

DETEKSI BAKTERI *VIBRIO CHOLERAE*

Rizka Khoirunnisa Guntina, Sri Agung Fitri Kusuma

Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung-Sumedang KM 21, Jatinangor 45363
Telepon (022)7796200, Faksimile (022)7796200, E-mail:fmunpad@telkom.net

Abstrak

V. cholerae dapat menyebabkan penyakit diare kolera. Penyakit ini disebabkan oleh enterotoksin yang dihasilkan oleh *V. cholerae*. *V. cholerae* banyak ditemukan pada permukaan air yang telah terkontaminasi oleh tinja yang mengandung bakteri *V. cholerae*. Deteksi *V. cholerae* dilakukan dengan beberapa cara diantaranya dengan metode konvensional menggunakan uji biokimia, uji serologi, *strip test*, *co-agglutination test*, dan *dark field test* serta metode molekuler menggunakan polymerase chain reaction (PCR). Sampel yang digunakan berasal dari sampel cair (lingkungan sekitar) dan hasil kultur bakteri. Dari seluruh metode yang dapat digunakan, dapat disimpulkan bahwa metode deteksi bakteri *V. cholerae* dengan menggunakan *strip test* adalah yang paling efektif dan akurat.

Kata Kunci: *Vibrio cholerae*, *strip test*, PCR, kultur bakteri

Abstract

V. cholerae can cause cholera diarrhea. The disease is caused by the enterotoxins produced by *V. cholerae*. *V. cholerae* is commonly found on water surfaces that have been contaminated by stools containing *V. cholerae* bacteria. Detection of *V. cholerae* is performed in several ways such as conventional method using biochemical test, serology test, *strip test*, *co-agglutination test*, and *dark field test* and also molecular method using polymerase chain reaction (PCR). The sample used is derived from the liquid sample (surrounding environment) and the result of bacterial culture. From all the methods that can be used, it can be concluded that the detection method of bacteria *V. cholerae* by using *strip test* is the most effective and accurate method.

Keywords: *Vibrio cholerae*, *strip test*, PCR, bacterial culture

PENDAHULUAN

Pada tahun 2015, 42 negara melaporkan total 172.454 kasus kolera termasuk 1.304 kematian akibat penyakit kolera, menghasilkan *case fatality ratio* keseluruhan (CFR) sebesar 0,8%. Angka ini menunjukkan penurunan 9% dalam jumlah kasus yang dilaporkan dibandingkan dengan tahun 2014 (190.549 kasus). Kasus dilaporkan dari semua wilayah, termasuk 16 negara di Afrika, 13 negara di Asia, 6 negara di Eropa, 6 negara di Amerika, dan 1 negara di Oceania. Afghanistan, Republik Demokratik Kongo (DRC), Haiti, Kenya, dan Republik Bersatu Tanzania menyumbang 80% dari semua kasus. Dari kasus yang dilaporkan secara global, 41% berasal dari Afrika, 37% dari Asia dan 21% dari Hispaniola (World Health Organization, 2016)

Angka prevalensi diare di Indonesia masih berfluktuasi. Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2007, prevalensi diare klinis adalah 9,0% (rentang: 4,2% - 18,9%), tertinggi di Provinsi NAD (18,9%) dan terendah di D.I. Yogyakarta (4,2%). Beberapa provinsi mempunyai prevalensi diare klinis >9% (NAD, Sumatera Barat, Riau, Jawa Barat, Jawa Tengah, Banten, Nusa Tenggara Barat, Nusa Tenggara Timur, Kalimantan Selatan, Sulawesi Tengah, Sulawesi Tenggara, Gorontalo, Papua Barat dan Papua) (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2007).

Sedangkan menurut data Riskesdas pada tahun 2013 angka prevalensi mengalami penurunan sebesar (3,5%) untuk semua kelompok umur. Insiden diare balita di Indonesia adalah 6,7 persen. Lima provinsi dengan insiden diare tertinggi adalah Aceh (10,2%), Papua (9,6%), DKI Jakarta (8,9%), Sulawesi Selatan (8,1%), dan Banten (8,0%) (tabel 3.4.5). Karakteristik diare balita tertinggi terjadi pada kelompok umur 12-23 bulan (7,6%), laki-laki (5,5%), tinggal di daerah pedesaan (5,3%), dan kelompok kuintil indeks kepemilikan terbawah (6,2%) (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2013).

Oralit dan zinc sangat dibutuhkan pada pengelolaan diare balita. Oralit dibutuhkan sebagai rehidrasi yang penting saat anak banyak kehilangan cairan akibat diare dan kecukupan zinc di dalam tubuh balita akan membantu proses penyembuhan diare. Pengobatan dengan pemberian oralit dan zinc terbukti efektif dalam menurunkan tingginya angka kematian akibat diare sampai 40%. Selain itu pemberian antibiotik juga dapat dilakukan untuk pengobatan penyakit kolera (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2013).

Vaksinasi juga dapat dilakukan agar tidak tertular bakteri kolera. Namun distribusi vaksin masih sangat terbatas. Ada tiga merk vaksin kolera yang telah lolos uji pre-kualifikasi WHO, yaitu Dukoral®,

Shanchol™, and Euvichol®. Vaksin tersebut diberikan secara oral. Vaksin diperuntukkan bagi orang-orang yang akan bepergian ke daerah wabah kolera dan bagi mereka yang memiliki akses pelayanan medis terbatas (misalnya petugas bantuan kemanusiaan). Idealnya, vaksin kolera diberikan sekitar satu minggu sebelum orang tersebut pergi ke daerah rawan kolera. Bagi yang berusia diatas enam tahun, 2 dosis vaksin kolera dapat melindungi mereka dari infeksi bakteri kolera selama dua tahun. Sedangkan bagi anak-anak yang berusia dua sampai enam tahun, dibutuhkan 3 dosis vaksin kolera untuk melindungi mereka dari serangan bakteri kolera selama enam bulan (World Health Organization, 2016).

Karena penularannya yang melalui air atau hewan-hewan yang hidup di air yang tercemar oleh bakteri *V. cholerae*, pencegahan penularan dapat dilakukan dengan beberapa cara. Salah satunya adalah dengan penyediaan air bersih dan menghindari menampung air dalam wadah bermulut lebar jika ada salah satu warganya yang terkena infeksi *V. cholerae*. Untuk penularan melalui hewan-hewan yang hidup di air seperti ikan, kerang, remis, udang, tiram, dan kepiting yang mungkin tercemar oleh bakteri dapat diatasi dengan cara memasak hingga matang sebelum dikonsumsi. Konsumsi makanan-makanan laut secara mentah dapat meningkatkan resiko infeksi oleh *V. cholerae*. Selain itu,

mencuci peralatan yang digunakan untuk makan atau wadah yang akan diisi makanan dengan air bersih juga dapat membantu mencegah penularan penyakit kolera.

Tingginya angka kejadian penyakit kolera di dunia terutama di Indonesia menuntut perlunya metode deteksi yang efektif dan akurat. Deteksi *V. cholerae* dapat dilakukan secara konvensional yaitu dengan menggunakan metode *strip test*, *co-agglutination test*, dan *dark field test* maupun secara molekuler menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

Vibrio cholerae merupakan bakteri yang berbentuk batang bengkok seperti koma berukuran (0,5 µm x 1,5–3,0 µm), Gram negatif, tidak berspora, hidup secara aerob atau anaerob fakultatif, bergerak melalui flagel yang monotrik, tidak membentuk spora, dan pada biakan tua dapat menjadi berbentuk batang lurus. Morfologi dan sifat-sifat *V. cholerae* ini dapat dijadikan pedoman dalam diagnosa atau identifikasi *V. cholerae* secara konvensional. Keberadaan *cholera enterotoksin* yang spesifik hanya terdapat pada *V. cholerae* patogen dapat menjadi target dalam pemeriksaan laboratorium untuk diagnosa bakteri *V. cholerae* patogen dengan menggunakan teknik biomolekuler seperti metode *polymerase chain reaction* (PCR) (Chomvarin, et al., 2007).

V. cholerae dapat ditemukan di lingkungan sekitar seperti air sungai, air laut, air sumur, air penampungan, bahkan di

hewan-hewan air yang biasa dikonsumsi manusia.

Berbagai metode berbasis *polymerase chain reaction (PCR)* telah dilaporkan untuk identifikasi spesies *Vibrio*. Metode ini mencakup *PCR real-time*, *microarray* dan *PCR multiplex*. Namun, dua metode pendeteksian pertama mahal karena persyaratan untuk instrumen yang mahal, sedangkan metode *PCR multiplex* yang mendeteksi target spesies tunggal atau multipel terhitung efektif (Hossain, et al., 2012).

Deteksi bakteri patogen secara konvensional terutama didasarkan pada prosedur budidaya, menggunakan *enrichment broth* yang dilanjutkan dengan isolasi koloni pada media selektif, identifikasi biokimia dan konfirmasi patogenitas. Metode kultur ini selektif untuk menentukan satu jenis patogen. Teknologi molekuler, yang terutama didasarkan pada amplifikasi DNA dengan uji *polymerase chain reaction (PCR)*, dapat digunakan untuk melengkapi atau mengganti pendekatan berbasis budaya dan melewati beberapa bias dan keterbatasan intrinsiknya. Deteksi patogen dengan menggunakan *PCR* dianggap sebagai metode sensitif untuk diterapkan pada sampel lingkungan dan produk makanan (Thompson, et al., 2005).

Metode konvensional yang digunakan untuk mendeteksi dan mengklasifikasikan *vibrio* penyebab kolera

yang diisolasi dari sampel klinis dan lingkungan memerlukan beberapa hari untuk menyelesaikan dan melibatkan kultur dalam air peptone alkali, agar suap empedu asam tiosulfat sitrat, aglutinasi geser dengan antisera spesifik, dan uji untuk produksi toksin kolera (Singh, et al., 2002).

Salah satu metode konvensional yang dapat dilakukan adalah dengan menggunakan *strip test*. Uji ini menggunakan metode *sandwich immunochromatography assay*. Strip ini menggunakan plastik strip yang dilapisi kertas membran berukuran 5mm X 80 mm. Pada daerah bawah strip tersebut merupakan area spesimen yang dilapisi dengan antibodi monoklonal yang diberi *gold*. Area ini digunakan sebagai sistem deteksi. Pada bagian tengah dari membran strip didesain sebagai zona reaksi antara antigen yang terdeteksi dengan tes kontrol. Sementara pada bagian atas dari strip digunakan sebagai pegangan dalam melakukan tes. Pada zona reaksi terdapat 2 pita, pada pita pertama dilapisi dengan antibodi *V.cholerae* dan pada pita kedua dilapisi dengan *anti mouse antibody*. Antibodi *V.cholerae* pada pita pertama akan mengikat *site* kompleks antigen *V.cholerae-Monoclonal antibody*, sedangkan *anti mouse antibody* akan mengikat *site monoclonal antibody*, sehingga terbentuk warna merah muda pada daerah pita (Nato, et al., 2003).

Uji serologi dilakukan untuk konfirmasi koloni *V. cholerae* dilakukan dengan reaksi aglutinasi antigen somatik (antigen O). Antiserum spesifik *V. cholerae* terdiri dari antiserum polivalen, monovalen ogawa dan monovalen inaba (Kharirie, 2013).

Metode konvensional lainnya yang dapat digunakan adalah menggunakan *co-agglutination test*. Tes ini dilakukan dengan menggunakan antisera yang mengandung antibodi monoklonal yang langsung direaksikan dengan bahan sampel dengan menggunakan sediaan gelas. Tes ini juga menggunakan protein A dari bakteri *Staphylococcus aureus* (Cowan 1) yang dilapisi pada antibodi monoklonal. Antigen 3 (*V.cholerae*) akan bereaksi dengan reagen yang mengandung antibodi monoklonal sehingga terbentuk aglutinasi. Spesimen yang digunakan dapat berupa swab tinja atau dengan menggunakan medium perbenihan terlebih dahulu yang diinkubasi 37°C selama 4-6 jam (Wang, et al., 2006).

Metode *dark field test* (mikroskop lapangan gelap) juga termasuk dalam metode konvensional. Metode ini dilakukan untuk uji skrining feses untuk menentukan ada tidaknya *V.cholerae*. Spesimen feses bentuk cair dapat dilakukan pemeriksaan langsung dengan meneteskan spesimen pada gelas kaca dan ditutup dengan penutup gelas kaca dan dilihat dibawah mikroskop lapang gelap. Spesimen dapat juga

dilakukan perbenihan dulu pada medium alkalis pepton water (Sariadji, et al., 2015).

Metode biokimia untuk mendeteksi *V. cholerae* memakan waktu. Antara 2 hingga 7 hari diperlukan untuk diagnosis pasti *V. cholerae*. Deteksi *V. cholerae* memerlukan tes yang cepat, dan waktu merupakan faktor penting dalam menentukan kegunaan metode deteksi apapun. Selain itu, teknisi ahli diperlukan untuk melakukan tes ini, namun keahlian semacam itu tidak tersedia di semua laboratorium (Tarr, et al., 2007).

Deteksi berbasis PCR adalah teknik yang cepat dan sensitif untuk diagnosis primer dan kontrol patogenisitas di mana gen spesifik biotipe, seperti *ctxA* dan *tcpA*, digunakan untuk mengidentifikasi adanya *V. cholerae*.

METODE

Pembiakan Bakteri

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 dimasukkan ke dalam media untuk reaksi oksidase, pertumbuhan tanpa penambahan NaCl, KIA (Kligler Iron Agar), MIO (Motility Indole Ornithine),

SSS (Sucrose Semi Solid), lysine, arginine, ornithine, maltose, dan arabinose.

Uji Serologi

Teteskan satu tetes antiserum polivalen *V. cholerae* di gelas objek steril lalu oleskan satu ose koloni bakteri hasil biakan pada media TCBS. Olesan dimulai dari pinggir tetesan antiserum polivalen. Selanjutnya aduk gelas objek dan dilihat reaksi aglutinasi.

Untuk menentukan serotipnya, lakukan uji aglutinasi dengan menggunakan antiserum monovalen *V. cholerae*. Antiserum monovalen terdiri dari antiserum Inaba dan Ogawa.

Dark Field Test

Teteskan spesimen pada gelas kaca yang ditutup dengan gelas kaca lalu dilihat di bawah mikroskop lapang gelap. Dapat juga dilakukan perbenihan terlebih dahulu dalam media APW.

Strip Test

Celupkan strip ke dalam spesimen lalu tunggu interpretasi hasil selama 5-15 menit.

Co-Agglutination Test

Spesimen direaksikan secara langsung dengan antibody monoklonal pada sediaan gelas. Dilihat apakah terbentuk aglutinasi.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Encerkan primer dengan nuclease free water dengan perbandingan 10:90. Sepuluh bagian primer dari tube master dimasukkan ke dalam tube steril, kemudian

ditambahkan 90 bagian nuklease free water. PCR mix yang terdiri dari 10x PCR amplification buffer (5 μ L), 5 mM $MgSO_4$ (Kharirie, 2013).

(1,5 μ L), 10 mm dNTP mixture (1 μ L), Primer forward (1 μ L), Primer reverse (1 μ L), PCR grade water (36 μ L), Taq polymerase (0,5 μ L), dibuat dalam satu tube dan sesuai kebutuhan. Kontrol negatif dibuat dengan menambahkan air steril sejumlah 4 μ L ke dalam 46 μ L PCR mix. Tambahkan DNA template sebanyak 4 μ L ke dalam masing-masing PCR tube yang telah di aliquot sehingga akan memberikan volume akhir masing-masing 50 μ L. Kontrol positif dibuat dengan menambahkan kultur DNA kontrol sejumlah 4 μ L ke dalam 46 μ L PCR mix (Kharirie, 2013).

Tube yang telah berisi mix dan DNA template dimasukkan ke dalam mesin PCR. Mesin PCR diprogram dengan tahapan predenaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, annealing (pengikatan) pada 55°C selama 1 Menit, extension (pemanjangan) pada suhu 72°C selama 1 Menit, dan elongation (pemanjangan akhir) pada suhu 72°C selama 7 menit. Proses PCR dilakukan sebanyak 35 siklus (Kharirie, 2013).

Elektroforesis

Gel agarosa 2% dibuat terlebih dahulu dan selanjutnya disiapkan pada alat elektroforesis. Sampel sebanyak 9 μ L yang

sudah dicampur homogen dengan blue juice 1 μ L dimasukkan ke dalam sumuran (well). Loading dye sebanyak 10 μ L dimasukkan ke dalam sumuran sebagai marker. Elektroforesa dilakukan pada tegangan 100 volt selama 45 menit. Setelah selesai gel kemudian diletakkan di dalam alat pengamat DNA (*Gel Doc*) dan diamati dibawah lampu UV. Pada foto dapat dilihat pola pita DNA yang ukurannya diketahui melalui perbandingan dengan ukuran pita-pita standar “1 kb DNA ladder”, dimana ukuran pola pita gen *ctx Vibrio cholerae* sesuai yang ditargetkan (Kharirie, 2013).

PCR Multiplex

Tiga pengujian PCR uniplex dilakukan dalam volume 50 μ L yang berisi 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 1 unit Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,2 mM masing-masing dATP, dCTP, dGTP dan dTTP (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 mM $MgCl_2$, 25 pmol masing-masing primer dan 50 ng Template DNA. Multiplex PCR dilakukan dengan menggabungkan seluruh primer untuk ketiga gen dalam campuran PCR yang sama. Kondisi siklus termal terdiri dari denaturasi awal pada suhu 94°C selama 4 menit diikuti oleh 35 siklus denaturasi selama 1 menit pada suhu 94°C, 1 menit penempelan pada suhu 50°C, dan 1 menit pemanjangan pada suhu 72°C. Pemanjangan akhir terjadi pada suhu 72°C selama 5 menit.

Direct Immunofluorescence

Sebanyak dua liter air di saring dengan *membrane-filter*. Lalu membran dibilas dengan 8 mL dapar fosfat, dapar fosfat ini selanjutnya difraksionasi untuk analisis *direct Immunofluorescence*. Sampel diinkubasi dalam gelap selama 6-8 jam pada suhu ruang dalam adanya ekstrak ragi dan asam nalidiksat.

Setelah diinkubasi, sampel ditambahkan formaldehida 4% dan diproses dengan menggunakan *cholera DFA kits (New Horizons Diagnostics Corporation)* untuk deteksi *V. cholerae O1*.

Preparat yang berwarna diamati di bawah mikroskop *epifluorescence* (1000X) pada 490 nm dan 520 nm dengan filter biru. Seluruh prosedur dilakukan dalam gelap. Pembacaan dilakukan dalam waktu 24 jam setelah preparasi sampel.

PEMBAHASAN

Deteksi *V. cholerae* dilakukan terhadap beberapa sampel yang terkontaminasi oleh bakteri tersebut. Sampel penelitian yang dapat dipilih sebagai objek deteksi *V. cholera* diantaranya adalah sampel air (dari langkungan sekitar seperti air sumur, sungai, atau penampungan air) (Kharirie, 2013), kotoran (Varela, et al., 1994), strain bakteri *V. cholerae O1* and non-O1 stains yang disediakan oleh Bu-Ali *reference laboratory* Iran, *Vibrio cholerae* strain NCTC 5941, didapat dari National Collection of Type Cultures, Inggris

(Mehrabadi, et al., 2012; Theron, et al., 2000).

Metode konvensional dengan medium kultur merupakan baku emas dalam mendiagnosa penyakit diare yang disebabkan oleh infeksi bakteri *V. cholerae*. Pemeriksaan dengan medium kultur mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang cukup tinggi, akan tetapi proses pemeriksaan memerlukan waktu yang cukup lama (Koneman, et al., 1990).

Sensitivitas metode tersebut mendekati 100% dan pemeriksaan dapat dilakukan terhadap sampel klinis yang

mempunyai kandungan bakteri 10-100 sel. Meskipun metode kultur merupakan metode baku, namun metode konvensional memiliki kekurangan karena untuk identifikasinya memerlukan waktu yang lebih lama yaitu 2-3 hari. Metode konvensional juga harus dilakukan oleh tenaga laboratorium yang sudah terlatih dan hal lain yang menjadi kendala adalah umumnya tidak tersedianya fasilitas laboratorium mikrobiologi pada kasus kejadian luar biasa kolera (Priadi & Natalia, 2000).

Reaksi biokimia	Hasil reaksi
Oksidase	+
Pertumbuhan tanpa penambahan NaCl	+
KIA (Kligler Iron Agar)	Alkali / Asam
MIO (Motility Indole Ornithine)	+++
SSS (Sucrose Semi Solid)	+
Lysine	+
Arginine	-
Ornithine	+
Maltose	+
Arabinose	-

Tabel Hasil Uji Biokimia positif *V. cholerae*

Serotipe <i>V. cholerae</i> O1	Aglutinasi	
	Antiserum Ogawa	Antiserum Inaba
Ogawa	+	-
Inaba	-	+
Hikojima	+	+

Tabel Hasil Uji Serologi dengan antiserum *V. cholerae*

Uji lapang gelap merupakan salah satu metode konvensional dengan menggunakan mikroskop. Spesimen di

bawah mikroskop lapang gelap akan tampak kuman *V.cholerae* yang menunjukkan gerak yang khas yang disebut

“*darting motility*”, terlebih bila jumlah organisme dalam tinja $> 10^5$ /mL. Bakteri akan tampak berhenti, tidak bergerak, bila ditambahkan antiserum spesifik (Sariadji, et al., 2015).

Metode *dark field test* memiliki sensitivitas hingga 90% dan spesivitas mencapai 96%. Kekurangan metode ini terletak pada kemampuan yang diperlukan untuk mengamati bakteri di bawah mikroskop. Diperlukan *skill lab* untuk melakukan metode ini.

Metode selanjutnya adalah metode konvensional dengan menggunakan *strip test*. Jika spesimen berupa feses yang cair, *V.cholerae* dapat langsung dideteksi dengan sensitivitas 10^6 CFU/mL. Apabila sampel berupa *tipped-cotton swab*, *V.cholerae* dapat dideteksi dengan 10 CFU/mL, akan tetapi harus dilakukan perbanyakan bakteri terlebih dahulu dengan menggunakan medium alkalis pepton water dan diinkubasi selama 4 – 6 jam. Hasil dengan terbentuknya 2 pita merah muda menunjukkan hasil positif *V.cholerae* dan bila terbentuk satu pita menunjukkan hasil yang negative (Sariadji, et al., 2015).

Metode ini memiliki sensitivitas hingga 94 – 100% dan spesivitasnya 84 – 100% . Metode ini mudah dilakukan bagi seluruh kalangan masyarakat sehingga tidak diperlukan *lab skill* untuk melakukan deteksi menggunakan metode ini. Dengan spesivitas dan sensitivitas metode ini,

dapat disimpulkan bahwa metode *strip test* merupakan metode yang paling efektif.

Metode konvensional lainnya yaitu *co-agglutination test*. Tes ini cepat, mudah dan dapat dilakukan di lapangan, namun mempunyai keterbatasan. Keterbatasan tersebut yakni jumlah minimal bakteri yang terdapat pada spesimen feses atau *rectal swab* yang telah dibuat suspensi adalah 10^6 CFU/mL. Dengan jumlah minimal bakteri *V.cholerae* 10^6 CFU/mL Uji diagnostik cepat akan menunjukkan reaksi positif, apabila jumlahnya kurang dari 10^6 CFU/mL maka sampel feses atau *rectal swab* harus dilakukan perbanyakan terlebih dahulu dengan medium APW (Sariadji, et al., 2015).

Dipstick Kit merupakan salah satu contoh dari metode *co-agglutination test*. *Dipstick Kit* memiliki antibodi monoklonal yang spesifik untuk *V.Cololerae* (VC) O1 dan O139 lipopolisakarida (LPS) dan menggunakan imunokromatografi aliran vertikal. Deteksi LPS kit adalah 10 ng / ml untuk VC O1 dan 50 ng / l untuk VC 0139 (George, et al., 2014).

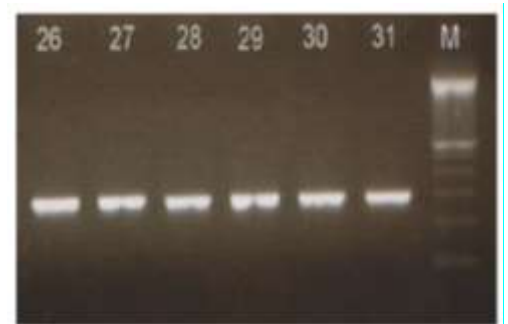
Metode ini memiliki sensitifitas 97 % dan spesifitasnya mencapai 99%. Metode ini merupakan metode alternatif terbaik apabila uji dengan *strip test* tidak dapat dilakukan.

Metode selanjutnya dalam deteksi *V. cholerae* adalah deteksi bakteri dengan amplifikasi DNA menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu metode yang digunakan untuk amplifikasi urutan basa DNA tertentu (selektif). Metode ini pertama kali ditemukan oleh Kary Mullis pada tahun 1987. Metode PCR dapat digunakan untuk menggandakan urutan basa nukleotida tertentu secara *in vitro*. Penggandaan urutan bas nukleotida berlangsung melalui reaksi polimerisasi yang dilakukan berulang-ulang secara berantai selama beberapa putaran (siklus). Setiap reaksi polimerisasi membutuhkan komponen-komponen sintesis DNA seperti untai DNA yang akan digunakan sebagai cetakan (*template*), molekul oligonukleotida untai tunggal dengan ujung 3'-OH bebas yang berfungsi sebagai prekursor (primer), sumber basa nukleotida berupa empat macam dNTP tahap selanjutnya, masing-masing untai tunggal (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), dan enzim DNA polimerase (Kharirie, 2013).

Pemeriksaan *V. cholerae* dengan menggunakan metode PCR dan kemudian dikonfirmasi dengan gel elektroforesis berhasil mendapatkan bahwa sampel tersebut merupakan mengandung bakteri *V. cholerae* patogen karena positif mengandung gen *ctx*. Gen *ctx* merupakan gen yang terdapat pada bakteri *V. cholerae* patogen yang menghasilkan toksin kolera (*cholera toxin* = CT). Toksin kolera sangat berperan dalam menyebabkan terjadinya diare. Gen *ctx* ini hanya dimiliki oleh *V. cholerae* patogen sehingga untuk

mengidentifikasi bakteri ini hanya dapat dilakukan dengan melihat gen spesifik yang dimilikinya. Gen spesifik tersebut dapat dilihat dengan pemeriksaan menggunakan metode PCR. Tidak semua bakteri *V. cholerae* mempunyai gen *ctx* dan hanya bakteri *V. cholerae* patogen yang mempunyai gen ini yaitu *V. cholerae* serogroup O1 dan O139 (Kaper , et al., 1995).



Gambar Hasil elektroforesis amplifikasi

Kelebihan metode deteksi *V. cholerae* menggunakan metode PCR adalah pada waktu yang diperlukan untuk proses pemeriksaan. Selain itu, metode PCR merupakan metode yang sensitif dan spesifik bila dibandingkan dengan metode konvensional (pembiakan) yang merupakan metode baku emas (*gold standard*) pada identifikasi bakteri. Dengan deteksi metode PCR, sampel yang diperiksa atau identifikasi bakteri penyebab infeksi dapat diketahui hasilnya dalam waktu satu hari. Tentunya hal ini sangat berbeda dengan metode pemeriksaan secara konvensional yang membutuhkan waktu lebih dari satu hari agar dapat diketahui hasilnya. Bila dibandingkan, metode konvensional lebih

murah atau tidak memerlukan biaya banyak daripada metode PCR.

Metode lain yang digunakan untuk deteksi bakteri *V. cholerae* adalah PCR multipleks.

PCR multipleks adalah teknik biologi molekuler yang terkenal untuk memperbanyak beberapa target dalam percobaan PCR tunggal. Dalam uji multiplexing, lebih dari satu urutan target dapat diamplifikasi dengan menggunakan beberapa pasangan primer dalam campuran reaksi (Mehrabadi, et al., 2012).

Metode ini mampu mendeteksi *V. cholerae* dalam sumber air dan makanan dalam waktu yang singkat. Berdasarkan hasil penelitian dan studi sebelumnya, metode PCR multipleks merupakan pendekatan paling ideal untuk deteksi cepat bakteri dalam jumlah kecil.

Metode lainnya yang dapat digunakan untuk deteksi bakteri *V. cholerae* adalah *Direct immunofluorescence of Vibrio cholerae O1* (DFA-DVC). Metode ini merupakan metode presumtif atau pendugaan keberadaan bakteri *V. cholerae* (Autlet, et al., 2007).



Gambar deteksi *V. cholerae* dengan *direct immunofluorescence*

Metode ini dapat menunjukkan keberadaan bakteri *V. cholerae* yang tidak dapat dideteksi dengan metode konvensional.

Metode selanjutnya yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan *V. cholerae* dalam specimen kotoran adalah *Dipstick Kit*.

Untuk deteksi bakteri *V. cholerae* pada sampel biologi, alat diagnostik yang akurat untuk kolera sangat dibutuhkan untuk surveilans kolera di daerah epidemi dan endemik. Namun teknik seperti kultur bakteri biasanya tidak layak di setting sumber daya rendah.

Dari hasil tersebut dapat disimpulkan jika metode paling akurat, sensitif, dan efektif adalah metode identifikasi menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR).

SIMPULAN

Uji *strip test* menggunakan metode *sandwich immunochromtography assay* merupakan metode deteksi bakteri *Vibrio cholerae* yang paling efektif dibanding metode yang lain dengan sensitivitas hingga 94 – 100% dan spesivitasnya 84 – 100% .

SARAN

Deteksi bakteri *V. cholerae* dengan menggunakan *strip test* merupakan metode yang paing cepat dan akurat. Namun pengembangan metode deteksi bakteri *Vibrio cholerae* yang cepat dan akurat baik secara konvensional maupun instrumental

(molekuler) diperlukan untuk perkembangan metode deteksi kolera di masa yang akan datang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Saya ucapka terima kasih kepada ibu Sri Agung Fitri Kusuma, M.Si., Apt atas saran dan dukungannya sehingga saya dapat menyelesaikan karya tulis ini. Semoga karya tulis ini dapat bermafaat bagi semua pihak.

Daftar Pustaka

Autlet, O. et al. 2007. Detection of viable nonculturable *Vibrio cholerae* O1 through cultures and immunofluorescence in the Tucuman rivers, Argentina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 40(4), pp. 385-390.

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2007. *Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS)*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2013. *Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS)*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.

Chomvarin, C. et al. 2007. Application of duplex-PCR in rapid and reliable detection of toxigenic *Vibrio cholerae* in water samples in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol*, Volume 53, pp. 229-237.

George, C. M. et al. 2014. Evaluation of Enrichment Method for Detection of *Vibrio cholerae* O1 using a Rapid

Dipstick Test in Bangladesh. *Trop. Med. Int. Health.*, 19(3), pp. 301-307.

Hossain, M. T. et al. 2012. Development of a groEL gene-based species-specific multiplex polymerase chain reaction assay for silmutaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnivicus*. *J. Appl. Microbiol.*, Volume 144, pp. 448-456.

Kaper , J. B., Morris , J. G. & Levine, M. M.. 1995. Cholera. *Clinical Microbiology Reviews. Clin. Microbiol. Rev.*, 8(1), p. 48.

Kharirie. 2013. Diagnosa *Vibrio Cholerae* dengan Metode Kultur dan Polimerase Chain Reaction (PCR) pada Sampel Sumber Air Minum. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*, 2(2), pp. 51-58.

Koneman, E. W. et al. 1990. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 4th ed*. Philadelphia: JB Lippincott Company.

Mehrabadi, J. F., Morsali, P., Nejad, H. R. & Fooladi, A. A. 2012. Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* with new multiplex PCR. *J. Infect. Public. Health.*, Volume 5, pp. 263-267.

Nato, F., Boutonnier, A. & Rajerison. 2003. *One Step Immunochromatographic Dipstick Tests For Rapid Detection*, s.l.: American Society for Microbiology.

- Priadi, A. & Natalia, L. 2000. Patogenesis Septicaemia Epizoqtica (Se) Pada Sapi/Kerbau: Gejala Klinis, Perubahan Patologis, Reisolasi, Deteksi Pasteurella Multocida dengan Media Kultur dan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*.
- Sariadji, K., Sunarno & Puranto, H. R. 2015. Diagnostik Cepat Sebagai Metode Alternatif Diagnosis Kholera yang Disebabkan oleh Agen Vibrio Cholerae. *Jurnal Biotek Medisiana*, 4(1), pp. 1-7.
- Singh, D. V., Isac, S. R. & Colwell, R. R. 2002. Development of a Hexaplex PCR Assay for Rapid Detection of Virulence and Regulatory Genes in Vibrio cholerae and Vibrio mimicus. *J. Clin. Microbiol.*, 40(11), pp. 4321-4324.
- Tarr, C. L. et al. 2007. Identification of Vibrio isolates by a multiplex PCR assay and rpoB sequence determination. *J. Clin. Microbiol.*, p. 134—40.
- Theron, J. et al. 2000. Detection of toxigenic Vibrio cholerae from environmental water samples by an enrichment broth cultivation-pit-stop semi-nested PCR procedure. *J. Appl. Microbiol.*, Volume 89, pp. 539-346.
- Thompson, J. R., Marcelino, L. A. & Polz, M. F. 2005. Diversity, sources and detection of human bacterial pathogens in the marine environment. In: *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. New York: S, p. 29–68.
- Varela, P. et al. 1994. Direct Detection of Vibrio cholerae in Stool Samples. *J. Clin. Microbiol*, 32(4), pp. 1246-1248.
- Wang, X. Y., Anasaruzzaman, M. & Raul, V. 2006. Field evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick test for the diagnosis of cholera in a high-risk population. *BMC Infect. Dis.*, Volume 26.
- World Health Organization. 2016. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 91(38), pp. 433-440.