

Diagnosa *Vibrio cholerae* Dengan Metode Kultur Dan PCR Pada Sampel Sumber Air Minum

DESI YUSNITA¹, VISENSIUS KRISDIANILO²

Institut Kesehatan Medistra Lubuk Pakam

Jl. Sudirman No.38 Lubuk Pakam Pekan, Deli Serdang, Sumatera Utara

e-mail :desiyusnitaa54@gmail.com

DOI : <https://doi.org/10.35451/jfm.v4i1.669>

Abstract

Acute diarrhea due to infection can be caused by a bacterial, viral or parasitic infection. One of the bacteria that causes diarrhea is *Vibrio cholerae* and usually the diarrhea caused is called cholera diarrhea. Cholera diarrhea is caused by enterotoxins produced by *V. cholerae* bacteria and forms colonies inside the small intestine. Symptoms include vomiting, defecation such as large amounts of rice water resulting in dehydration, electrolyte loss and increased blood acidity. In severe cases, the sufferer continuously defecates accompanied by vomiting, so that the sufferer will lose fluids and electrolytes quickly from the gastrointestinal tract. This leads to a rationing of metabolic acidity and when left untreated can lead to death. *V. cholerae* bacteria are not invasive, do not enter the bloodstream but remain in the intestinal tract. At the time of infection through contaminated food and beverages ingested, then after passing through the stomach acid defense *V. cholerae* produces two virulence factors that cause cholera, namely coregulated pilus toxin (TCP) and cholera toxin (CT). The existence of specific enterotoxin cholera only found in *V. cholerae* pathogens can be targeted in laboratory tests for the diagnosis of pathogenic *V. cholerae* bacteria using biomolecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR) methods. From the results of the examination of drinking water samples at the drinking water depot around the bottom of the pakam, obtained the results of the PCR examination confirmed by electrophoresis is 302 bp, which means that in the sample there are bacteria that are identic with *Vibrio cholera*.

Keywords : *Vibrio cholera*, PCR

1. LATAR BELAKANG

Diare akut masih menjadi permasalahan bagi sebagian masyarakat di Negara berkembang. Terdapat beberapa mikroorganisme yang dapat menyebabkan diare salah satunya *Vibrio cholera*, penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri ini dikenal dengan diare kolera. Diare kolera timbul karena bakteri tersebut berkembang dalam usus kecil dan juga memproduksi enterotoksin. Akibat yang ditimbulkan dari adanya enterotoksin dalam tubuh ialah timbul muntah, serta buang air besar dengan jumlah yang banyak dan berwarna seperti air cucian beras, bila muntah dan diare dalam waktu yang lama mengakibatkan naiknya keasaman dan akan kehilangan banyak elektrolit dalam tubuh. Bila keadaan ini makin parah dapat menyebabkan kematian (Sumarsono, 1996 dan Pelezar, 2005).

Vibrio cholerae secara morfologi termasuk kedalam bakteri gram negative berbentuk batang bengkok seperti koma, ukuran bakteri ini $0,5 \mu\text{m} \times 1,5$ sampai $3,0 \mu\text{m}$, *Vibrio cholerae* hidup secara aerob dan juga anaerob fakultatif, bakteri ini dapat bergerak karena terdapat flagel monotrik, bakteri ini dapat tumbuh pada suhu $18-37^{\circ}\text{C}$, pada biakan yang sudah lama bakteri ini dapat berubah ke bentuk batang lurus dan juga bakteri ini tidak dapat menghasilkan spora (Matson, 2007).

Vibrio cholerae terdapat hidup di usus dan tidak dapat masuk kedalam aliran (Lindmark, 2009). Toxin coregulated pilus (TCP) dan cholera toxin (CT) dihasilkan dari kontaminasi *Vibrio cholera* yang masuk melalui makanan ataupun minuman yang kemudian dapat melewati asam lambung dalam tubuh (Chauduri, 2009 dan Walia, 1999). cholera enterotoksin yang hanya ada pada *V. cholerae* pathogen, menjadi target identifikasi dalam pemeriksaan laboratorium untuk mengidentifikasi bakteri *V. cholerae* pathogen, teknik yang digunakan untuk identifikasi tersebut adalah metode polymerase chain reaction (PCR) (Chomvarin, 2007 dan Marashi, 2013).

2. METODE

Pembiakan Bakteri

Sampel air minum pada depot disekitar lubuk pakam diambil masing masing 50 ml kemudian dihomogenkan, selanjutnya sampel ditanam terlebih dahulu pada media pembenihan berisi alkaline peptone water (APW) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil pembenihan disubkultur ke media thiosulfate-citrate-bile-sucrose (TCBS) lalu diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Uji Biokimia

Biakan bakteri hasil kultur pada media TCBS di tanam pada media

biokimia seperti uji Kligler Iron Agar (KIA), uji oksidase, uji pertumbuhan dengan tidak menambahkan NaCl, uji Sucrose Semi Solid(SSS), uji Motility Indole Ornithine (MIO), uji dekarboksilasi (lysine, arginine, ornithine), serta uji maltose, dan arabinose.

Untuk Identifikasi molekuler secara Polymerase Chain Reaction (PCR) menggunakan kit Invitrogen. Selanjutnya Primer akan diencerkan sesuai dengan instruksi pada kit dalam tube master. Kemudian melalui tahapan predenaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit, untuk proses denaturasi berlangsung pada suhu 94°C selama 1 menit, proses annealing (pengikatan) berlangsung pada 55°C selama 1 Menit, kemudian proses extention (pemanjangan) berlangsung pada suhu 72°C selama 1 Menit, dan proses elongation (pemanjangan akhir) berlangsung pada suhu 72°C selama 7 menit. Siklus pada Proses PCR terjadi sebanyak 35 siklus. Setelah proses pemanjangan rantai kemudian proses selanjutnya identifikasi secara elektroforeses dengan terlebih dahulu menyiapkan Gel agarosa 2% kemudian diletakan pada alat elektroforesis. Proses selanjutnya mengambil sampel sampel sebanyak 9 µL yang sudah

homogen dengan blue juice sebanyak 1 µL kemudian dimasukkan ke dalam well (sumur). Proses deteksi secara Elektroforesa dilakukan dengan tegangan 100 volt dan berlangsung sekitar 45 menit. Setelah proses selesai gel kkemudian dimasukan ke alat pengamat DNA (Gel Doc) dan diamati dengan lampu UV. Hasil yang didapatkan selanjutnya akan dibandingkan dengan pita standar *Vibrio cholera*.

3.HASIL DAN PEMBAHASAN



Gambar 1. Hasil penanaman sampel pada media TCBS

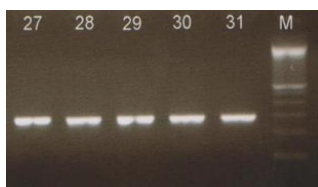
Hasil identifikasi sampel pada air minum didapat morfologi pada media TCBS adalah permukaan halus, agak datar, bagian tengah koloni buram dan bagian pinggir koloni terang serta berwarna kuning, hasil dapat dilihat pada gambar 1

Tabel 1. Hasil Uji Biokimia

UJI BIODIAGNOSTIK	HASIL
OKSIDASE	+

PERTUMBUHAN TANPA PENAMBAHAN	+
NaCl	
Klingler Iron Agar (KIA)	Alkali/ Asam
Motility Indole Ornithine (MIO)	+++
Sucrose Semi Solid (SSS)	+
Lysine	+
Arginine	-
Ornithine	+
Maltose	+
arabinose	-

Hasil uji biokimia dari isolate hasil kultur dari sampel air minum pada media uji oksidase, pertumbuhan tanpa penambahan NaCl, KIA (Kligler Iron Agar), MIO (Motility Indole Ornithine), SSS (Sucrose Semi Solid), lysine, arginine, ornithine, maltose, dan arabinose, sebagian besar hasilnya positif kecuali pada uji arginine dan arabinose yang menunjukkan hasil negative.



Gambar 2. Hasil elektroforensis sampel bakteri

Hasil uji PCR Pada sampel yang di deteksi dengan elektroforensis menggunakan sinar UV, didapatkan panjang pita pasangan basa DNA yang nantinya dibandingkan dengan pita standard, untuk hasil identifikasi didapatkan pita sepanjang 302 bp,

sedangkan untuk panjang pita standar *V. cholera* sekitar 302 bp, yang berarti hasil identifikasi pada sampel bakteri tersebut identic dengan bakteri *Vibrio cholera*.

Polymerase Chain Reaction (PCR) menjadi metode baku dalam proses amplifikasi urutan basa DNA tertentu (selektif). Polymerase Chain Reaction (PCR) digunakan pertama kali oleh Kary Mullis di tahun 1987. Polymerase Chain Reaction (PCR) dapat menggandakan jumlah urutan nukleotida atau urutan basa tertentu secara in vitro (didalam tabung). Proses penggandaan urutan basa tersebut terjadi dengan adanya reaksi polimerisasi secara berulang-ulang dan berantai selama beberapa siklus, dalam setiap reaksi polimerisasi memerlukan untai DNA yang nantinya digunakan sebagai template (cetakan) (Sachse, 2010).

Keunggulan diagnosis DNA menggunakan metode PCR pada identifikasi bakteri *V. cholerae* yaitu

proses yang dibutuhkan relative cepat dan metode ini memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi jika dibandingkan dengan metode kultur (pembiakan) yang menjadi metode baku emas (gold standard) pada identifikasi bakteri (Kaper,1995 dan Rosilawati, 2002).

4.KESIMPULAN

Dari hasil pemeriksaan sampel air minum pada depot air minum disekitar lubang pakam, didapatkan hasil dari pemeriksaan PCR yang dikonfirmasi dengan elektroforensis adalah 302 bp, yang berarti pada sampel tersebut terdapat bakteri yang identic dengan *Vibrio cholera*.

DAFTAR PUSTAKA

Chomvarin C, Namwat W, Wongwajana S, Alam M, Thaew-Nonngiew K, Sinchaturus A, Engchanil C. Application of duplex-PCR in rapid and reliable detection of toxigenic *Vibrio cholerae* in water samples in Thailand. J. Gen. Appl. Microbiol. 2007; 53: 229±237.

Kaper JB, Morris JG, Levine MM. Cholera. Clinical Microbiology Reviews. Clin. Microbiol. Rev. 1995; 8(1):48.

Lindmark Barbro. Modulators of *Vibrio cholerae* Predator iInteraction and Virulence. Sweden: Department of

Molecular Biology Umea University; 2009.

Marashi SMA, Rajabnia R, Fooladi AAI, Hojati Z. Determination of *ctxAB* Expression in *Vibrio cholerae* Classical and EITor Strains using Real Time PCR. Int J Mol Cell Med. 2013;2: 9-13.

Matson JS, Withey JH, DiRita VJ. Regulatory Networks Controlling *Vibrio cholerae* Virulence Gene Expression. Infection and Immunity. 2007; 75(12): 5542±49.

Pelczar J.M. Dasar ± Dasar Mikrobiologi. Jakarta: Universitas Indonesia, 2005.

Rosilawati ML, Sudarmono P, Ibrahim F. Sensitivitas metode PCR (Polymerase chain reaction) dalam mendekteksi isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis*. J Kedokteran Trisakti. 2002;.21(1)

Sachse K, Nat R, Frey J. PCR detection of microbial pathogens. Humana Press; 2010.

Soemarsono H. Kolera: dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jakarta: Balai Penerbit FKUI, 1996. p. 443