

Pelekatan pada sel HEp-2 dan keragaman serotipe O *Escherichia coli* enteropatogenik Isolat Indonesia

Sri Budiarti

Jurusan Biologi, Fakultas Matematik dan Ilmu Pengetahuan Alam/
Pusat Antar Universitas Bioteknologi,
Institut Pertanian Bogor, Bogor

ABSTRACT

Sri Budiarti - *Adherence to HEp-2 cells and O Serotypes diversity of indigenous enteropathogenic Escherichia coli.*

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is bacteria which causes diarrheal diseases especially in children. Sixty-nine children with diarrheal disease from Purwodadi Central Java, Depok, Ciamis and Ciawi West Java also Sambas, West Kalimantan have been detected to the presence of EPEC bacteria. The prevalence of EPEC bacteria in each area were 46%, 66%, 68%, 46%, and 50% respectively. All of isolates have been tested for their ability of adherence to HEp-2 cells and O serotype. The results showed that O 86 and O111 were present in all sampling area but O142 was only found in Depok and Ciamis Central Java at high percentages. There was no correlation between the ability of adherence to HEp-2 cells and serotype diversity.

Key words: diarrhea - children - O Serotype - enteropathogenic *Escherichia coli* - HEp-2 cells.

ABSTRAK

Sri Budiarti - *Pelekatan pada sel HEp-2 dan keragaman serotipe O Escherichia coli enteropatogenik Isolat Indonesia*

Escherichia coli enteropatogenik adalah bakteri penyebab diare terutama pada anak-anak. Sebanyak 69 anak-anak penderita diare di daerah Purwodadi Jawa Tengah, Depok, Ciamis dan Ciawi Jawa Barat serta Sambas Kalimantan Barat telah diperiksa keberadaan bakteri EPEC pada fesesnya. Ditemukan prevalensi EPEC pada masing-masing daerah tersebut secara berurutan adalah 46%, 66%, 68%, 46% dan 50%. Isolat-isolat EPEC dari masing-masing daerah direaksikan dengan antisera O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128 dan O142 serta diuji penempelannya pada sel HEp-2. Hasil pemeriksaan tersebut menunjukkan adanya perbedaan keragaman serotipe antara satu daerah dengan daerah lain. Serotipe O86 dan O111 dijumpai pada semua daerah uji, sedangkan serotipe O142 menduduki persentase tertinggi di daerah Depok dan Ciamis Jawa Barat. Uji pelekatan pada sel HEp-2 menunjukkan bahwa seluruh isolat uji melakukan pelekatan pada sel HEp-2 dengan berbagai tingkatan dan tidak ada korelasi antara serotipe dengan tingkat pelekatan.

(B.I.Ked. Vol. 29, No. 3:105-109, September 1997)

PENGANTAR

Escherichia coli adalah salah satu bakteri yang tergolong pada keluarga enterobacteriaceae. Bak-

teri ini bersifat gram negatif, anaerob fakultatif, berbentuk batang, tidak berspora dan memfermentasikan laktosa, bereaksi positif terhadap indol dan merah metil, negatif pada reaksi Voges-Proskauer serta tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon satu-satunya¹.

Sri Budiarti, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Physics/Interuniversity Center, Bogor Institute of Agriculture, Bogor, Indonesia

Sebagian galur *E. coli* merupakan flora normal penghuni usus manusia maupun binatang, tetapi ada pula galur dari spesies ini yang merupakan bakteri patogen pada manusia². Beberapa penyakit yang ditimbulkan oleh *E. coli* di antaranya adalah gastroenteritis yang lebih populer dikenal sebagai penyakit diare.

Berdasar patogenitasnya *E. coli* penyebab diare dibedakan antara ETEC (*enterotoxigenic E. coli*), EPEC (*enteropathogenic E. coli*), EHEC (*enterohemorrhagic E. coli*), EIEC (*enteroinvasive E. coli*) dan EAggEC (*enteroaggregative E. coli*). Masing-masing virutipe memiliki kelompok galur yang berbeda, atau dengan kata lain galur-galur pada kelompok tertentu menyebabkan diare dengan patogenesis yang berbeda².

Escherichia coli enteropatogenik (EPEC) merupakan bakteri penyebab diare utama pada bayi dan anak-anak di negara berkembang dan secara sporadis juga menyebabkan diare di negara-negara industri. Mekanisme terjadinya diare oleh EPEC belum diketahui dengan jelas³.

Telah diketahui bahwa galur-galur dengan serotipe O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, dan O142 adalah kelompok galur-galur EPEC⁴. Tetapi penggolongan tersebut tidak memastikan sifat virulensinya⁵. Salah satu faktor virulensi dari EPEC adalah kemampuannya untuk dapat berkolonisasi pada permukaan mukosa usus. Percobaan *in vitro* oleh Cravioto *et.al*⁶, menunjukkan bahwa EPEC dari beberapa galur yang berhubungan dengan diare pada anak-anak melakukan pelekatan pada sel HEp-2 sedangkan isolat dari flora normal tidak. Selanjutnya Mathewson and Cravioto⁷ meneruskan penelitian dengan menggunakan sifat penempelan EPEC pada sel HEp-2 sebagai tanda virulensi bakteri tersebut pada manusia.

Untuk mendapatkan gambaran persentase EPEC pada penderita diare anak-anak di Indonesia dalam penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi EPEC dari feses anak-anak penderita diare dengan mengambil daerah contoh di Purwodadi Jawa Tengah, Depok, Ciamis dan Ciawi Jawa Barat serta Sambas Kalimantan Barat.

Tujuan utama dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan melekat bakteri EPEC pada sel HEp-2 serta menentukan keragaman serotipe isolat EPEC tersebut yang berasal dari berbagai daerah di Indonesia.

BAHAN DAN CARA

Bahan penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri enteropatogenik *E. coli* dari feses penderita diare, sel HEp-2 yaitu kultur sel karsinoma larynx dan antisera *E. coli* serotipe O.

Pengambilan contoh tinja

Contoh tinja diperoleh dengan cara mengambil olesan tinja dari lubang dubur anak-anak penderita diare yang datang berobat atau dirawat di Rumah Sakit maupun Puskesmas di daerah Purwodadi Jawa Tengah, Depok, Ciamis dan Ciawi Jawa barat serta Sambas Kalimantan Barat. Contoh-contoh tersebut masing-masing diinokulasikan ke dalam medium perjalanan (gliserol 20% dalam NaCl 0,85%). Selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk dilakukan isolasi dan identifikasi adanya *E. coli*.

Isolasi dan identifikasi *E. coli*

Contoh tinja dalam medium perjalanan disebar di atas medium EMB (Eosin Methylene Blue) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Koloni-koloni yang menampakkan warna hijau kilap logam dengan pusat koloni berwarna biru kehitaman dipilih. Setiap satu cawan diambil 5-6 koloni untuk dilakukan identifikasi dengan melakukan uji fisiologi dan biokimia mengikuti standar *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*¹.

Penentuan *E. coli* Patogen EPEC

Semua isolat yang pada uji fisiologi dan biokimia menunjukkan identitas *E. coli* selanjutnya dilakukan uji serologi. Sebanyak kurang-lebih 10⁹ sel (satu lup) biakan *E. coli* yang ditumbuhkan pada medium agar selama 18 jam pada suhu 37°C disuspensikan dengan 0,5 ml NaCl kemudian dipanaskan selama 30 menit pada suhu 100° C. Setelah dingin dilakukan uji aglutinasi terhadap antisera *E. coli* polivalen 2, 3, dan 4 (*Murex diagnostic*).

Penentuan serotipe O

Isolat yang positif terhadap antisera *E. coli* polivalen 2, 3, dan 4 selanjutnya diuji serologi terhadap antisera *E. coli* O kelompok EPEC

(O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, dan O142).

Uji pelekatan EPEC pada sel HEp-2

Uji pelekatan EPEC pada sel HEp-2 dilakukan dengan menggunakan metode Cravioto yang dimodifikasi⁸. Sel HEp-2 ditumbuhkan dalam *chamber slide* berbilik 4 dengan medium pokok minimum (MEM) yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan konsentrasi CO₂ 5% selama 24-48 jam hingga mencapai keadaan selapis (*monolayer*). Ke dalam masing-masing bilik diinfeksi 100% suspensi bakteri EPEC dalam MEM dengan kepekatan 10¹⁰ sel per mililiter. Kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu dan kondisi yang sama untuk mencapai keadaan kontak antara sel bakteri dengan sel HEp-2. Untuk menghilangkan sel bakteri yang tidak melekat dilakukan pencucian menggunakan PBS hangat. Selanjutnya difiksasi dengan metanol 100% selama 10 menit dan diwarnai dengan larutan Giemsa 10%. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop perbesaran 1000 kali dengan menghitung jumlah bakteri yang melekat pada 50 sel HEp-2 dan ditentukan indeks pelekatan bakteri per sel HEp-2.

Analisis data

Data Pelekatan EPEC pada sel HEp-2 dianalisis dengan menggunakan uji jarak ganda Duncan (DMRT: *Duncans Multiple Range Test*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sejumlah 69 anak yang sedang menderita diare didapatkan dari RS Purwodadi 15 orang, Baktiyuda Depok 9 orang, Puskesmas di Ciamis 16 orang, RS Ciawi 15 orang, dan Puskesmas Sebawi Sambas 14 orang. Bakteri *E. coli* pada tinja masih bisa hidup di dalam medium perjalanan yang digunakan dalam penelitian ini sampai 7 hari. Terbukti dari hasil penyebaran sampel tinja pada medium EMB (*Eosin Methylene Blue*), seluruh koloni yang berwarna hijau kilap logam pada medium tersebut setelah dilakukan uji fisiologi dan biokimia semuanya sesuai dengan identitas *E. coli* dengan motilitas positif (data tidak disajikan).

Galur *E. coli* ada yang bersifat patogen dan ada yang berfungsi sebagai flora normal. Untuk membedakan galur *E. coli* normal dengan galur patogen, dalam penelitian ini digunakan uji serologi dengan antisera *E. coli* polivalen 2, 3, dan 4. Dengan antisera *E. coli* polivalen 2 akan terdeteksi dari sampel feses EPEC yang memiliki serotipe O26, O55, O111, O119, O126. Antisera *E. coli* polivalen 3 akan bereaksi positif dengan EPEC yang memiliki serotipe O86, O114, O125, O127, O128 sedangkan antisera *E. coli* polivalen 4 dapat bereaksi positif dengan *E. coli* yang memiliki serotipe O44, O112, O124, O142. Isolat yang bila diuji serologi tidak bereaksi positif dengan antisera polivalen tersebut tidak menutup kemungkinan bahwa isolat tersebut adalah *E. coli* patogen, tetapi mungkin tergolong pada kelompok patogen lain.

Setelah hasil isolasi dikonfirmasi pada masing-masing penderita didapatkan hasil seperti yang tertera pada TABEL 1. Di daerah Ciamis angka prevalensi EPEC menduduki persentase tertinggi di antara daerah sampling. Hal ini menuntut perhatian untuk diteliti lebih lanjut, karena adanya EPEC menggambarkan adanya ancaman kesehatan bagi manusia⁹.

TABEL 1. - EPEC positif pada penderita diare di daerah sampling

Asal sampel	Jumlah pasien (orang)	EPEC positif
Purwodadi	15	7 (46%)
Depok	9	6 (66%)
Ciamis	16	11 (68%)
Sambas	14	7 (50%)
Ciawi	15	7 (46%)
Total	69	38 (55%)

Sejak bertahun-tahun yang lalu keterlibatan EPEC sebagai penyebab diare telah mengundang perhatian besar para peneliti di seluruh dunia. Pada kasus gastroenteritis di Kerajaan Inggris tahun 1940 yang dilaporkan oleh kelompok peneliti Kauffman ditemukan bahwa EPEC serotipe O111 adalah galur penyebab utama¹⁰. Paulozzi *et al.*¹¹ melaporkan pula bahwa galur O111 merupakan penyebab diare sehari-hari pada pusat perawatan bayi dan anak-anak di Seattle, Washington. Moyenuddin *et al.*¹² melaporkan bahwa EPEC merupakan 28% dari 50 kejadian diare pada

anak-anak di Amerika Serikat dari tahun 1934-1987. Pada tahun yang sama Gomes *et al.*¹³ juga melaporkan bahwa EPEC ditemukan pada 19% dari kasus diare anak-anak di Brazil. Dalam penelitian ini didapatkan angka rerata prevalensi EPEC pada penderita diare anak-anak di daerah pencuplikan sebesar 55%.

TABEL 2. - Persentase serotipe O Isolat EPEC dari Berbagai Daerah

Serotipe O	Persentase (%) EPEC Serotipe O di Daerah				
	Purwodadi	Depok	Ciamis	Sambas	Ciawi
26	10,25	0	0	11,11	0
55	23,07	0	0	0	40,00
86	17,94	11,11	10,52	5,55	26,6
111	20,51	11,11	15,78	16,66	26,6
114	5,12	0	0	11,11	0
125	2,56	11,11	5,26	5,55	0
126	2,56	22,22	15,78	22,22	0
127	2,56	0	0	16,66	6,66
128	12,82	0	0	5,55	0
142	2,56	44,44	52,63	5,55	0
Total	100% (39)	100% (18)	100% (19)	100% (18)	100% (15)

Untuk mengetahui penyebaran serotip O galur-galur EPEC yang ada pada penderita diare anak-anak Indonesia, pada penelitian ini dilakukan uji serologi dengan berbagai antisera O yang tergolong pada kelompok EPEC. Hasil keragaman serotipe O dari isolat-isolat tersebut dapat dilihat pada TABEL 2. Tabel tersebut menunjukkan bahwa serotipe O111 dan O86 didapatkan pada semua daerah uji sedang serotipe O142 menduduki persentase tertinggi di daerah Depok dan Ciamis Jawa Barat. Apakah galur-galur dari tempat yang berbeda memiliki sifat patogenesis yang sama merupakan hipotesis yang sangat menarik untuk dibuktikan dengan penelitian lebih lanjut.

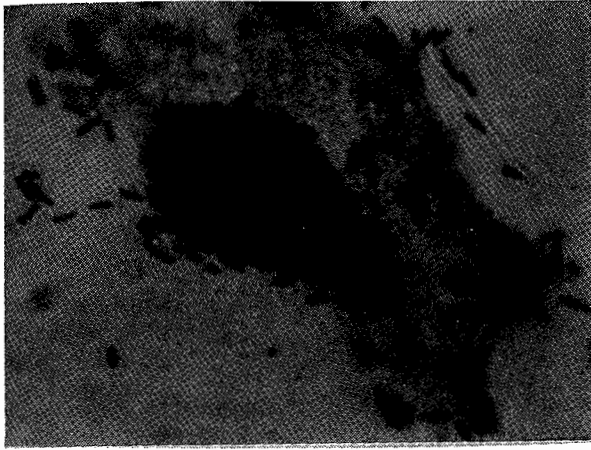
Untuk mengetahui apakah tingkat patogenitas ditentukan oleh jenis serotipe, dalam penelitian ini sebanyak 27 galur EPEC dari berbagai daerah dengan serotipe beragam telah diuji patogenitasnya dengan melakukan asai pelekatan bakteri tersebut pada sel HEp-2 secara *in vitro*. Dalam asai ini digunakan kontrol positif galur EPEC standar dari Biofarma - Bandung dengan serotipe O126 dan kontrol negatif adalah flora normal *E.*

TABEL 3. - Uji Pelekatan galur-galur EPEC pada sel HEp-2

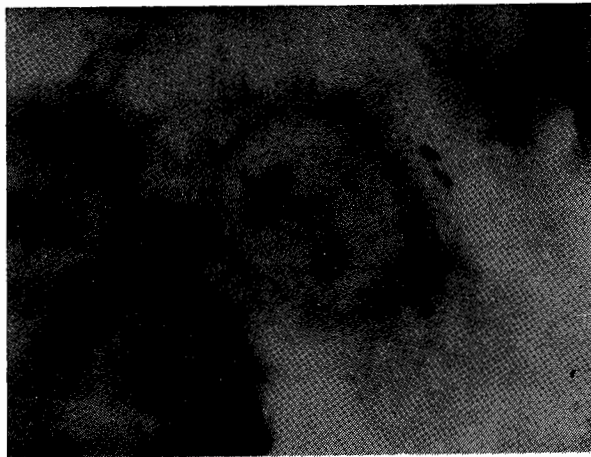
No.	Kode Isolat	Serotipe	Jml bakteri/sel HEp-2 ± SD
1	D4.4	O111	14,77 ± 3,56 b
2	D6.4	O111	19,92 ± 2,54 b
3	D11.2	O26	21,93 ± 4,46 b
4	D11.4	O128	54,70 ± 7,85 b
5	D11.5	O114	68,32 ± 6,89 b
6	D14.5	O114	36,03 ± 4,7 c
7	D14.10	O128	9,86 ± 2,39 b
8	D15.7	O126	33,87 ± 4,54 c
9	D15.10	O128	12,77 ± 2,10 b
10	E12.A	O86	56,16 ± 4,98 d
11	006.1	O114	32,65 ± 4,42 c
12	006.5	O125	21,11 ± 3,38 b
13	007.6	O26	25,41 ± 4,32 c
14	0011.2	O26	60,80 ± 5,34 d
15	0010.2	O127	64,03 ± 4,96 d
16	RB1.2	O126	31,60 ± 5,09 c
17	RC1.2	O86	36,44 ± 4,69 c
18	RC2.1	O125	17,85 ± 3,65 b
19	RC2.2	O142	52,64 ± 6,18 d
20	RC5.1	O142	27,14 ± 4,66 c
21	PC1.4	O142	17,17 ± 2,48 b
22	PC4.1	O142	21,12 ± 3,10 b
23	PC5.4	O86	20,08 ± 3,24 b
24	PC8.1	O111	36,07 ± 4,06 c
25	K1.1	O142	14,66 ± 3,09 b
26	I2.5	O126	33,37 ± 4,12 c
27	H2.5	O125	43,92 ± 5,58 d
28	C+	O126	38,80 ± 5,58 c
29	C-		0,94 ± 1,37 a

C+ = Kontrol positif; C- = Kontrol negatif

coli. Data dianalisis dengan menggunakan uji jarak ganda Duncan pada 0,05%. Angka rerata pelekatan dari galur-galur EPEC pada sel HEp-2 positif apabila sedikitnya terdapat 10 sel bakteri melekat pada satu sel HEp-2 dan negatif apabila pada satu sel HEp-2 hanya melekat 0 - 5 bakteri¹⁴. Galur kontrol positif (GAMBAR 1) pada penelitian ini menunjukkan angka pelekatan 38,80 ± 5,58 dan kontrol negatif (GAMBAR 2) 0,94 ± 1,37. Hasil uji pada penelitian ini menunjukkan bahwa seluruh isolat EPEC dari berbagai daerah melakukan pelekatan pada sel HEp-2 dengan berbagai tingkatan (TABEL 3). Pada tabel



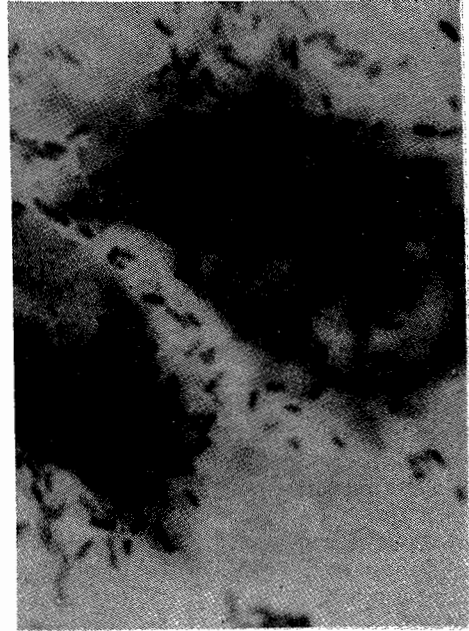
GAMBAR 1. - Pelekatan pada sel HEp-2 galur kontrol positif dengan pengecatan Giemsa 10% pada perbesaran 1000x



GAMBAR 2. - Pelekatan pada sel HEp-2 galur kontrol negatif dengan pengecatan Giemsa 10% pada perbesaran 1000x

tersebut juga dapat dilihat bahwa tingkat pelekatan isolat EPEC pada sel HEp-2 tidak ada hubungannya dengan serotipe. Seperti yang terlihat pada galur-galur D14.10, D15.10 dan D11.4 semuanya berserotipe O128 tetapi memiliki tingkat pelekatan yang berlainan, yaitu $9,86 \pm 2,39$, $12,77 \pm 2,10$, dan $54,7 \pm 7,88$ (TABEL 3). GAMBAR 3 adalah pengamatan pelekatan EPEC 0011.2 pada sel HEp-2.

Percobaan *in vitro* telah membantu mempelajari mekanisme pelekatan EPEC pada sel inang⁹. Interaksi EPEC dengan sel inang terjadi melalui tiga tahap. Tahap pertama adalah asosiasi bakteri dengan sel inang dalam ikatan tak intim yang diperantarai oleh pili. Ikatan ini terjadi secara *irreversible*. Pada tahap kedua pelekatan



GAMBAR 3. - Pelekatan EPEC0011.2 dengan pengecatan Giemsa 10% pada perbesaran 1000x

bakteri pada sel inang memicu terjadinya sinyal transduksi yang mengaktifasi tirosin kinase inang dan mengakibatkan kenaikan kalsium intraselular inang. Tahap ketiga terjadi pelekatan intim yaitu bakteri berasosiasi lebih dekat dengan inang dan mempengaruhi aktin di sekitar bakteri¹⁵. Protein membran luar dari bakteri dilaporkan berperan pada pelekatan intim. Ekspresi sifat protein membran luar EPEC dipengaruhi oleh kondisi lingkungan pertumbuhan bakteri. Bagaimana karakterisasi ekspresi protein membran luar EPEC isolat Indonesia masih dalam penelitian.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa bakteri EPEC didapatkan pada 55% penderita diare. Isolat-isolat EPEC memiliki serotipe beragam pada satu daerah dengan daerah lain. Serotipe O111 dan O86 didapatkan di seluruh daerah uji. Seluruh isolat EPEC melakukan pelekatan pada sel HEp-2 dengan berbagai tingkat. Tingkat pelekatan tidak ditentukan oleh jenis serotipe.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh proyek Hibah Bersaing Perguruan Tinggi dengan nomor kontrak 008/P4M/DPPM/

1995/PHB III/2/1995. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih. Terima kasih pula disampaikan kepada Natalia Akbar Jurusan Biologi FMIPA IPB atas bantuannya dalam menguji patogenitas.

KEPUSTAKAAN

1. Krieg NR, Holt JG. Bergeys manual of systematic bacteriology, Vol. 1. London: Williams & Wilkins. 1984.
2. Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis. A molecular approach. Washington: ASM Press, 1994.
3. Stein MA, Mathers DA, Hong Yan, Baimbridge KG, and Finlay B. Enteropathogenic *E. coli* markedly decreases the resting membrane potential of Caco - 2 and HeLa human epithelia cells. *Infect Immun.* 1996; 64: 4820-25.
4. Edelman R, Levine MM. Summary of a workshop on enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 1983; 147:1108-18.
5. Cleary TG, Mathewson JJ, Faris E, Pickering LK. Shiga-like cytotoxin Production by Enteropathogenic *Escherichia coli* 6. Serogroups. *Infect. Immun.* 1985; 47:335-37.
6. Cravioto AR, Gross J, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Cur Microbiol.* 1979; 3:95-99.
7. Mathewson JJ, and A Cravioto. HEP-2 cell adherence as an assay for virulence among diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 1989; 159:1057-60.
8. Budiarti Sri, Hirai Y, Minami J, Katayama S, Shimizu T, A Okabe. Adherence to HEP-2 cells and replication in macrophages of *Salmonella derby* of human origin. *Microbiol. Immunol.* 1991; 35:111-123.
9. Donnenberg MS, Tacket CO, James SP, Osonsky G, Nataro JP, Wesserman, et al. Role of eae A gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J Clin Invest.* 1993; 92: 1412-17.
10. Campos LC, Whittam TS, Gomes TAT, Andrade JRC, and Trabulsi LR. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. *Infect Immun.* 1994; 62: 3282-88.
11. Paulozzi LJ, Johnson KE, Kamahele LM, Clausen CR, Riley LW, Helgeson SD. Diarrhea associated with adherent enteropathogenic *Escherichia coli* in an infant and toddler center. *Pediatrics* 1986; 77: 296-300.
12. Moyenuddin M, Wachsmuth IK, Moseey SL, Bopp CA, Blake PA. Serotype, antimicrobial resistance, and adherence properties of *Escherichia coli* strains associated with outbreaks of diarrheal illness in children in United States. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 2234-39
13. Gomes TAT, Vieira MAM, Wachsmuth IK, Bake PA, Trabulsi LR. Serotype specific prevalence of *Escherichia coli* strains with EPEC adherence factor genes in infants with and without diarrheal in Sao Paulo, Brazil. *J Infect Dis.* 1989; 160: 131-35.
14. World Health Organization, Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections. 1987; CDD/83.3-Rev.1
15. Rosenshine I, Ruschkowski S, Finlay BB. Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. *Infect Immun.* 1996; 64 ;966-73.