Escherichia coli* O157:H7 infection in hemolytic uraemic syndrome**, *Lancet* 337, p. 138-140.
- Chisholm, K., Farace, A., Lasher, C., 2002, **Bacterial Cell Wall Composition**, The University of Georgia, p. 2.
- Davidson, M.W., 1995, **Molecular Expressions Cell Biology Structure of Cells & Viruses**, Florida State University, p. 1-4.
- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., 1990, **Microbiology 4th ed**, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, p. 24-25.
- Deneke, C.F., Thorne, G.M., and Gorbach, S.L., 1979, **Attachement Pili from Enterotoxigenic *Escherichia coli* Pathogenic for Humans**, *Infect.Immun* Vol. 26 No.1, p. 362-368.
- Donlan, R.M., 2002, **Biofilms: Microbial Life on Surfaces**, *Emerging Infectious Diseases* Vol. 8 No. 9, p.883.
- Du, L., Pellen-Mussi, P., Chandad, F., Mouton, C., and Bounnaure-Mallet, M., 1997, **Fimbriae and the Hemagglutinating Adhesin HA-Ag2 Mediate Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to Epithelial Cells**, *Infect.Immun* Vol. 65 No. 9, p. 3875-3881.
- Durno, C., Soni, R., Sherman, P., 1989, **Adherence of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157:H7 to isolated epithelial cells and brush border membranes in vitro: role of type I fimbriae (pili) as a bacterial adhesin expressed by strain CL-49**, *Clin. Invest. Med.* 12, p. 194-200.
- Ehara, M., Ishibashi, M., Iwami, M., Ichinose, Y., Shimotori, S., Supawat, K., Chiewslip, D., Tansupousawadikul, S., 1989, **Purification and Characterization of Fimbriae of *Vibrio cholerae* O1, Classical Biotype, Inaba Serotype**, *Trop. Med.*, 31 (1), p. 7-16.
- Evans, D.G., Evans Jr, D.J., and Tjoa, W., 1977, **Hemagglutination of Human Group A Erythrocytes by Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Adults with Diarrhea : Correlation with Colonization Factor**, *Infect.Immun* Vol. 18 No. 3, p. 330-337.
- Finlay, B.B., and Caparen, M., 2000, **Bacterial Adherence to Cell Surfaces and Extracellular Matrix**, in *Cellular Microbiology*, ASM Press, p. 67-80.

- Fukushima, H., Hoshina, K., Gomyoda, M., 2000, **Selective Isolation of eae-Positive Strains of Shiga Toxin – Producing *Escherichia coli***, Journal of Clinical Microbiology Vol. 38 No.4, p. 1684-1687.
- Gonzalez, R., Diaz, C., Marino, M., Cloralt, R., Pequenezze, M., Perez-Schael, I., 1997, **Age-Specific Prevalence of *Escherichia coli* with Localized and Aggregative Adherence in Venezuelan Infants with Acute Diarrhea**, J of Clin Microbiology, 35, p. 1103-1107.
- Ham, S.M., Alphen, L., Mooi, F.R., and Putten, J.P.M., 1995, **Contribution of the Major and Minor Subunits to Fimbriae-Mediated Adherence of *Haemophilus influenzae* to Human Epithelial Cells and Erythrocytes**, Infect.Immun Vol. 63 No. 12, p. 4883-4889.
- Hanne, L.F. and Findkelstein , R.A., 1982, **Characterization and distribution of the hemagglutinins produced by *Vibrio cholerae***, Infec. Immun. Vol. 36, p. 209-214.
- Hernandez, A.M., Gavilanes-Parra, S., Chavez-Berrocal, M., Molina-Lopez, J., Cravioto, A., 1997, **Binding of Diarrheagenic *Escherichia coli* to 32 to 33 Kilodalton Human Intestinal Brush Border Proteins**, Infect Immun. Vol. 65, p. 4494-4501.
- Hollingsworth, J., and Kaplan, B., 1998, **Food Safety in the United States**, In: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin – Producing E. coli strains edited by Kaper, J.B., and O' Brien, A.D., American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 109-118.
- Jacques, M., 1996, **Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence**, Trends Microbiol. 4, p. 408-410.
- Joklik, W.K., Willet, H.P., Amos, D.B., Wilfert, C.M., 1988, **Zinsser Microbiology 19th ed**, Appleton & Lange , USA, p.459.
- Jones, C.H., Dodson, K., Hultgren, S.J., 1996, **Structure, Function, and Assembly of Adhesive P Pili**, in : Mobley H.L.T., and Warren, J.W., *Urinary Tract Infection : Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, ASM, Washington DC, p. 175-219.
- Kaiser, G.E., 1998, **Bacterial Pathogenesis: Bacterial Factors that Promote Colonization**, Doc Kaiser's Microbiology Home Page, p. 1-2.

- Kaper, J.B., O'Brien, A.D., 1998, ***Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin Producing *E. coli* Strains**, American Society for Microbiology, Washington, D.C., p.15-81.
- Karch, H., Meyer, T., Russmann, H., and Heesemann, J., 1992, **Frequent loss of Shiga – like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation**, Infect Immun 60, p. 3464-3467.
- Krejany, E.O., Grant, T.V., Bennett-Wood, V., Adams, L.M., Robins-Browne, R.M., 2000, **Contribution of Plasmid – Encoded Fimbriae and Intimin to Capacity of Rabbit-Specific Enteropathogenic *Escherichia coli* to Attach to and Colonize Rabbit Intestine**, Infect Immun 68 (11), p. 6472-6477.
- MacLeod, D.L., and Gyles, C.L., 1991, **Immunization of pigs with a purified Shiga -like toxin II variant toxoid**, Vet. Microbiol. 29, p. 309-318.
- Maneval, D.R., Nataro, J.P., Levine, M.M., 2003, **Identification of a novel fimbrial antigen in EHEC**, Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, p. 1.
- Martino, P.D., Bertin, Y., Girardeau, J.P., Livrelli, V., Joly, B., Michaud, A.D., 1995, **Molecular Characterization and Adhesive Properties of CF29K, an Adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains Involved in Nosocomial Infections**, Infect Immun, 63 (11) p. 4336-4344.
- Mayer, G., 2003, **Immunoglobulins-Antigen-Antibody Reactions And Selected Test**, University of South Carolina, p. 1-10.
- Mcgarrey, D.J., and Alfred, D.R., 1994, **Characterization of Hemagglutinating Component on the *Anaplasma marginale* Initial Body Surface and Identification of Possible Adhesins**, Infect Immun 62 (10) p. 4587-4593.
- Nagayama, K., Oguchi, T., Arita, M., Honda, T., 1995, **Purification and Characterization of A Cell Associated Haemagglutinin of *Vibrio parahaemolyticus***, Infect. and Immun 63 (5) : 1987-1992.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998, **Diarrheagenic *Escherichia coli***, Clinical Microbiology Reviews, American Society for Microbiology, p.144,169-170.
- Ofek, I., Goldhar, J., Keisari, Y., and Sharon, N., 1995, **Nonopsonic phagocytosis of microorganisms**, Annu. Rev. Microbiol, 49, p. 239 – 276.

- Paton, J.C., Paton, A.W., 1998, **Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections**, Clinical Microbiology Reviews, American Society for Microbiology, p.7-10.
- Peni, M., 1998, Nilai Diagnostik Tebal Lipat Subskapular (TLL-Ss) Pada Aterosklerosis Praklinik, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya, p.
- Ryley, H.C., 2000, **Bacterial Pathogenesis Invasion of the Host**, University of Wales College of Medicine Department of Medical Microbiology, p.1-5.
- Salyers A.A., and Whitt, D.D., 1994, **Bacterial Pathogenesis : A Molecular Approach**, American Society for Microbiology Press, Washington D.C., p. 30-46.
- Sanarto, S., Winarsih, S., Sumarno, 1999, **Protein Hemagglutinin 36 kDa OMP *Salmonella typhi***, Majalah Kedokteran Universitas Brawijaya Malang Vol. XV No.3 , p.87-93.
- Sanarto, S., 2002, **Protein Adhesin *Salmonella typhi* Sebagai Faktor Virulensi Berpotensi Imunogenik Terhadap Produksi S-IgA Protektif**, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya, p. 21, 32.
- Sokurenko, E.V., Courtney, H.S., Maslow, J., Siitonen, A., and Hasty, D.L., 1995, **Quantitative Differences in Adhesiveness of Type 1 Fimbriated *Escherichia coli* Due to Structural Differences in fimH Genes**, Journal of Bacteriology Vol. 177 No. 13, p. 3680-3686.
- Steel, R.G.D., and Torrie, J.H., 1993, **Prinsip dan Prosedur Statistika, suatu pendekatan biometrik**, Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, p.280-283.
- Sumarno, 2000, **Karakterisasi Molekul Protein Adhesi *Vibrio cholerae* O1 M094V dan Protein Reseptornya Pada Sel Epithel Usus Halus Tikus Putih (Wistar)**, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya, p. 80.
- Sunoto, 1990, Buku Ajar Diare, Departemen Kesehatan RI, Ditjen PPM & PLP, p. 1- 5.
- Todar, K., 2002, **Mechanisms of Bacterial Pathogenicity : Colonization and Invasion**, University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, p. 1-8.
- Todar, K., 2002, **Mechanisms of Bacterial Pathogenicity : Endotoxins**, University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, p. 1-7.

- Todar, K., 2002, **Bacterial Structure In Relationship To Pathogenicity**, University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, p. 5.
- Ward, J.B., 1980, **The microbial cell surface and adhesion**. In: Microbial adhesion to surfaces 1st edition, Society of chemical industri, London, p. 48-66.
- Westerman, R.B., He Y., Keen, J.E., Littlelike, E.T., Kwang, J., 1997, **Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific for the Lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157**, Journal of Clinical Microbiology Vol. 35 No. 3, p.679-684.
- Winarsih, S., Sumarno, Roekistiningsih, 1997, **Kajian Fungsi dan Sifat Immunogenisitas Protein Hemagglutinin 32 kDa & 20 kDa pada *Helicobacter pylori***, Majalah Kedokteran Universitas Brawijaya Malang Vol. XIII No. 3, p. 135-141.
- Wizemann, T.M., Adamoum J.E., and Langermann, S., 1999, **Adhesins as Targets for Vaccine Development**, Centers for Disease Control and Prevention, USA, p. 1-15 .



Lampiran 1 Jadwal Kegiatan Penelitian

Kegiatan	Jan	Peb	Mar	Apr	Mei	Jun
1. Persiapan	X					
2. Isolasi crude protein <i>fimbriae</i> , OMP, dan LPS		X				
3. Uji hemaglutinasi		X	X			
4. Uji adhesi		X	X			
5. Penghitungan indeks adhesi			X	X		
6. SDS-PAGE				X		
7. Dokumentasi					X	
8. Analisis data dan pembahasan					X	X

Lampiran 2. Hasil identifikasi *E. coli* dengan Microbact system

Lab. No. S695 Dr Dewi		MICROBACT 12E & 12A (Single Strip) PATIENT RECORD													
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	O.N.P.G.	Indole	Urease	V.P.	Citrate	T.D.A.
Result			+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Reaction Index				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				6			7			6			0		

Patient's Name

Code No.

Specimen Type

Date *E. coli***Microbact**Medvet Science Pty. Ltd.
Australide Australia

Final Identification 95,62%

Lampiran 3. Hasil indeks adhesi EHEC O157 pada enterosit kelinci disalut *crude protein fimbriae*

Konsentrasi	Slide	Ulasan-1 per 100 sel	Ulasan -2 per 100 sel	Rerata per 100 sel	Rerata per sel
0 (kontrol)	1	764	922	843	8,43
	2	1206	1162	1184	11,84
	3	1264	1700	1482	14,82
	4	1502	1519	1510	15,10
	5	1279	1319	1299	12,99
	6	1187	1172	1179	11,79
	7	1322	1371	1346	13,46
	8	1259	1242	1250	12,50
	9	1366	1312	1339	13,39
	10	1236	1229	1232	12,32
	11	1233	1203	1218	12,18
	12	1349	1450	1399	13,99
				Rerata:	12,73
1/16 (0,0625)	1	725	669	697	6,97
	2	643	733	688	6,88
	3	586	784	685	6,85
	4	763	645	704	7,04
	5	510	762	636	6,36
	6	686	652	669	6,69
	7	722	762	742	7,42
	8	683	733	708	7,08
	9	822	972	897	8,97
	10	630	608	619	6,19
	11	536	556	546	5,46
	12	674	706	690	6,90
				Rerata :	6,90
1/8 (0,1250)	1	689	627	658	6,58
	2	635	609	622	6,22
	3	596	692	644	6,44
	4	462	502	482	4,82
	5	521	573	547	5,47
	6	599	615	607	6,07
	7	565	577	571	5,71
	8	475	523	499	4,99
	9	491	443	467	4,67
	10	482	524	503	5,03
	11	484	498	491	4,91
	12	456	528	492	4,92
				Rerata :	5,49

Konsentrasi	Slide	Ulasan -1 per 100 sel	Ulasan - 2 per 100 sel	Rerata per 100 sel	Rerata per sel
1 / 4 (0,2500)	1	288	302	290	2,90
	2	296	298	297	2,97
	3	433	397	415	4,15
	4	513	467	490	4,90
	5	443	461	452	4,52
	6	342	424	383	3,83
	7	267	245	256	2,56
	8	345	267	306	3,06
	9	423	395	409	4,09
	10	433	375	404	4,04
	11	330	276	303	3,03
	12	441	369	405	4,05
				Rerata :	3,67
1 / 2 (0,5000)	1	263	281	272	2,72
	2	169	187	178	1,78
	3	168	180	174	1,74
	4	253	195	224	2,24
	5	185	217	201	2,01
	6	164	146	155	1,55
	7	92	86	89	0,89
	8	90	68	79	0,79
	9	148	112	130	1,30
	10	279	173	226	2,26
	11	135	123	129	1,29
	12	233	183	208	2,08
				Rerata :	1,72
1	1	211	225	218	2,18
	2	195	183	189	1,89
	3	142	205	173	1,73
	4	135	161	148	1,48
	5	183	124	153	1,53
	6	223	157	190	1,90
	7	228	234	231	2,31
	8	158	173	165	1,65
	9	124	102	113	1,13
	10	112	139	125	1,25
	11	149	96	122	1,22
	12	95	171	133	1,33
				Rerata :	1,63

Lampiran 4. Hasil indeks adhesi EHEC O157 pada enterosit kelinci disalut LPS

Konsentrasi	Slide	Ulasan-1 per 100 sel	Ulasan -2 per 100 sel	Rerata per 100 sel	Rerata per sel
0 (kontrol)	1	1378	1453	1415	14,15
	2	1317	1411	1364	13,64
	3	1379	1385	1382	13,82
	4	1470	1452	1461	14,61
	5	1734	1684	1709	17,09
	6	1354	1410	1382	13,82
	7	1377	1350	1363	13,63
	8	1327	1373	1350	13,50
	9	1736	1710	1723	17,23
	10	1696	1723	1709	17,09
	11	1313	1326	1319	13,19
	12	1315	1324	1319	13,19
				Rerata:	14,58
1/16 (0,0625)	1	586	745	665	6,65
	2	723	669	696	6,96
	3	603	525	564	5,64
	4	759	763	761	7,61
	5	629	640	634	6,34
	6	606	632	619	6,19
	7	633	759	696	6,96
	8	593	629	611	6,11
	9	720	631	675	6,75
	10	600	672	636	6,36
	11	693	701	697	6,97
	12	640	697	668	6,68
				Rerata :	6,60
1/8 (0,1250)	1	681	618	649	6,49
	2	522	559	540	5,40
	3	423	557	490	4,90
	4	573	556	564	5,64
	5	561	580	570	5,70
	6	614	576	595	5,95
	7	586	605	595	5,95
	8	433	489	461	4,61
	9	599	569	584	5,84
	10	466	489	477	4,77
	11	599	639	619	6,19
	12	659	587	623	6,23
				Rerata :	5,64

Konsentrasi	Slide	Ulasan –1 per 100 sel	Ulasan – 2 per 100 sel	Rerata per 100 sel	Rerata per sel
1 / 4 (0,2500)	1	493	512	502	5,02
	2	623	599	611	6,11
	3	481	561	521	5,21
	4	602	582	592	5,92
	5	536	497	516	5,16
	6	596	572	584	5,84
	7	546	555	550	5,50
	8	569	601	585	5,85
	9	482	499	490	4,90
	10	498	446	472	4,72
	11	441	491	466	4,66
	12	423	518	470	4,70
				Rerata :	5,29
1 / 2 (0,5000)	1	223	192	207	2,07
	2	205	211	208	2,08
	3	196	187	191	1,91
	4	220	191	205	2,05
	5	296	272	284	2,84
	6	199	204	201	2,01
	7	126	142	134	1,34
	8	205	246	225	2,25
	9	187	194	190	1,90
	10	105	136	120	1,20
	11	200	176	188	1,88
	12	237	225	231	2,31
				Rerata :	1,99
1	1	137	149	143	1,43
	2	124	162	143	1,43
	3	50	85	67	0,67
	4	77	94	85	0,85
	5	57	57	57	0,57
	6	38	19	28	0,28
	7	76	80	78	0,78
	8	51	72	61	0,61
	9	113	109	111	1,11
	10	22	32	27	0,27
	11	72	75	73	0,73
	12	39	45	42	0,42
				Rerata :	0,76

Lampiran 5. Hasil uji t berpasangan antara indeks adhesi ulasan 1 dan ulasan 2

Konsentrasi		<i>Crude protein fimbriae</i>		Lipopolisakarida	
		ulasan 1	ulasan 2	ulasan 1	ulasan 2
0	Rerata	12,4725	13,0008	14,4967	14,6675
	Simpangan baku	1,7466	1,9820	1,7001	1,5017
	t-hitung	1,349		1,340	
	p-value	0,204		0,207	
$1/16$	Rerata	6,6500	7,1517	6,4875	6,7192
	Simpangan baku	0,9074	1,0603	0,5936	0,6770
	t-hitung	1,615		1,067	
	p-value	0,135		0,309	
$1/8$	Rerata	5,3792	5,5925	5,5967	5,6867
	Simpangan baku	0,7960	0,6900	0,8335	0,4503
	t-hitung	1,559		0,544	
	p-value	0,147		0,597	
$1/4$	Rerata	3,7950	3,5633	5,2417	5,3608
	Simpangan baku	0,7764	0,7665	0,6471	0,4909
	t-hitung	1,754		0,888	
	p-value	0,107		0,393	
$1/2$	Rerata	1,8158	1,6258	1,9992	1,9800
	Simpangan baku	0,6342	1,5929	0,4885	0,3861
	t-hitung	1,681		0,281	
	p-value	0,121		0,784	
1	Rerata	1,6292	1,6417	0,7158	0,8158
	Simpangan baku	0,4446	0,4426	0,3612	0,4305
	t-hitung	0,095		2,151	
	p-value	0,926		0,055	

Lampiran 6. Hasil perhitungan uji regresi linier sederhana antara konsentrasi *crude protein fimbriae* dengan indeks adhesi EHEC O157 (SPSS 10.0)

Regression

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
INDEKS	5.3583	3.9331	72
DOSIS	.322917	.345526	72

Correlations

		INDEKS	DOSIS
Pearson Correlation	INDEKS	1.000	-.728
	DOSIS	-.728	1.000
Sig. (1-tailed)	INDEKS	.	.000
	DOSIS	.000	.
N	INDEKS	72	72
	DOSIS	72	72

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	DOSIS ^a		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: INDEKS

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.728 ^a	.530	.523	2.7164

a. Predictors: (Constant), DOSIS

b. Dependent Variable: INDEKS

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	581.818	1	581.818	78.852	.000 ^a
	Residual	516.501	70	7.379		
	Total	1098.318	71			

a. Predictors: (Constant), DOSIS

b. Dependent Variable: INDEKS

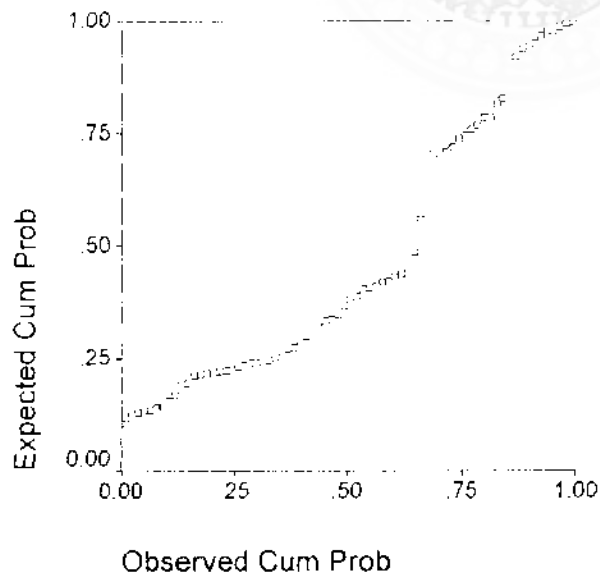
Residuals Statistics^a

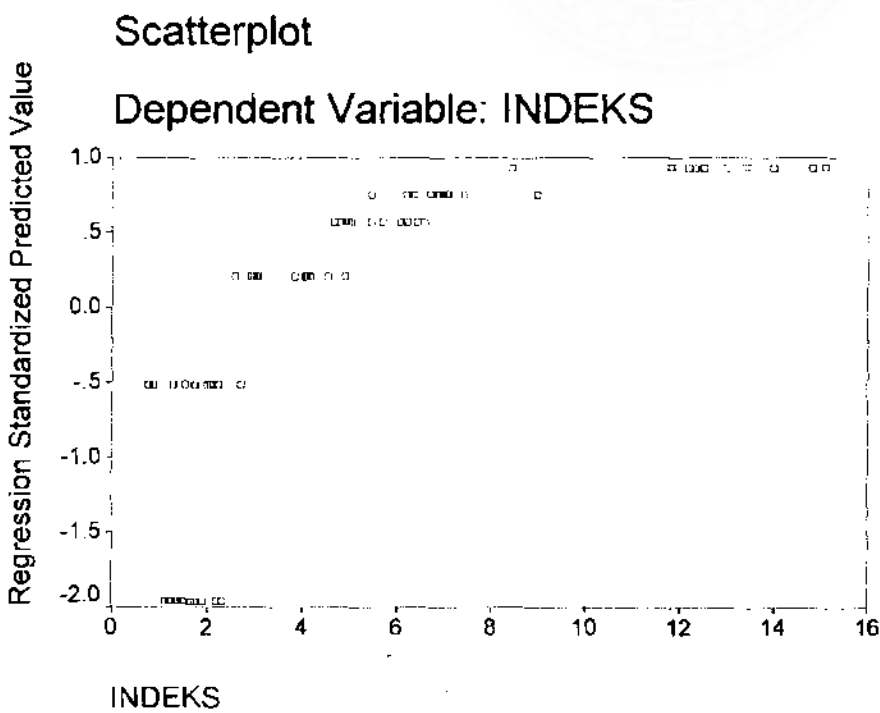
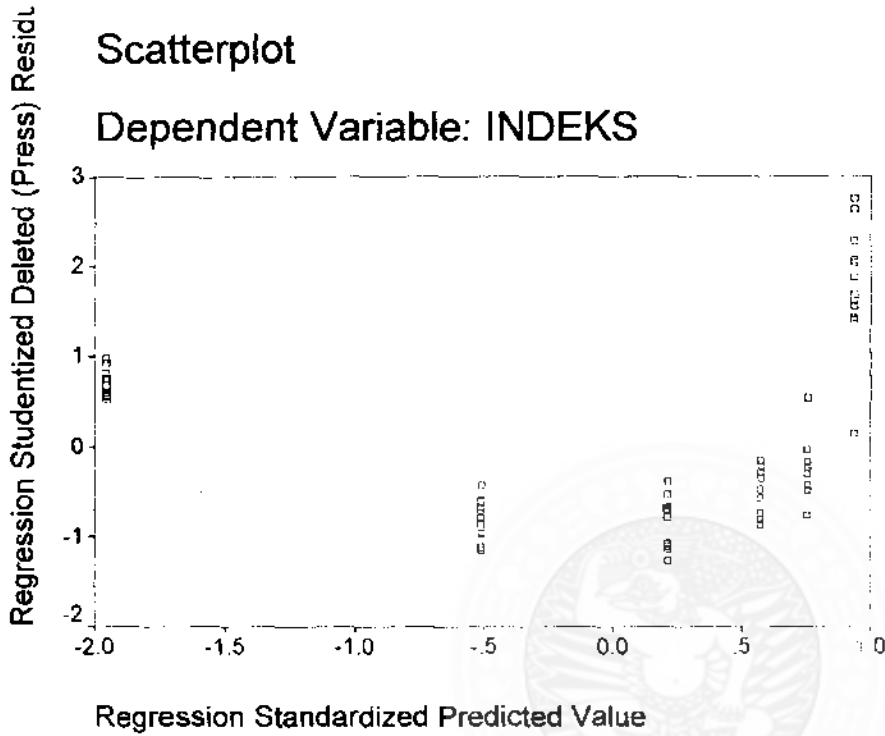
	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	-.2512	8.0336	5.3583	2.8626	72
Std. Predicted Value	-1.960	.935	.000	1.000	72
Standard Error of Predicted Value	.3273	.7082	.4345	.1282	72
Adjusted Predicted Value	-.4380	8.0230	5.3335	2.8915	72
Residual	-3.4024	7.0664	-8.60E-16	2.6972	72
Std. Residual	-1.253	2.601	.000	.993	72
Stud. Residual	-1.262	2.636	.004	1.007	72
Deleted Residual	-3.4526	7.2564	2.484E-02	2.7716	72
Stud. Deleted Residual	-1.267	2.758	.012	1.021	72
Mahal. Distance	.045	3.840	.986	1.311	72
Cook's Distance	.000	.093	.014	.019	72
Centered Leverage Value	.001	.054	.014	.018	72

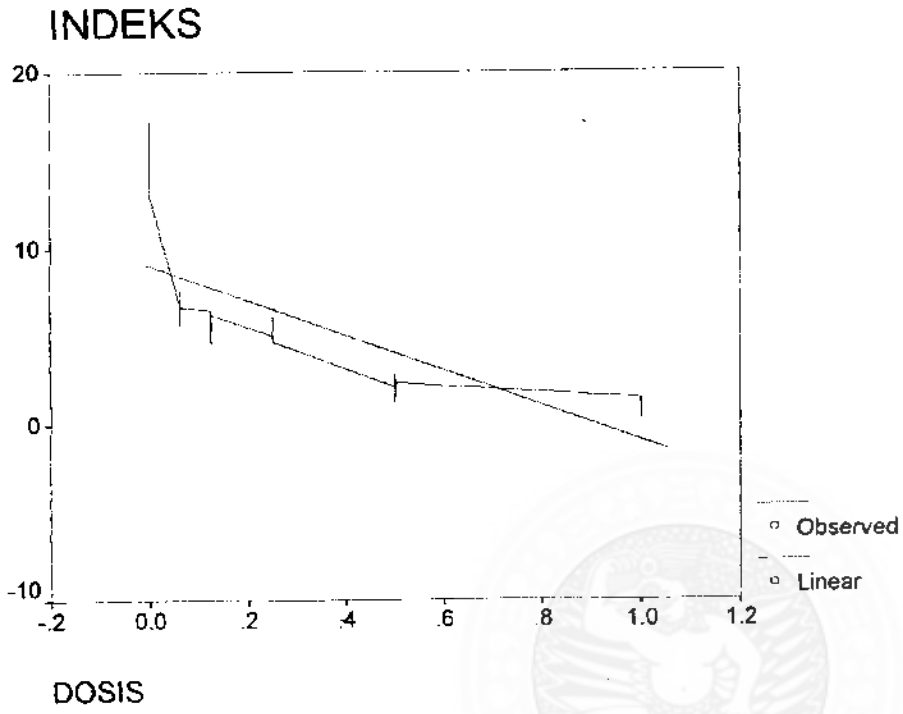
a. Dependent Variable: INDEKS

Charts

Normal P-P Plot of Regression Sta
Dependent Variable: INDEKS







Lampiran 7. Hasil perhitungan uji regresi linier sederhana antara konsentrasi lipopolisakarida dengan indeks adhesi EHEC O157 (SPSS 10.0).

Regression

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
INDEKS	5.8115	4.5293	72
DOSIS	.322917	.345526	72

Correlations

		INDEKS	DOSIS
Pearson Correlation	INDEKS	1.000	-.763
	DOSIS	-.763	1.000
Sig. (1-tailed)	INDEKS	.	.000
	DOSIS	.000	.
N	INDEKS	72	72
	DOSIS	72	72

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	DOSIS ^a		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: INDEKS

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.763 ^a	.582	.576	2.9505

a. Predictors: (Constant), DOSIS

b. Dependent Variable: INDEKS

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	847.154	1	847.154	97.315	.000 ^a
	Residual	609.372	70	8.705		
	Total	1456.527	71			

a. Predictors: (Constant), DOSIS

b. Dependent Variable: INDEKS

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	9.040	.477		18.932	.000
	DOSIS	-9.997	1.013	-.763	-9.865	.000

a. Dependent Variable: INDEKS

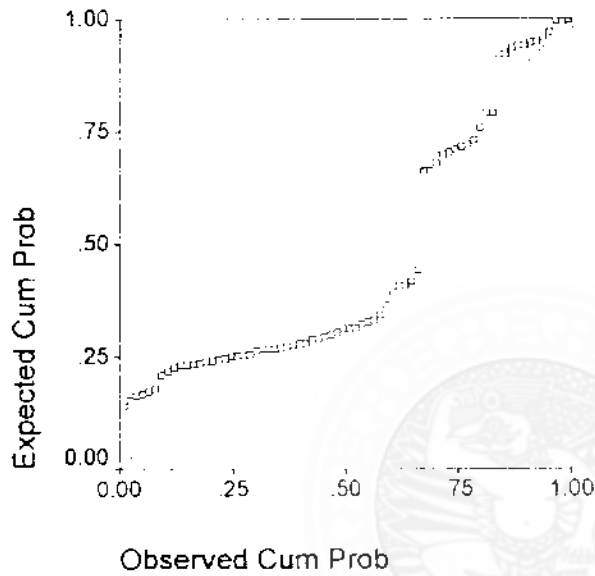
Residuals Statistics^a

	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	-.9573	9.0397	5.8115	3.4542	72
Std. Predicted Value	-1.960	.935	.000	1.000	72
Standard Error of Predicted Value	.3555	.7692	.4719	.1392	72
Adjusted Predicted Value	-1.1314	8.9281	5.7885	3.4797	72
Residual	-3.1801	8.1903	1.443E-15	2.9296	72
Std. Residual	-1.078	2.776	.000	.993	72
Stud. Residual	-1.088	2.813	.004	1.006	72
Deleted Residual	-3.2401	8.4105	2.304E-02	3.0100	72
Stud. Deleted Residual	-1.089	2.965	.013	1.027	72
Mahal. Distance	.045	3.840	.986	1.311	72
Cook's Distance	.000	.106	.014	.022	72
Centered Leverage Value	.001	.054	.014	.018	72

a. Dependent Variable: INDEKS

Charts

Normal P-P Plot of Regression Sta
Dependent Variable: INDEKS



Scatterplot
Dependent Variable: INDEKS

