

Peran Hemagglutinin dan Hemolisin pada *Escherichia coli* Sorbitol-negatif Isolat Burung Puyuh pada Proses Infeksi Secara in Vitro

Role of Hemagglutinin and Hemolysine in Escherichia coli Sorbitol-negative isolate of Quality Birds in the Infection Process in Vitro

Khusnan*, Wahyu Prihtiyantoro, Dwi Kusmanto

Akademi Peternakan Brahmaputra Yogyakarta,
Jl. Ki Ageng Pemanahan Nitikan Sorosutan Umbulharjo Yogyakarta

*Email: khusnanzaini@gmail.com

Naskah diterima: 22 Oktober 2021, direvisi: 15 November 2021, disetujui: 29 November 2021

Abstract

Escherichia coli sorbitol-negative in quails cause economic loss due to the death, growth rate inhibition, decreased egg production, and increased medical treatment. *Escherichia coli sorbitol-negative* has many virulence factors, including hemagglutinin and hemolysin. The aim of this study is to determine the role of hemagglutinin and hemolysin in the infection process of *Escherichia coli sorbitol-negative* in vitro. This study was performed using 23 isolates of *Escherichia coli sorbitol-negative* from quails, 52.2% (12 of 23 isolates) had hemagglutinin, while 34.8% (8 out of 23 isolates) had hemolysin. Isolates with hemagglutinin were more attached to human buccal epithelial cells than isolates without hemagglutinin. The t-test analysis showed no significant difference ($P>0.05$). Isolates with hemolysin were less phagocyted by macrophages compared to isolates which without hemolysin. The t-test analysis showed no significant difference ($P>0.05$). *Escherichia coli sorbitol-negative* isolates from quails that have hemagglutinin and hemolysin are pathogenic isolates that possess the potential to cause colibacillosis and transmission between quails and other birds.

Keywords: *Escherichia coli*; hemagglutinin; hemolysin; Quail; Sorbitol-negative

Abstrak

Pada burung puyuh *Escherichia coli sorbitol-negative* menimbulkan kerugian ekonomi, karena menyebabkan banyak kematian, penghambat laju pertumbuhan, menurunkan produksi telur dan meningkatkan biaya pengobatan. *Escherichia coli sorbitol-negative* memiliki banyak faktor virulensi, diantaranya hemagglutinin dan hemolisin. Pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peran hemagglutinin dan hemolisin pada proses infeksi *Escherichia coli sorbitol-negative* secara in vitro. Penelitian ini digunakan 23 isolat *Escherichia coli sorbitol-negative* asal burung puyuh, 52,2% (12 dari 23 isolat) memiliki hemagglutinin dan 34,8% (8 dari 23 isolat) memiliki hemolisin. Isolat-isolat yang memiliki hemagglutinin lebih banyak menempel pada sel epitel bukalis manusia dibandingkan isolat yang tidak memiliki hemagglutinin. Uji t-test didapatkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan ($P>0,05$). Isolat-isolat yang memiliki hemolisin lebih sedikit difagosit oleh makrofag dibandingkan dengan isolat yang tidak memiliki hemolisin. Uji t-test didapatkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan ($P> 0,05$). *Escherichia coli sorbitol-negative* isolat asal burung puyuh yang memiliki hemagglutinin dan hemolisin merupakan isolat patogen yang berpotensi menyebabkan kolibacillosis dan penularan antar burung puyuh maupun jenis unggas lain.

Kata kunci: burung puyuh; *Escherichia coli*; hemagglutinin; hemolisin; Sorbitol-Negatif

Pendahuluan

Kolibasilosis merupakan penyakit yang penting dalam industri perunggasan (Salehi dan Ghanbarpour, 2010). Kolibasilosis pada unggas menimbulkan kerugian ekonomi karena menyebabkan penurunan produksi, bertambahnya biaya pengobatan maupun adanya kematian unggas (van der Westhuizen dan Bragg, 2012). Burung puyuh merupakan unggas yang dilaporkan rentan terhadap banyak penyakit (Roy et al., 2006; Hamad et al., 2012), salah satu diantaranya *colibacillosis* (Kenneth, 2008).

Escherichia coli dengan *sorbitol-negative* merupakan strain patogen didasarkan ketidakmampuan isolat memfermentasi sorbitol pada agar *Sorbitol MacConkey* (SMAC) (Jabur et al., 2016). Strain *Escherichia coli* dengan *sorbitol-negative* ditemukan pada darah jantung, cangkang telur dan embrio yang mati serta bulu burung puyuh (Roy et al., 2006). *Escherichia coli* patogen asal unggas memiliki banyak faktor virulensi (Salehi dan Ghanbarpour, 2010; Kalule et al., 2018), yang berkontribusi dalam proses infeksi dan patogenisitas (Sharma et al., 2007).

Terjadinya infeksi dan timbulnya gejala serta tingkat keparahan penyakit yang berbeda ditentukan oleh faktor-faktor virulensi yang dimiliki *Escherichia coli* patogen, diantaranya faktor yang berperan dalam proses koloni, adesi, invasi dan faktor kemampuan bakteri untuk bertahan hidup melawan pertahanan tubuh inang (Emody et al., 2003), kemampuan menghindari dari sel-sel fagosit (Goosney et al., 1999), dan kemampuan bakteri memperbanyak diri (Dobrindt dan Hacker, 2008).

Hemaglutinin dan hemolisin merupakan faktor virulensi yang penting pada *Escherichia coli* (Hogan et al., 1990), kedua faktor virulensi tersebut telah lama dideteksi pada *Escherichia coli* (Neter et al., 1952). Hemaglutinin pada *Escherichia coli* patogen berperan dalam proses koloni dan adesi pada sel inang (Bohach dan Snyder, 1985), serta memperparah penyakit (Edwards et al., 2000). Keberadaan hemaglutinin pada *Escherichia coli* isolat asal unggas telah dilaporkan oleh Knobl et al. (2006)

Hemolisin berperan *Escherichia coli* berperan meningkatkan pertahanan terhadap

antibodi dan menghindar dari sel-sel fagosit serta memperparah penyakit (Mittal et al., 2014). Keberadaan hemolisin pada *Escherichia coli* isolat asal burung puyuh telah dilaporkan Roy et al. (2006).

Penelitian ini bertujuan melakukan deteksi hemaglutinin dan hemolisin pada *Escherichia coli* dengan *sorbitol-negative* asal burung puyuh, serta perannya pada kemampuan adesi pada epitel dan pertahanan terhadap fagositosis makrofag secara in vitro

Materi dan Metode

Isolat *Escherichia coli*

Duapuluh empat isolat *Escherichia coli* asal burung puyuh dengan *Sorbitol MacConkey-negative* digunakan dalam penelitian ini telah diidentifikasi oleh Prihtiyantoro dan Khusnan (2016).

Deteksi Hemaglutinin

Deteksi hemaglutinin menggunakan metode yang dikerjakan Wibawan et al., (1993). Digunakan darah domba dengan antikoagulan 0,2 M Sodium Sitrat pH 5,2, disentrifus dan dicuci dua kali dengan 0,15 M NaCl, kemudian dibuat larutan 2% dengan NaCl. Uji hemaglutinasi dilakukan dengan cara mereaksikan 20 µl larutan bakteri yang telah ditentukan *optical density* (OD) nya dengan *spekrofotometer transmisi* dan λ 620 nm (kira-kira 10^9 bakteri/ml 0,15 NaCl) dengan 20 µl larutan eritrosit dalam tabung reaksi. Tabung reaksi digoyang selama 30 detik dan reaksi hemaglutinasi dicatat dengan ketentuan sebagai berikut: ++ reaksi kuat, + reaksi sedang dan – tidak ada reaksi.

Deteksi Hemolisin

Deteksi keberadaan hemolisin pada *Escherichia coli* menggunakan metode yang dilakukan Mittal et al. (2014) dan Al-Saiedi dan Al-Mayah. (2014). Isolat *Escherichia coli* diinokulasi pada 5% agar darah domba dan diinkubasi semalam pada 37°C selama 18-24 jam. Keberadaan hemolisin ditandai dengan terbentuknya zona lisis disekitar koloni.

Uji Adhesi

Uji adhesi *Escherichia coli* pada sel epitel, menggunakan sel-sel epitel bukalis manusia sesuai metode Salasia (1994). Sel epitel mukosa bukalis manusia diambil dengan mengerok lapisan mukosa bukalis menggunakan spatel kayu, hasil kerokan dimasukkan dalam 5 ml HBSS (*hanks balance salt solution*). Dilakukan pencucian dua kali dengan PBS (*phosphat buffer saline*). Sel-sel epitel bukalis yang diperoleh dihitung dengan menggunakan *haemocytometer* (AO, USA), sehingga diperoleh larutan bakteri kira-kira 10^5 sel/ml HBSS.

Larutan bakteri disiapkan dengan menumbuhkan isolat *Escherichia coli* pada media cair THB (*tod hewitt broth*) cair dalam tabung dan dieramkan pada suhu 37°C , 18-24 jam. Biakan *Escherichia coli* THB kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Pelet disuspensi dengan *Hank's balanced salt solution* (HBSS) dan ditentukan *optical density* (OD)-nya dengan spektrofotometer pada λ 620 nm (kira-kira 10^5 bakteri/ml).

Pembuatan adhesi bakteri pada sel epitel dilakukan dengan menyampurakan 1 ml suspensi bakteri dengan 1 ml larutan sel-sel epitel bukalis manusia dalam tabung reaksi, setelah diinkubasikan selama 1 jam pada temperatur 37°C dalam *water bath*. Sel-sel epitel bukalis dipisahkan dari bakteri yang tidak melekat dengan cara menambahkan 50% larutan *percoll* dalam campuran tersebut dan sentrifus. Pelet yang terbentuk dipisahkan dan dicuci dua kali dengan larutan HBSS.

Larutan akhir yang terbentuk diteteskan dan diapuskan pada kaca objek dan dikeringkan, kemudian dilakukan pewarnaan dengan Giemsa selama 30 menit. Pengamatan dan perhitungan jumlah bakteri yang melekat pada sel epitel bukalis menggunakan mikroskop cahaya. Rerata jumlah bakteri yang melekat pada sel epitel dilakukan pada 10 sel epitel bukalis.

Uji Fagositosis

Uji fagositosis menggunakan sel makrofag sesuai metode Salasia (1994). yang diambil dari cairan peritonium mencit. Mencit dibius dengan cara dimasukkan ke dalam kotak yang berisi chloroform. Setelah terbius, bagian rongga

perut mencit dibuka kemudian dimasukkan 3-5 mL larutan minimal essensial medium (MEM), selanjutnya dimasase. Cairan intraperitoneal yang mengandung makrofag diambil dengan menggunakan spuit steril kemudian dimasukkan ke dalam tabung steril dan disentrifus 2.000 rpm selama 15 menit pada suhu 37°C dilakukan dua kali berturut-turut. Supernatan dibuang dan pellet ditambah MEM sebanyak 3-5 mL. Makrofag dihitung dengan menggunakan *haemocytometer* sehingga diperoleh makrofag 10^5 sel/mL.

Uji viabilitas makrofag, digunakan untuk menghitung jumlah makrofag yang hidup. Cara yang dilakukan untuk uji viabilitas yaitu sebanyak 100 μL makrofag dimasukkan ke dalam eppendorf kemudian ditambah dengan 10 μL trypan blue, didiamkan selama satu menit, kemudian diteteskan pada hemocytometer dilihat di bawah mikroskop. Sel makrofag yang hidup akan terlihat bening dan makrofag yang mati berwarna biru. Makrofag peritoneal yang digunakan harus menunjukkan angka viabilitas di atas 70%

Uji fagositosis makrofag, dilakukukan dengan cara memasukkan 100 μL suspensi bakteri (10^9 bakteri/mL) ke dalam eppendorf kemudian ditambahkan 100 μL makrofag (10^5 sel/mL). Larutan diinkubasi dalam penangas air pada suhu 37°C selama satu jam. Setelah satu jam, diteteskan pada gelas objek, ditutup dengan gelas penutup dan diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya. Aktivitas fagositosis makrofag ditentukan dengan cara menghitung jumlah bakteri yang difagosit oleh setiap sel makrofag. Rerata jumlah bakteri yang difagosit dihitung dari 10 sel makrofag pada setiap preparat (Salasia dan Laemmler, 1994). Pengamatan hasil terhadap produksi hemolisin, kemampuan hemaglutinasi dan adesi dengan referensi. Perbandingan nilai rerata kemampuan bakteri melekat pada sel epitel dan kemampuan bakteri bertahan terhadap sel fagositik dianalisa menggunakan t-test

Hasil dan Pembahasan

Hasil deteksi hemaglutinin pada *Escherichia coli* pada penelitian ini sebesar 52,2% (12 dari 23 isolat) memiliki hemaglutinin, dan 47,80% (11 dari 23 isolat) tidak memiliki he-

Tabel 1. Deteksi hemaglutinin pada *Escherichia coli sorbitol-negative* isolat asal burung puyuh dan rerata jumlah bakteri yang beradhesi pada sel epitel bukalis

No	No Sampel	n(%)	Hem aglutinin	Rerata Jumlah bakteri yang menempel/ sel epitel
1	9; 18; P2; P4.2; P5; P5.3; P6; P10; P11.1; P12, P17; P18.1	12(52,2)	+	109,97
2	2; 8; 12;16; 19; 20; 21; P16.2; P17.1; P19; P19.1	11(47,8)	-	108,98
	23	23(100)		

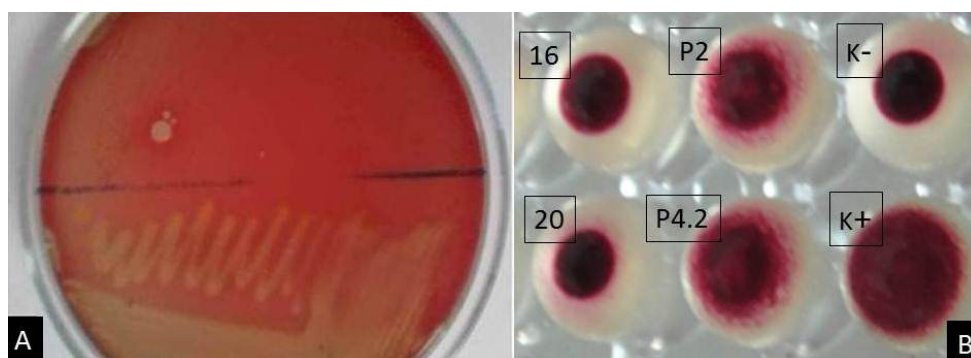
Tabel 2. Deteksi hemolisin pada *Escherichia coli sorbitol-negative* isolat asal burung puyuh dan rerata jumlah bakteri yang terfagosit oleh makrofag

No	No Sampel	n(%)	Hem olisin	Rerata jumlah bakteri yang difagosit/ makrofag
1	8; 9; 12; 18; P2; P12; P17; P19	8(34,8)	+	12,07
2	2; 16; 19; 20; 21; P4.2; P5; P5.3; P6; P10; P11.1; P16.2; P17.1; P18.1; P19.1	15(65,2)	-	12,68
	23	23(100)		

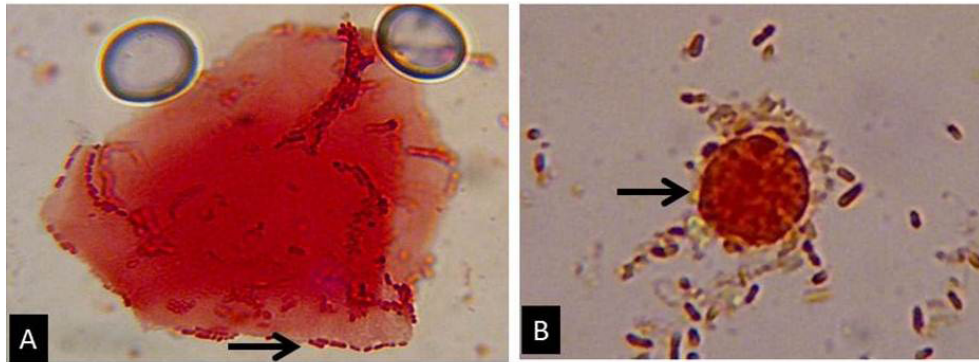
maglutinin (Tabel 1). Hasil deteksi hemolisin 34,80% (8 dari 23 isolat) memiliki hemolisin, dan 65,2% (15 dari 23 isolat) tidak memiliki hemolisin (Tabel 2). Isolat-isolat *Escherichia coli* yang memiliki hemaglutinin mampu melekat lebih banyak pada sel epitel bukalis manusia dibandingkan dengan isolat yang tidak memiliki hemagglutinin (109,97 dibanding 108,98/sel epitel).

Hasil analisa perbandingan dengan t-test tidak ada perbedaan secara nyata ($P > 0,05$). Isolat *Escherichia coli* yang memiliki hemo-

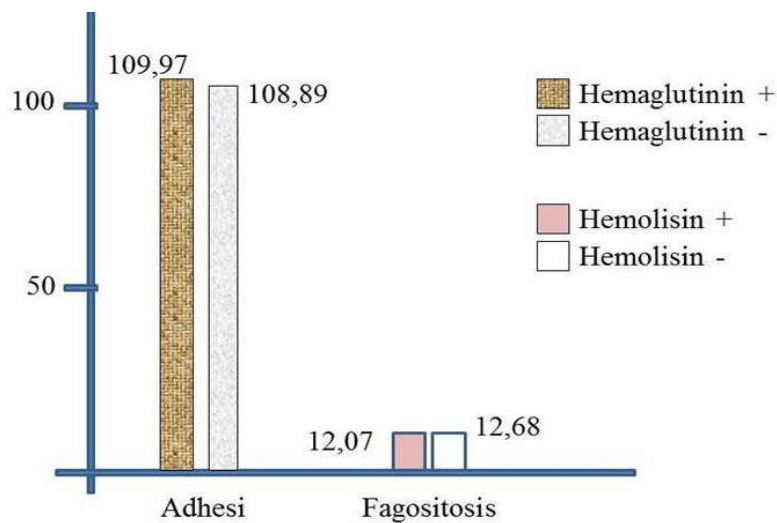
lisin difagosit oleh makrofag lebih sedikit dibandingkan dengan isolat yang tidak memiliki hemolisin (12,07 dibanding 12,68 bakteri/makrofag). Hasil analisa perbandingan dengan t-test tidak ada perbedaan secara nyata ($P > 0,05$) (Grafik 1). Isolat-isolat *Escherichia coli* yang memiliki hemaglutinin menggumpalkan eritrosit domba, dan isolat-isolat yang memiliki hemolisin tumbuh pada media agar darah domba dengan membentuk zona lisis di sekitar koloni (Gambar 1).



Gambar 1. A. Pertumbuhan koloni isolat *Escherichia coli* hemolitik, membentuk zona hemolisis disekeliling koloni. B. Uji hemaglutinasi, K-: kontrol negatif, isolat 16 dan 20 hemaglutinasi negatif, K+: kontrol positif, terjadi hemaglutinasi, isolat P2 dan P4.2 hemaglutinasi positif.



Gambar 2. A. *Escherichia coli* menempel pada sel epitel bukalis, B. *Escherichia coli* yang difagosit oleh makrofag



Grafik 1. Adhesi: Rerata jumlah *E. coli* yang beradesi pada sel epitel bukalis (isolat yang memiliki dan yang tidak memiliki hemaglutinin), Fagositosis: rerata jumlah yang *E. coli* yang difagosit oleh makrofag (isolat yang memiliki dan yang tidak memiliki hemolisin)

Pembahasan

Escherichia coli patogen pada bangsa unggas menyebabkan infeksi pada sistem pencernaan maupun diluar saluran pencernaan. Kolibasilosis pada unggas menurut Kunert-Filho *et al.*, (2015) menyebabkan *septicemia, enteritis, granuloma, omphalitis, sinusitis, airsacculitis, arthritis/synovitis, peritonitis, pericarditis, perihepatitis, cellulitis, dan swollen head syndrome*. Pada burung puyuh kolibasilosis menyebabkan *septicemia, pericarditis, perihepatitis, airsacculitis, dan arthritis* (Moulin-Schouleur *et al.*, 2007).

Duapuluh tiga isolat *Escherichia coli* yang digunakan pada penelitian ini merupakan strain patogen, dan telah diidentifikasi sebagai *Escherichia coli sorbitol-negatif* (Prihtiyantoro

dan Khusnan, 2016). Identifikasi *Escherichia coli* strain patogen menggunakan agar selektif *Sorbitol MacConkey* (SMAC) (Stapp *et al.*, 2000). Menurut Zhao *et al.* (1995) *Escherichia coli* patogen tumbuh pada agar *Sorbitol MacConkey* dengan tidak memfermentasi sorbitol, yang ditandai dengan warna koloni keabuan. Agar *Sorbitol MacConkey* (SMAC) merupakan media selektif yang digunakan untuk membedakan *Escherichia coli* patogen dan non patogen yang ditandai dengan tidak memfermentasi sorbitol (Turbin, 2009). Deteksi *Escherichia coli* patogen dengan media *Sorbitol MacConkey* ini telah digunakan oleh beberapa peneliti (Sekhar *et al.*, 2017; Kalule *et al.*, 2018).

Infeksi terjadi karena kemampuan bakteri melakukan proses koloni, adesi, invasi dan

bertahan hidup melawan pertahanan tubuh inang (Emody *et al.*, 2003), serta kemampuan menghindari dari sel-sel fagosit (Goosney *et al.*, 1999). Hemagglutinin dan hemolisin merupakan faktor virulensi yang penting pada *Escherichia coli* patogen (Hogan *et al.*, 1990). Keberadaan hemagglutinin dan hemolisin pada *Escherichia coli* isolat asal broiler telah dilaporkan oleh Al-Saiedi dan Al-Mayah, (2014)

Hemagglutinin pada *Escherichia coli* patogen merupakan salah satu faktor virulensi yang penting (Bohach dan Snyder, 1985). *Escherichia coli* patogen isolat asal unggas dilaporkan memiliki hemagglutinin (Al-Saiedi dan Al-Mayah, 2014). Hemagglutinin pada *Escherichia coli* patogen berupa aglutinin yang terdapat pada permukaan sel dan tersusun dari komponen protein (Nowicki *et al.*, 1988). Keberadaan hemagglutinin pada *Escherichia coli* patogen secara *in vitro* dapat dideteksi dengan uji hemagglutinasi menggunakan eritrosit (Maheswari *et al.*, 2013).

Secara *in vitro* bakteri yang memiliki hemagglutinin akan mampu menggumpalkan eritrosit (Maheswari *et al.*, 2013; Fakruddin *et al.*, 2013). Hemagglutinin merupakan protein permukaan yang berperan pada proses adesi dengan reseptor eritrosit sehingga terjadi aglutinasi eritrosit (Ghunaim *et al.*, 2014; Huja *et al.*, 2015). Keberadaan hemagglutinin pada *Escherichia coli* patogen telah dibuktikan oleh Salit dan Gotschlich (1977), dengan uji hemagglutinasi menggunakan eritrosit babi dan manusia, *Escherichia coli* yang memiliki hemagglutinin akan menggumpalkan eritrosit, dengan mikroskop elektron terlihat adanya ikatan antara hemagglutinin dengan reseptor eritrosit.

Penelitian ini 54,17% isolat *Escherichia coli* memiliki hemagglutinin. Isolat-isolat tersebut pada uji hemagglutinasi menggumpalkan eritrosit domba. Hasil penelitian ini lebih besar dibandingkan dengan laporan Hamad *et al.* (2012), 18,2% *Escherichia coli* patogen isolat burung puyuh memiliki hemagglutinin. Prevalensi *Escherichia coli* patogen isolat asal unggas yang memiliki hemagglutinin sangat beragam. Isolat asal broiler yang memiliki hemagglutinin dilaporkan 61,3% (Fakruddin *et al.*, 2013), 84,3% (da Rocha *et al.*, 2002) dan 3,7% (Al-Saiedi dan Al-Mayah, 2014), dan

isolat asal layer sebanyak 20% (Sharada *et al.*, 2010). *Escherichia coli* patogen isolat asal ayam tidak memiliki hemagglutinin (Vidotto *et al.*, 1991). *Escherichia coli* patogen isolat asal manusia dilaporkan 100%, 74,8% dan 53,0% memiliki hemagglutinin (Maheswari *et al.*, 2013; Mittal *et al.*, 2014; Kaira dan Pai, 2018).

Hemagglutinin pada *Escherichia coli* patogen berperan pada proses awal infeksi (Dho-Moulin dan Fairbrother, 1999; da Rocha *et al.*, 2002), yaitu sebagai faktor *adhesin*, yang berperan dalam proses pelekatan bakteri pada sel epitel hospes (Kurl *et al.*, 1989). Hasil penelitian ini isolat-isolat yang memiliki hemagglutinin melekat lebih banyak dibandingkan dengan isolat yang tidak memiliki hemagglutinin (rerata 109,97 dibanding 108,98 bakteri/sel epitel, $P > 0,05$). (Tabel 2). Hasil ini sesuai dengan Abrar *et al.* (2013) *Escherichia coli* yang memiliki hemagglutinin lebih banyak menempel pada sel epitel dibandingkan dengan yang tidak memiliki hemagglutinin. Keberadaan hemagglutinin ada hubungannya dengan kemampuan adesi serta tingkat patogenisitas bakteri (Klemm *et al.*, 2000). Hemagglutinin merupakan faktor koloni dan *adhesi* serta memperparah penyakit (Edwards *et al.*, 2000).

Hemolisin merupakan faktor virulensi yang penting pada *Escherichia coli* patogen (Fatima *et al.*, 2012) Keberadaan hemolisin pada *Escherichia coli* isolat asal broiler telah dilaporkan oleh Sharada *et al.* (2010) dan A Ruaa *et al.* (2014). Hasil penelitian ini 37,50% *Escherichia coli* isolat asal burung puyuh memiliki hemolisin. Hemolisin pada *Escherichia coli* secara *in vitro* pada agar darah akan melisis eritrosit sehingga terbentuk zona lisis disekitar koloni (Roy *et al.*, 2006). Hemolisin merupakan satu-satunya protein yang mampu melisis eritrosit (Herlax *et al.*, 2010). Metode ini sederhana dan cepat untuk menentukan keberadaan hemolisin (Moon *et al.*, 2006). Prevalensi *Escherichia coli* hemolitik hasil penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan laporan Roy *et al.* (2006), 45,2% *Escherichia coli* isolat puyuh merupakan strain hemolitik. Prevalensi strain *Escherichia coli* hemolitik isolat asal unggas dilaporkan sangat beragam. Isolat asal broiler dilaporkan 44,6%, 44,6%, 41,0% dan 53,3% merupakan *Escherichia*

coli hemolitik (Al-Saiedi dan Al-Mayah, 2014; Radwan *et al.*, 2014 dan Zahid *et al.*, 2016), dan isolat asal ayam petelur dilaporkan 45,0% dan 47,0% (Bashar *et al.*, 2011; Mittal *et al.*, 2014).

Beberapa peneliti melaporkan prevalensi *Escherichia coli* hemolitik sangat rendah. Shankar *et al.* (2010) dan Fodor *et al.* (2010) melaporkan isolat asal unggas sebesar 1,52%, dan 5%. Sharada *et al.* (2010) dan Rodriguez-Siek *et al.* (2005) melaporkan *Escherichia coli* hemolitik isolat asal ayam petelur sebesar 4,0% dan 4,0%. Kaira dan Pai (2018) melaporkan 27,64% *Escherichia coli* hemolitik. Osman *et al.* (2018) melaporkan *Escherichia coli* patogen asal broiler 97% hemolitik. Sebaliknya Vidotto *et al.* (1990); Emery *et al.* (1991); dan Santoyo *et al.* (2001) melaporkan *Escherichia coli* patogen isolat asal unggas tidak ada yang hemolitik.

Hasil penelitian ini isolat *Escherichia coli* hemolitik lebih sedikit difagosit oleh makrofag dibandingkan dengan isolat *Escherichia coli* non hemolitik 12,07 dibanding 12,68 bakteri/makrofag. $P > 0,05$). Menurut Goosney *et al.* (1999) bakteri patogen mempunyai kemampuan bertahan hidup didalam tubuh inang, karena mampu menghindari dari respon antibodi maupun neutrofil dan makrofag sebagai sel-sel fagosit inang.

Escherichia coli hemolitik menurut Laura *et al.* (2016) merupakan strain patogen yang tahan terhadap antibodi dan sel-sel fagosit, serta mampu bertahan hidup dalam aliran darah (Welch *et al.*, 1995), dan tahan terhadap bakterisidal (Allan *et al.*, 1993), serta mampu menghindari terhadap sel-sel fagositik (Fatima *et al.*, 2012). Makrofag merupakan sel imun yang berperan dalam fagositosis bakteri (Aderem dan Ulevitch, 2000).

Hemolisin berperan meningkatkan patogenesitas *Escherichia coli* (Kukanur *et al.*, 2015) laporan terakhir menyebutkan hemolisin juga berperan membunuh makrofag (Ambika *et al.*, 2018). Menurut Mittal *et al.* (2014) dan Johnson, (1991) *Escherichia coli* hemolitik akan menyebabkan penyakit yang lebih parah dibandingkan isolat non hemolitik.

Escherichia coli hemolitik lebih sering menyebabkan penyakit dibandingkan dengan isolat yang bukan hemolitik (Grover *et al.*, 2013),

Escherichia coli patogen yang bersifat zoonosis umumnya hemolitik (Evans *et al.*, 1981). Secara *in vivo* telah dibuktikan bahwa *Escherichia coli* strain hemolitik diubah menjadi strain bukan hemolitik akan menurunkan virulensi (Welch *et al.*, 1981).

Hemaglutinin dan hemolisin merupakan faktor virulensi yang penting dan berperan dalam peningkatan patogenisitas *Escherichia coli* patogen. Virulensi dan patogenisitas *Escherichia coli* patogen juga dipengaruhi oleh kontribusi dari banyak faktor virulensi lainnya, dan faktor-faktor tersebut bersifat multifaktor (da Rocha *et al.*, 2002). Deteksi faktor virulensi yang dimiliki *Escherichia coli* patogen penting dilakukan untuk memahami faktor-faktor apa saja yang berperan dalam proses infeksi, proses interaksi dalam tubuh inang dan timbulnya berbagai macam gejala sakit. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan hemaglutinin dan hemolisin pada *Escherichia coli* merupakan faktor virulensi yang penting sebagai faktor *adhesin* dan anti fagositik, sehingga menjadikan strain tersebut bersifat patogen.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. Dr. Drh. Siti Isrina Oktavia Salasia dan drh. Mitra, M.Sc. atas kerja samanya, serta Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan atas pendanaannya tahun anggaran 2015-2016

Daftar Pustaka

- Abrar, M., Wibawan, I.W.T., Priosoeryanto, B.P., Soedarwanto, M. and Pasaribu, F.H. (2013). Role of *Staphylococcus aureus* Haemagglutinin in Adhesion Process on Udder Epithelial Cells. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 7(1): 43-46.
- Aderem, A. and Ulevitch, R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406: 782-787.
- Allan, B.J., van den Hurk, J.V. and Potter, A.A. (1993). Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. *Can. J. of Vet. Res.*, 57: 146-151.
- Al-Saiedi, R.I.R. and Al-Mayah, A.A.S. (2014). Pathogenicity testing of several APEC

- isolates obtained from naturally infected broiler birds reared in Basrah. *Int. J. Poul. Sci.*, 13: 374-378
- Ambika, M., Murthy, V., Minh-Duy, P., Peters, K.M., Nhu, N.T., Welch, R.A., Ulett, G.C., Schembri, M.A. and Sweet, M.J. (2018). Regulation of hemolysin in uropathogenic *Escherichia coli* fine-tunes killing of human macrophages. *Virulence*. (9)1: 967-980.
- Bohach, G., and Snyder, I. (1985). Chemical and immunological analysis of the complex structure of *Escherichia coli* alpha-hemolysin. *J. Bacteriol.* 164: 1071-1080.
- da Rocha, A.C.G.P., da Silva, A.B., de Brito, B.G., de Souza, H.L., Pontes, A.P., Cristine, C.M., do Nascimento, V.P. and Salle, C.T.P. (2002). Virulence Factors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Broilers from the South of Brazil. *Av. Dis.*, 46(3): 749-752.
- Dho-Moulin, M. and Fairbrother, J.M. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.*, 30: 299-316.
- Dobrindt, U. and Hacker, J. (2008). Targeting virulence traits: potential strategies to combat extraintestinal pathogenic *E. coli* infections. *Curr. Opinion in Microbiol*, 11: 409-413.
- Edwards, R.A., Schifferli, D.M. and Maloy, S.R. (2000). A role for Salmonella fimbriae in intraperitoneal infections. *Procc. of the National Academy of Sci.*, 97: 1258-1262.
- Emody, L., Kerenyi, M. and Nagy, G. (2003). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrobiol Agents*, 22: 529-533.
- Evans, D.J., Evans, D.G., Hohne, C., Noble, M.A., Haldane, E.V., Lior, H. and Young L.S. (1981). Hemolysin and K antigens in relation to serotype and hemagglutination type of *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol*, 13:171-178.
- Fakruddin, M., Mazumdar, R., Chowdhury, A. and Mannan, K. (2013). A preliminary study on virulence factors and antimicrobial resistance in extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) in Bangladesh. *Ind. J. Med. Res.*, 137: 988-990.
- Fatima, N., Agrawal, M., Shukla, I. and Khan, P.A. (2012). Characterization of uropathogenic *E. coli* in relation to virulence factors. *Scientific Reports* 1:342. doi:10.4172/ scientificreports. 342.
- Fodor, I., Catana, N. and Herman, V. (2010). Epidemiological Studies on some *E. coli* Strains in Broiler Chickens.UASVM. *Vet. Med.*, 67(2): 74-76.
- Ghunaim, H., Abdu-Madi, M.A. and Kariyawasam S. (2014). Advances in vaccination against avian pathogenic *Escherichia coli* respiratory disease: potentials and limitations. *Vet. Microbiol*, 172: 13-22.
- Goosney, D.L., Celli, J., Kenny, B. and Finlay, B.B. (1999). Enteropathogenic *Escherichia coli* Inhibits Phagocytosis. *Infect. and Immunity*, 67(2): 490-495.
- Grover, P.S., Bareja, R., Jaryal, S.C. and Narang, V.K. (2013). Characterization of Haemolytic *Escherichia coli*. *Int. J. of Sci. and Res. Pub.*, 3(2): 1-6.
- Hamad, M., Al-Aalim, A., Al-Dabbagh, S. and Ali, H. (2012). Detection of organ bacterial load in quails. *Proc. 6th Scient. Conf., College of Vet. Med. University of Mosul, Iraq*, 23-24 May 2012, 26: 47-51.
- Herlax, V., Henning, M.F., Bernascon, A.M., Goni, F.M. and Bakas, L. (2010). Health The lytic mechanism of *Escherichia coli* α -hemolysin associated to outer membrane vesicles Lytic action mechanism of OMVs-associated HlyA. *Nat. Sci.*, 2: 484-492
- Hogan, J.S., Todhunter, D.A., Smith, K.L. and Schoenberger, P.S. (1990). Hemagglutination and Hemolysis by *Escherichia coli* Isolated from Bovine Intramammary Infections. *J. Dairy Sci.*, 73: 3126-313.

- Huja, S., Oren, Y., Trost, E., Brzuszkiewicz, E., Biran, D., Blom, J., Goesmann, A., Gottschalk, G., Hacker, J., Ron, E.Z. and Dobrindt, U. (2015). *Gen. avenue to avian. colisepticemia. MBio.*, 6:1-13
- Italia, J.T., Rovira, H.G., Masangkay, J.S., Yoshikawa, Y., Talia, M.T., Rovira, J. Masangkay, S., Yoshikawa, Y., Perez, M.T.M., Reyes, A.W.B. and Baticados, W.N. (2012). Conventional isolation and polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* O157:H7 from intestines of philippine bats. *Veterinarski Arhiv*, 82: 283-294.
- Jabur, Z.A., Fakhry, S.S., Hassan, M.A. and Kadhem, B.Q. (2016). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Food. *World J. of Exp. Biosci*, 4: 83-86.
- Johnson, J.R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol, Rev.*, 4(1): 80-128.
- Kaira, S.S. and Pai, C. (2018). Study of uropathogenic *Escherichia coli* with special reference to its virulence factors. *Int. J. of Comm. Med. and Publ. Health*, 5(1): 177-181.
- Kalule, J.B., Keddy, K.H., Mark, P. and Nicol, M.P. (2018). Characterisation of STEC and other diarrheic *E. coli* isolated on CHROMagar™STEC at a tertiary referral hospital Cape Town. *BMC Microbiol*, 18: 1195-1197.
- Kenneth, A. (2008). Scaled quail management in Trans-Pecos Texas. Proc Wildlife Conference, Alpine, Texas, August 14, 2008, 18-19.
- Klemm, P. and Schembri, M.A. (2000). Bacterial adhesins: function and structure. *Int. J. Med. Microbiol*, 290: 27-35.
- Knobl, T., Gomes, T.A.T., Vieira, M.A.M., Ferreira, F., Bottino, J.A. and Ferreira, A.J.P. (2006). Some adhesins of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from septicemic poultry in Brazil. *Braz. J. Microbiol*, 37(3): 379-384.
- Kukanur, S., Meundi, M., Bajaj, A. and Kotigadde, S. (2015). Co-Relation between Virulence factors and antibiotic resistance of *E. coli*, with special reference to uropathogenic *E. coli*. *J. of Dent. and Med. Sci.*, 14(3): 15-21.
- Kunert-Filho, H.C., Carvalho, D., Grassotti, T.T., Soares, B.D., Rossato, J.M., Cunha, A.C., Brito, K.C., Cavalli, L.S. and Brito, B.G. (2015). Avian pathogenic *Escherichia coli*-methods for improved diagnosis. *World Poult. Sci J.*, doi: 10.1017/S0043933915000264
- Kurl, D.N., Haataja, S. and Finne, J. (1989). Hemagglutination activities of group B, C, D and G streptococci: Demonstration of novel sugar-specific cell-binding activities in *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* 57(2): 384-389.
- Laura, C., Rodney, R. and Welch, A. (2016). Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: A cloak or a dagger?, *Biochimica et Biophysica ACTA*. 538-545.
- Maheswari, U.B., Palvai, S., Anuradha, P.R. and Kammili, N. (2013). Hemagglutination and biofilm formation as virulence markers of uropathogenic *E. coli* in acute urinary tract infections and urolithiasis. *Ind. J. of Urol.*, 29: 277-281.
- Mittal, S., Sharma, M. and Chaudhary, U. (2014). Study of Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli* and Its Antibiotic Susceptibility Pattern. *Irian J. Pathol. and Microbiol*, 57(1): 61-64.
- Moon, G.S., Pyun, Y.R. and Kim, W.J. (2006). Expression and purification of a fusion-typed pediocin PA-1 in *Escherichia coli* and recovery of biologically active pediocin PA-1. *Int. J. of Food Microbiol*, 108(1): 136-140.
- Moulin-Schouleur, M., Reperant, M., Laurent, S., Bree, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P., Rasschaert, D. and Schouleur, C. (2007). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J. Clin. Microbiol*, 45(10): 3366-3376.

- Neter, E., Bertram, L.F., Zak, D.A. and Arbesman, C.E. (1952). Studies on hemagglutination and hemolysis by *Escherichia coli* antisera. *J. of Exp. Med.*, 96(1):1-15.
- Nowicki, B., Truong, L., Moulds, J. and Hull, R. (1988). Presence of the Dr receptor in normal human tissues and its possible role in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Am. J. of Pathol*, 133: 1-4.
- Osman, K.M., Hessain, A.M., Abo-shama, U.H., Girh, Z.M., Kabli, S.A., Hemeg, H.A. and Moussa, I.M. (2018). An alternative approach for evaluating the phenotypic virulence factors of pathogenic *Escherichia coli*. *Saudi J. of Biolog. Sci.*, 25: 195-197.
- Prihtiyantoro W dan Khusnan. (2016). *Karakterisasi fenotip dan genotip faktor-faktor virulensi Escherichia coli dari kasus kolibasilosis burung puyuh*. Laporan Penelitian Dasar. Kopertis Wilayah V Yogyakarta, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan.
- Radwan, I.E.H., Sayed, H.S., Soad, A.A.A. and Marwa, A.Y.A. (2014). Frequency of some virulence associated genes among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from septicemic broiler chickens. *Int. J. of Adv. Res.*, 2(12): 867-874.
- Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J. and Nolan, L.K. (2005). Characterizing the APEC pathotype. *Vet. Res.*, 36: 241-256.
- Roy, P., Purushothaman, V., Koteeswaran, A. and Dhillon, A.S. (2006). Isolation, characterization, and antimicrobial drug resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from Japanese quail and their environment. *J. of Appl. Poult. Res.*, 15: 442-446.
- Salasia, S.I.O. and Laemler C. (1994). Occurrence of haemagglutinating adhesin among virulent and avirulent isolates of *Streptococcus suis*. *Med. Sci. Res.*, 22: 763-764.
- Salasia, S.I.O. 1994. Untersuchungen zu mutmaßlichen Pathogenitätsfaktoren von *Streptococcus suis*. Veterinary Medicine Disertasi. Justus-Liebig-Universität-Gießen.
- Salehi, M. and Ghanbarpour, R. (2010). Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Commercial Layer Hens with Salpingitis. *Am. J. of Anim. and Vet. Sci.*, 5 (3): 208-214.
- Salit, I.E. and Gotschlich, E.C. (1977). Hemagglutination by purified type I *Escherichia coli* pili. *J. Exp. Med.*, 146(5): 1169-1181.
- Sekhar, M.S., Sharif, N.M. and Rao, T.S. (2017). Serotypes of sorbitol-positive shiga toxinogenic *Escherichia coli* (SP-STEC) isolated from freshwater fish. *Int. J. of Fish. and Aqua. Stud.*, 5(3): 503-505.
- Shankar, T.V.S., Sharma, A. and Grover, Y. (2010). Studies on different virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Haryana Veterinarian*. 49: 45-47.
- Sharma, S., Bhat, G.K. and Shenoy, S. (2007). Virulence factors and drug resistance in *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. *Ind. J. Med. Microbiol*, 25: 369-373.
- Stapp, J.R., Jelacic, S., Yoo-Lee, Y., Klein, E.J., Fischer, M., Clausen, C.R., Qin, X., Swerdlow, D.L. and Tarr, P.I. (2000). Comparison of *Escherichia coli* O157:H7 antigen selection in stool and broth cultures to that in sorbitol-MacConkey agar stool culture. *J. of Clin. Microbiol*, 38(9): 3404-3406.
- Tivendale KA, Logue C.M., Kariyawasam, S., Jordan, D., Hussein, A., Li, G., Wannemuehler, Y. and Nolan, L.K. (2010). Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infection and Immunity*. 78(8): 3412-3419.
- Turblin V. 2009. *E. coli* in poultry production: Laboratory Diagnostic of Avian

- Pathogenic Strains (APEC). 26 September 2009. CEVA Animal Health Asia Pacific. Selangor, Malaysia.
- van der Westhuizen, W.A. and Bragg, R.R. (2012). Multiplex polymerase chain reaction for screening avian pathogenic *Escherichia coli* for virulence genes. *Av. Pathol*, 41(1): 33-40.
- Vidotto, M.C., Muller, E.E., Freitas, J.C., Alfieri, A.A., Guimaraes, I.G. and Santos, D.S. (1990). Virulence factors of avian *Escherichia coli*. *Av. Dis.*, 34: 531-538.
- Vidotto, M.C., Cacao, J.M., Goes, C.R. and Santos, D.S. (1991). Plasmid coding for aerobactin production and drug resistance is involved in virulence of *Escherichia coli* avian strains. *Brazil J. Med. Biol. Res*, 24(7): 677-685.
- Welch, R.A., Dellinger, E.P., Minshew, B. and Falkow, S. (1981). Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature*. 17: 665-667.
- Welch, R.A. (1991) Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol*, 5(3): 521-528.
- Wibawan, I.W.T., Laemmler, C. and Pasaribu, F.H. (1993). A haemagglutinin adhesion of group B Streptococci isolate from cases of bovine mastitis mediated adherence to hella cell. *J. Gen Microbiol*, 139: 2173.
- Zahid, A.A.H., AL-Mossawei, M.T.M. and Mahmood, A.B. (2016). In vitro and in vivo pathogenicity tests of local isolates APEC from naturally infected broiler in Baghdad. *Int. J. of Adv. Res.*, 3(3): 89-100.
- Zhao, T., Doyle, M.P., Shere, J. and Garber L. (1995). Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl. and Envir. Microbiol*, 61: 1290-1293.