

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

**KARAKTERISASI GEN CTX ISOLAT *Vibrio cholerae* DARI
PENDERITA DAN SUMBER AIR MINUM KLB DIARE DI
BOGOR TAHUN 2009**



Oleh :
drh. Khariri, M.Biomed.

**PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
KEMENTERIAN KESEHATAN RI**

2012

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

**KARAKTERISASI GEN CTX ISOLAT *Vibrio cholerae* DARI
PENDERITA DAN SUMBER AIR MINUM KLB DIARE DI
BOGOR TAHUN 2009**



Oleh :

drh. Khariri, M.Biomed.

**PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
KEMENTERIAN KESEHATAN RI**

2012

ABSTRAK

Penyakit kolera masih menjadi masalah kesehatan yang cukup serius di Indonesia. Kolera adalah diare yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio cholerae* dengan gejala yang bervariasi dari diare yang ringan sampai berat yang ditandai dengan feses seperti air cucian beras. Bakteri *Vibrio cholerae* masuk ke dalam tubuh manusia melalui makanan dan minuman, biasanya masuk ke dalam tubuh melalui air minum, makanan laut, atau lainnya yang telah terkontaminasi oleh bakteri tersebut. Angka kejadian kasus kolera yang tinggi umumnya terjadi di negara-negara yang sedang berkembang karena belum baiknya higiene, sanitasi serta penyediaan air minum yang tidak memadai. *Vibrio cholerae* banyak ditemui di permukaan air yang terkontaminasi dengan tinja yang mengandung bakteri tersebut, sehingga lingkungan terutama air memegang peran utama dalam terjadinya wabah penularan di tempat kolera berjangkit sebagai endemik

Penelitian bertujuan untuk mengetahui karakteristik gen *ctx* isolat *Vibrio cholerae* dari penderita diare dan isolat lingkungan pada Kejadian Luar Biasa (KLB) diare Bogor tahun 2009. Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah semua isolat bakteri *Vibrio cholerae* yang diisolasi dari feses penderita diare dan lingkungan pada KLB Kabupaten Bogor tahun 2009 yang berjumlah 31 isolat. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif laboratorium. Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan dari Januari sampai Mei 2012. Tahapan penelitian meliputi identifikasi serogroup dan serotipe bakteri *Vibrio cholerae*, ekstraksi DNA bakteri *Vibrio cholerae*, deteksi gen *ctx* *Vibrio cholerae* dengan metode PCR dan elektroforesis, serta karakterisasi gen *ctx* *Vibrio cholerae* dengan sekuensing. Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan metode deskriptif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua isolat *Vibrio cholerae* Kejadian Luar Biasa (KLB) Bogor tahun 2009 merupakan *Vibrio cholerae* serogroup O1 serotipe Ogawa dan mengandung gen *ctx*. Karakteristik gen *ctx* isolat *Vibrio cholerae* identik antar penderita diare. Hasil sekuensing *ctxA* dari seluruh isolat menunjukkan terdapat *single mutation* pada sampel dengan kode 2009.CS.09 yaitu pada posisi basa ke 608 yang mengalami perubahan basa Timin menjadi Adenin (608T>A). Hasil sekuensing *ctxB* dari seluruh isolat menunjukkan bahwa seluruh isolat mengalami mutasi substitusi pada basa 997 yang mengalami substitusi dari timidin menjadi sitosin (997T>C) dan pada basa 1085 yang mengalami substitusi dari timidin menjadi sitosin (1085T>C)

Kata Kunci : *Vibrio cholerae*, gen *ctx*, diare, lingkungan

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
SURAT KEPUTUSAN PENELITIAN	
PERSETUJUAN ETIK	
ABSTRAK.....	i
DAFTAR ISI.....	ii
DAFTAR GAMBAR.....	iv
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR LAMPIRAN.....	vi
DAFTAR SINGKATAN.....	vii
I. PENDAHULUAN.....	1
II. MANFAAT PENELITIAN.....	4
III. TUJUAN PENELITIAN.....	5
IV. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
4.1. <i>Vibrio cholerae</i>	5
4.1.1. Klasifikasi dan Karakteristik <i>Vibrio cholerae</i>	5
4.1.2. Patogenesis dan Faktor Virulensi <i>Vibrio cholerae</i>	9
4.1.3. <i>Cholera Toxin</i> (CT) dan <i>Toxin Co-regulated</i> <i>Pilus</i> (TCP).....	10
4.1.4. <i>Zonula Occludens Toxin</i> (ZOT).....	15
4.1.5. <i>Accessory Cholerae Enterotoxin (Ace)</i>	17
4.1.6 Toksin Lain pada <i>Vibrio cholerae</i>	18
4.2. Epidemiologi <i>Vibrio cholerae</i>	21
4.3. Diagnosis <i>Vibrio cholerae</i>	22
4.3.1. Diagnosis konvensional.....	22
4.3.2. Metode Pemeriksaan dengan PCR.....	22
V. METODOLOGI PENELITIAN.....	25
5.1. Kerangka Konsep Penelitian.....	25
5.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	25
5.3. Jenis Penelitian.....	25
5.4. Besar Sampel.....	26
5.5. Variabel Penelitian.....	27
5.6. Bahan dan Alat.....	26
5.6.1. Alat Penelitian.....	26
5.6.2. Bahan Penelitian.....	26
5.7. Prosedur Kerja.....	27
5.7.1. Isolasi dan Identifikasi <i>Vibrio cholerae</i>	27
5.7.2. Identifikasi Spesies <i>Vibrio cholerae</i>	28
5.7.3. Identifikasi Serotipe <i>Vibrio cholerae</i>	28
5.7.4. Ekstraksi DNA <i>Vibrio cholerae</i>	29
5.7.5. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	30
5.7.6. Elektroforesis.....	31
5.7.7. Purifikasi Produk PCR.....	31
5.7.8. Sekuensing.....	31

5.7.9. Analisis Hasil Sekuensing	32
VI.HASIL PENELITIAN	33
6.1. Kultur Ulang Isolat <i>Vibrio cholerae</i>	33
6.2. Identifikasi Sero group dan Serog tipe <i>Vibrio cholerae</i>	34
6.3. Deteksi Gen ctx	35
6.4. Sekuensing	36
6.5. Perbandingan Gen ctx antara Isolat yang Diuji dengan Referensi dari Genebank	40
VII.PEMBAHASAN	41
VI.KESIMPULAN DAN SARAN.....	46
8.1 Kesimpulan.....	46
8.2 Saran.....	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN	
PERSETUJUAN ATASAN YANG BERWENANG	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1.	CSN dan kejadian kolera di Indonesia	3
Gambar 4.1.	<i>Vibrio cholerae</i> dengan pewarnaan Gram	7
Gambar 4.2.	Koloni <i>Vibrio cholerae</i> pada medium TCBS	8
Gambar 4.3.	Skema mekanisme kerja toksin kolera (CT)	10
Gambar 4.4.	Struktur 3 dimensi molekul toksin kolera	12
Gambar 4.5.	Sel epitel intestinal yang menunjukkan <i>tight junction</i>	17
Gambar 5.1.	Kerangka Pikir Penelitian	25
Gambar 6.1.	Pertumbuhan isolat <i>Vibrio cholerae</i> pada medium TCBS	34
Gambar 6.2.	Hasil elektroforesis amplifikasi gen <i>ctxA</i> dengan gel agarosa 2%...	36
Gambar 6.3.	Hasil elektroforesis amplifikasi gen <i>ctxB</i> dengan gel agarosa 2%..	36
Gambar 6.4.	Pensejajaran nukleotida <i>ctxA</i> dari semua isolat sampel	37
Gambar 6.5.	Pensejajaran asam amino gen <i>ctx</i> sub unit A dari semua isolat sampel	38
Gambar 6.6.	Pensejajaran nukleotida <i>ctxA</i> dari semua isolat sampel	39
Gambar 6.7.	Pensejajaran asam amino gen <i>ctx</i> sub unit A dari semua isolate sampel	40
Gambar 6.8.	Pensejajaran asam amino <i>ctxB</i> dari semua isolat yang digunakan dalam penelitian dengan beberapa strain dari beberapa tempat ...	41

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.	Uji biokimia <i>Vibrio cholerae</i>	23
Tabel 5.1.	Uji antisera monovalen <i>Vibrio cholerae</i>	29
Tabel 5.2	Primer amplifikasi gen <i>ctx Vibrio cholerae</i>	30
Tabel 6.1.	Hasil Identifikasi Serogroup dan serotipe <i>Vibrio cholerae</i> O1	35

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Lokasi pengambilan sampel pada saat KLB diare di Bogor	52
Lampiran 2	Hasil isolasi <i>Vibrio cholerae</i> dari KLB diare di Bogor	53
Lampiran 3	Sumber asal sampel yang menghasilkan isolat <i>V. cholerae</i>	54

DAFTAR SINGKATAN

ACE	=	<i>accessory Cholera Enterotoxin</i>
ADP	=	<i>adenosine di phosphate</i>
AMP	=	<i>adenosine mono phosphate</i>
APW	=	<i>alkali peptone water</i>
ARFs	=	<i>ADP ribosylation factors</i>
ATP	=	<i>adenosin tri fosfat</i>
CAMP	=	<i>cyclic adenosine mono phosphate</i>
CEF	=	<i>cell elongation factor</i>
CHO	=	<i>chinese hamster ovary</i>
CT	=	<i>cholera Toxin</i>
KIA	=	<i>kliger iron agar</i>
KLB	=	<i>kejadian luar biasa</i>
LT	=	<i>heat-labile toxin</i>
MCA	=	<i>mac conkey agar</i>
MIO	=	<i>motility indol ornithine</i>
NCT	=	<i>new cholera toxin</i>
PBS	=	<i>phosphate buffer saline</i>
OD	=	<i>optical density</i>
PKC	=	<i>protein kinase C</i>
PPPL	=	<i>pengendalian penyakit dan penyehatan lingkungan</i>
RTX	=	<i>repeat in toxin</i>
SLT	=	<i>shiga like toxin</i>
TCBS	=	<i>thio sulphate citrate bile sucrose</i>
TCP	=	<i>toxin Co-regulated Pilus</i>
TDH	=	<i>thermostable direct hemolysin</i>
VCC	=	<i>vibrio cholerae cytotoxin</i>
VPI	=	<i>vibrio pathogenicity island</i>
WHO	=	<i>world health organization</i>
ZO	=	<i>zonula occludens</i>
ZOT	=	<i>zonula occludens toxin</i>

I. LATAR BELAKANG

Diare adalah buang air besar (defekasi) dengan feses berbentuk cair atau setengah padat karena adanya kandungan air pada feses yang lebih banyak dari biasanya. Menurut Badan Kesehatan Dunia (World Health Organization), diare adalah buang air besar encer dan cair dengan frekuensi lebih dari tiga kali dalam satu hari, sementara diare akut adalah diare yang terjadinya mendadak dan berlangsung singkat dalam beberapa jam. Diare akut karena infeksi dapat disebabkan oleh infeksi bakteri, parasit, dan virus, namun infeksi yang sering terjadi biasanya disebabkan oleh bakteri. Diare yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio cholerae* (disebut dengan kolera) merupakan salah satu penyakit yang disebabkan oleh enterotoksin yang dihasilkan *Vibrio cholerae* dan membentuk koloni di dalam usus kecil. Gejala-gejala yang ditimbulkan meliputi muntah, berak seperti air cucian beras dalam jumlah banyak yang mengakibatkan dehidrasi, kehilangan elektrolit dan naiknya keasaman darah. Pada kasus yang berat, penderita terus menerus buang air besar disertai muntah, sehingga penderita kehilangan cairan serta elektrolit dengan cepat dari saluran pencernaan. Hal ini menyebabkan renjatan keasaman metabolik dan apabila tidak diobati dapat menyebabkan kematian.^{1,2}

Vibrio cholerae merupakan bakteri gram negatif, berbentuk basil (batang) dan bersifat motil (dapat bergerak), memiliki struktur antogenik dari antigen flagelar H dan antigen somatik O, gamma-proteobacteria, mesofilik dan kemoorganotrof, berhabitat alami di lingkungan akuatik dan umumnya berasosiasi dengan eukariot. Suhu optimum untuk pertumbuhan *Vibrio cholerae* adalah pada suhu 18–37 ° C. Dapat tumbuh pada berbagai jenis media, termasuk media tertentu yang mengandung garam mineral dan asparagin sebagai sumber karbon dan nitrogen. *Vibrio cholera* tumbuh baik pada agar *thio sulfat citrate bile sucrose* (TCBS), yang menghasilkan koloni berwarna kuning.^{2,3}

Berdasarkan antigen O, *Vibrio cholerae* dibedakan atas *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio cholerae* non-O1 dan *Vibrio cholerae* O139. Hanya *Vibrio cholerae* O1 yang dianggap memproduksi enterotoksin yang menyebabkan kolera endemik

dan epidemik. Belakangan *Vibrio cholerae* O139 diketahui memproduksi enterotoksin dalam jumlah yang besar seperti pada *Vibrio cholerae* O1.^{7,8}

Vibrio cholerae O1 dibagi lagi menjadi 3 serotipe atau subtipe yakni :

- Serotipe Ogawa yang mempunyai antigen O faktor A dan B.
- Serotipe Inaba yang mempunyai antigen O faktor A dan C.
- Serotipe Hikojima yang mempunyai antigen O faktor A, B, C.

Sementara berdasarkan reaksi biologis *Vibrio cholerae* O1 dibedakan biotipe yang klasik dan El tor.^{3,8,12}

Bakteri *Vibrio cholerae* masuk ke dalam tubuh manusia melalui makanan dan minuman, biasanya masuk ke dalam tubuh melalui air minum, makanan laut, atau lainnya yang telah terkontaminasi oleh bakteri tersebut. *Vibrio cholerae* kemudian akan menghasilkan toksin yang menyebabkan usus halus melepaskan sejumlah besar cairan yang banyak mengandung garam dan mineral. Mekanisme patogen toksin *Vibrio cholerae* disebabkan karena meningkatnya sekresi enterotoksin yang merangsang kegiatan enzim adenil siklase di dalam sel-sel lendir usus. Hal ini mengakibatkan perubahan adenosin tri fosfat (ATP) menjadi adenosin mono fosfat siklik (cAMP) yang menyebabkan sekresi elektrolit ke dalam rongga usus sehingga berakibat pada kehilangan cairan dalam jumlah besar dan ketidakseimbangan elektrolit. Infeksi bakteri ini dapat mengakibatkan gastroenteritis yang ditandai dengan buang air besar berdarah disertai muntah berdarah, demam dan sakit kepala. Bila tidak segera mendapatkan pertolongan, hal ini dapat mengakibatkan kematian akibat dehidrasi dan kolaps sirkulasi.^{6,14}

Angka kejadian kasus kolera yang tinggi umumnya terjadi di negara-negara yang sedang berkembang dikarenakan karena belum baiknya higiene, sanitasi serta penyediaan air minum yang tidak memadai. *Vibrio cholerae* banyak ditemui di permukaan air yang terkontaminasi dengan tinja yang mengandung kuman tersebut, sehingga lingkungan terutama air memegang peran utama dalam terjadinya wabah penularan di tempat kolera berjangkit sebagai endemik.^{7,11}

Penyakit kolera dapat menjadi epidemi atau kejadian luar biasa yang menimpa masyarakat suatu daerah yang melebihi perkiraan. Kolera merupakan wabah penyakit yang telah membunuh jutaan manusia di dunia. Menurut Kementerian Kesehatan RI (2004), kejadian luar biasa (KLB) adalah timbulnya

atau meningkatnya kejadian kesakitan dan atau kematian yang bermakna secara epidemiologis pada suatu daerah dalam kurun waktu tertentu dan merupakan keadaan yang dapat menjurus pada terjadinya wabah.^{2,8,14}

Pada tahun 2003 Badan Kesehatan Dunia (WHO) menerima laporan 11.575 kasus kejadian kolera dari 45 negara dan 1.894 orang dilaporkan meninggal. Pada tahun 2008 Badan Kesehatan Dunia (WHO) menerima laporan 190.130 kasus kejadian kolera dengan jumlah korban meninggal sebanyak 5.143. Mayoritas kasus kolera tersebut terjadi di sebagian besar negara Afrika. Indonesia tercatat angka kejadian luar biasa kolera dari tahun 1993-1998 dan sebanyak 9% disebabkan oleh bakteri *Vibrio cholerae* O1. Dari 7 provinsi angka kejadian kolera yang tertinggi adalah daerah Bandung, Garut dan Timika. Sementara pada bulan Juni 2005 menurut Dirjen P2PL Kementerian Kesehatan terdapat KLB kolera di daerah Tangerang yang memakan korban 20 orang dari 362 kasus. Pada tahun 2008 KLB kolera terjadi di Papua Timika yang menewaskan hampir 108 orang antara bulan April sampai Agustus 2008 sedangkan pada tahun 2009 tercatat KLB kolera terjadi di Bogor.^{2,9,10}



Gambar 1.1. Peta penyebaran kolera di Indonesia.

Kejadian kolera di Indonesia yang masih cukup tinggi menjadi tantangan dan tugas penting untuk para pemerhati kesehatan dan juga masyarakat pada umumnya. Studi dan penelitian tentang kolera menjadi topik penting yang menarik untuk terus dikembangkan. Salah satu studi yang dilakukan adalah dengan menggali dan mempelajari lebih dalam tentang identifikasi gen penghasil

toksin *Vibrio cholerae* (ctx) yang merupakan faktor penting sebagai gen utama yang menyebabkan diare berat dalam kejadian kolera. Meskipun *Vibrio cholerae* memproduksi banyak toksin namun cholera toxin (ctx) merupakan toksin yang paling berperan dalam menimbulkan diare berat. Studi di Indonesia yang telah dilakukan sebelumnya masih terbatas pada deteksi gen ctx dan belum sampai karakterisasi gen ctx, untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih dalam tentang karakteristik gen ctx dari strain *Vibrio cholerae* yang ada di Indonesia. Studi semacam ini sangat berkaitan dengan epidemiologi penyakit kolera yang diharapkan dapat memberikan masukan dalam rangka pencegahan dan pengendalian penyakit kolera di Indonesia.²

Pada penelitian ini akan sulit ditelusuri asal sumber kontaminasi yang pertama kali, apakah kontaminasi dimulai dari lingkungan yang masuk ke orang yang sehat atau lingkungan yang terkontaminasi dari orang yang telah terinfeksi *Vibrio cholerae*.

II. MANFAAT PENELITIAN

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sebagai bahan pendidikan kepada masyarakat agar tidak mengonsumsi air minum, makanan laut, atau lainnya yang telah terkontaminasi oleh bakteri *Vibrio cholerae*;
2. Sebagai bahan pendidikan kepada masyarakat untuk lebih menjaga dan memelihara arti penting kesehatan lingkungan sehingga dapat mencegah lingkungan terkontaminasi oleh bakteri *Vibrio cholerae*;
3. Sebagai sumber informasi dalam perencanaan dan pengembangan program penanganan kesehatan lingkungan dalam rangka penanggulangan kasus diare yang disebabkan infeksi *Vibrio cholerae*;
4. Sebagai sumbangan bagi ilmu pengetahuan bahwa terdapat faktor resiko dari lingkungan yang dapat mempengaruhi kejadian infeksi *Vibrio cholerae*.

III. TUJUAN PENELITIAN

a. Tujuan Umum :

Mendapatkan karakteristik gen ctx isolat *Vibrio cholera* dari penderita diare dan lingkungan pada KLB Bogor tahun 2009.

b. Tujuan Khusus :

1. Mengidentifikasi serogroup isolat *Vibrio cholerae* dari penderita diare dan lingkungan pada KLB Bogor tahun 2009;
2. Mengidentifikasi serotipe isolat *Vibrio cholerae* dari penderita diare dan lingkungan pada KLB Bogor tahun 2009;
3. Mendeteksi gen ctx isolat *Vibrio cholerae* dari penderita diare dan lingkungan pada KLB Bogor tahun 2009;
4. Mengidentifikasi karakteristik gen ctx isolat *Vibrio cholerae* dari penderita diare dan lingkungan pada KLB Bogor tahun 2009;
5. Membandingkan karakteristik gen ctx antara isolat *Vibrio cholerae* dari penderita diare dan isolat lingkungan pada KLB Bogor.

IV. TINJAUAN PUSTAKA

4.1. *Vibrio cholerae*

4.1.1. Klasifikasi dan Karakteristik *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae adalah salah satu bakteri yang masuk dalam famili *Vibrionaceae* dan merupakan bagian dari genus *Vibrio*. Bakteri *Vibrio cholerae* pertama kali ditemukan oleh Robert Koch pada tahun 1884. Bakteri ini merupakan jenis bakteri yang sangat penting dalam dunia kedokteran karena dapat menyebabkan diare berat yang disebut kolera. Bakteri *Vibrio cholerae* banyak ditemui pada permukaan air yang terkontaminasi feses yang mengandung bakteri tersebut, sehingga penularan penyakit kolera dapat melalui air, makanan dan sanitasi yang buruk.^{7,8}

Terdapat lebih dari delapan spesies *Vibrio* yang patogen terhadap manusia diantaranya adalah spesies *Vibrio cholerae* dan *Vibrio parahaemolyticus*. Berikut ini adalah beberapa spesies *Vibrio* yang penting dalam dunia kedokteran antara lain:⁸

- *Vibrio cholerae* serogroup O1 dan O139 yang merupakan bakteri yang menyebabkan kolera epidemik dan pandemik, serta *Vibrio cholerae* serogroup non O1 dan non O139 yang menyebabkan diare yang mirip kolera, namun gejala yang ditimbulkan masih ringan dan jarang ditemui infeksi ekstraintestinal.
- *Vibrio parahaemolyticus* yang menyebabkan gastrointestinal dan kemungkinan dapat menimbulkan infeksi ekstraintestinal.
- *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio hollicae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio damsela*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio metschnikovii* yang merupakan penyebab infeksi pada telinga, luka, jaringan lunak dan infeksi ekstraintestinal namun jarang terjadi.

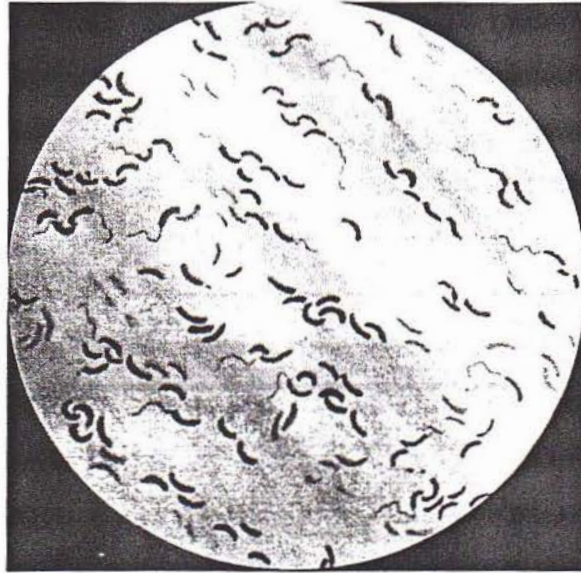
Vibrio cholerae merupakan bakteri Gram negatif dengan bentuk batang bengkok seperti koma yang berukuran $0,5 \mu\text{m} \times 1,5 - 3,0 \mu\text{m}$, tidak berspora, hidup secara aerob atau anaerob fakultatif, bergerak dengan flagel yang monotrik. *Vibrio cholerae* berhabitat alami di lingkungan akuatik dan umumnya berasosiasi dengan eukariot. *Vibrio cholerae* pada biakan tua dapat menjadi berbentuk batang lurus (gambar 2.1).^{7,8}

Klasifikasi dari *Vibrio cholerae* adalah sebagai berikut:⁹

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gamma Proteobacteria
Order	: Vibrionales
Family	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Vibrio</i>
Species	: <i>Vibrio cholerae</i>

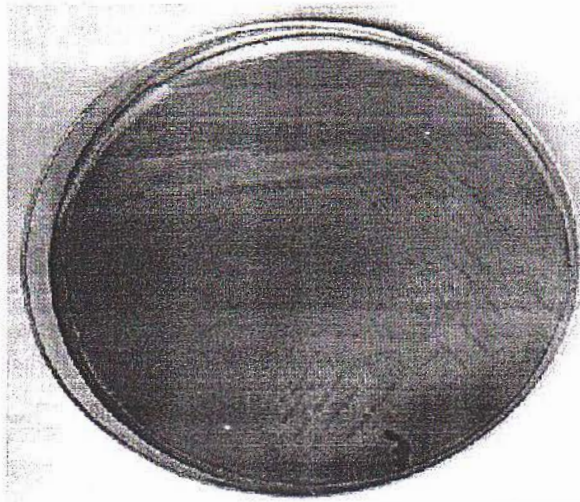
Suhu optimum untuk pertumbuhan *Vibrio cholerae* adalah pada suhu 37°C. Bakteri ini dapat tumbuh pada berbagai jenis medium, termasuk medium yang mengandung garam mineral dan asparagin sebagai sumber karbon dan

nitrogen. *Vibrio cholerae* tumbuh baik pada medium selektif agar *thiosulphate citrate bile sucrose* (TCBS), dan menghasilkan koloni berwarna kuning karena kemampuannya meragi sukrosa (gambar 2.2).^{7,8}



Gambar 4.1. *Vibrio cholerae* dengan pewarnaan gram¹⁶

Salah satu ciri khas dari *Vibrio cholerae* adalah kemampuannya tumbuh pada pH yang sangat tinggi (8.5 – 9.5) dan akan cepat mati dalam keadaan asam. *Vibrio cholerae* mampu meragi sukrosa dan manosa tanpa menghasilkan gas tetapi tidak meragi arabinosa. Bakteri ini juga dapat merubah nitarat menjadi nitrit. Ciri khas lain yang membedakan *Vibrio cholerae* dari bakteri enterik gram negatif lainnya yang tumbuh pada agar darah adalah pada hasil uji oksidasi yang positif. Biakan *Vibrio cholerae* dalam medium pengayaan air pepton alkali (APW) pada suhu ruang selama 6 jam akan tampak pertumbuhan bakteri pada lapisan permukaan medium. Medium air pepton alkali ini berfungsi sebagai medium transport yang penting untuk spesimen feses atau usapan dubur dari tersangka kasus kolera.⁷



Gambar 4.2. Koloni *Vibrio cholerae* pada medium TCBS (sumber foto Khariri)

Semua *Vibrio cholerae* mempunyai antigen flagel H yang sama. Antigen flagel H ini bersifat tahan panas. Antibodi terhadap antigen flagel H tidak bersifat protektif dan pada uji aglutinasi berbentuk awan. Antigen somatik O merupakan antigen yang penting dalam pembagian group secara serologi pada *Vibrio cholerae*. Antigen somatik O ini terdiri dari lipoposakarida. Pada reaksi aglutinasi akan berbentuk seperti pasir. Antibodi terhadap antigen O dapat bersifat protektif.

Pembagian *Vibrio cholerae* berdasarkan antigen O (serogroup) adalah sebagai berikut ^{7,11}

a. *Vibrio cholerae* O1

1. Biotipe : - El Tor
- Klasik

2. Serotipe : - ●gawa: mempunyai antigen O faktor A dan B
- Inaba: mempunyai antigen O faktor A dan C
- Hikojima: mempunyai antigen O faktor A, B, C

b. *Vibrio cholerae* non-O1

c. *Vibrio cholerae* O139

Pembagian biotipe secara epidemiologis sangat penting karena dapat digunakan untuk menentukan sumber infeksi atau sumber KLB. Biotipe El Tor merupakan biotipe yang dominan dan dijumpai di banyak negara, sedangkan

biotipe klasik banyak di Bangladesh, Pakistan dan India. Di Indonesia, biotipe klasik belum pernah dijumpai sepanjang sejarah kolera yang telah terjadi, yang ada di Indonesia hanya biotipe El Tor. Namun demikian, studi epidemiologi biotipe lebih lanjut sebaiknya dilakukan untuk mengetahui adanya biotipe lainnya di Indonesia.⁷

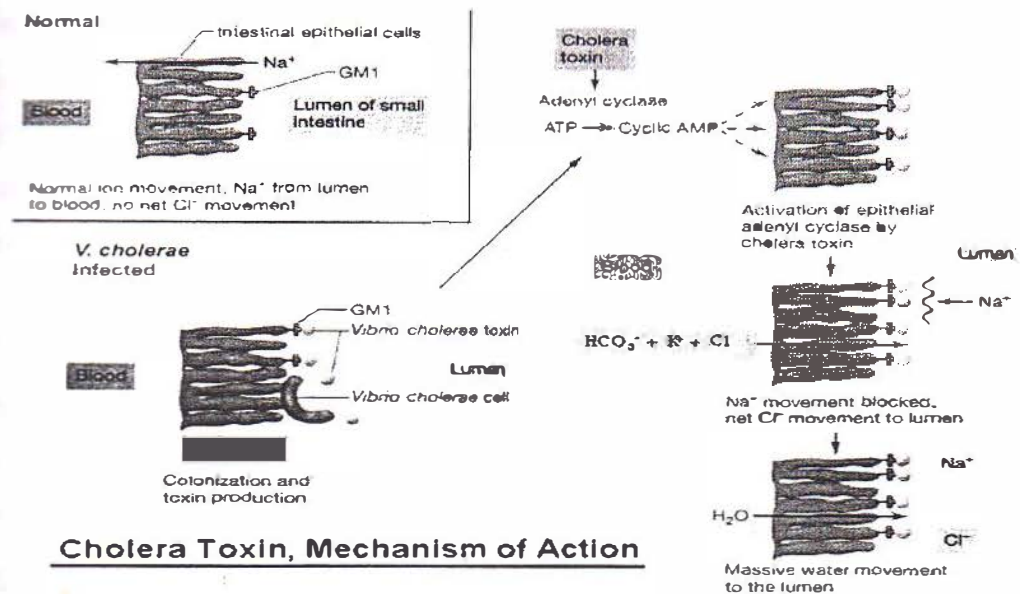
4.1.2. Patogenesis dan Faktor Virulensi *Vibrio cholerae*

Virulensi adalah ukuran patogenitas organisme. Tingkat virulensi berbanding lurus dengan kemampuan organisme menyebabkan penyakit. Tingkat virulensi dipengaruhi oleh jumlah bakteri, jalur masuk ke dalam tubuh inang, mekanisme pertahanan inang, dan faktor virulensi bakteri. Secara eksperimental virulensi diukur dengan menentukan jumlah bakteri yang menyebabkan kematian, sakit, atau lesi dalam waktu yang ditentukan setelah introduksi.⁸

Pada keadaan normal, bakteri *Vibrio cholerae* hanya patogen terhadap manusia. Seseorang dengan keasaman lambung yang normal memerlukan dosis infeksi sebanyak 10^{10} atau lebih sel bakteri *Vibrio cholerae* dalam cairan agar dapat terjadi infeksi, hal ini dikarenakan bakteri ini sangat sensitif terhadap suasana lambung yang asam. Jika bakteri masuk ke dalam tubuh bersama makanan maka dosis infeksi *Vibrio cholerae* menjadi 10^2 – 10^4 sel karena makanan dapat menetralkan keasaman lambung. Pada proses pengobatan atau keadaan lain yang dapat menurunkan keasaman lambung membuat seseorang lebih sensitif terhadap infeksi *Vibrio cholerae*. Patogenesis *Vibrio cholerae* ditentukan oleh kombinasi dari beberapa gen virulensi. Pada *Vibrio cholerae* terdapat enam kelompok gen virulensi yaitu faktor regulator *toxR*, cholera toxin enzymatic subunit A (gen *ctxA*), toxin coregulated pilus (*tcpA*), outer membrane protein (*ompU*), accessory cholera toxin (*ace*), dan zonula occludens toxin (*zot*).^{9,11}

Mekanisme patogen *Vibrio cholerae* disebabkan karena meningkatnya sekresi enterotoksin yang merangsang kegiatan enzim adenil siklase di dalam sel-sel lendir usus. Hal ini mengakibatkan perubahan Adenosin Tri Pospat (ATP) menjadi adenosin mono pospat siklik (cAMP) yang menyebabkan sekresi elektrolit kedalam rongga usus sehingga berakibat pada kehilangan cairan dalam jumlah besar dan ketidak seimbangan elektrolit. Infeksi bakteri ini dapat

mengakibatkan gastroenteritis yang ditandai dengan buang air besar berdarah disertai muntah berdarah, demam dan sakit kepala. Bila tidak segera mendapatkan pertolongan, dapat mengakibatkan kematian akibat dehidrasi dan kolaps sirkulasi (gambar 2.3).^{9,11}



Gambar 4.3. Skema mekanisme kerja toksin kolera dalam menyebabkan diare¹³

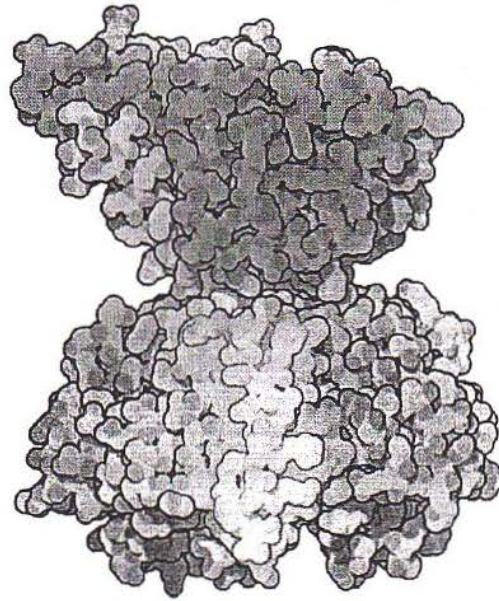
Pada awalnya dari beberapa kejadian pandemi kolera yang terjadi di dunia hanya *Vibrio cholerae* O1 yang dianggap memproduksi enterotoksin yang menyebabkan kolera endemik dan epidemik. Namun pada pandemi ketujuh berhasil diidentifikasi bahwa terdapat serogroup lain *Vibrio cholerae* yang juga memproduksi enterotoksin dalam jumlah yang besar seperti pada *Vibrio cholerae* O1, serogroup tersebut adalah serogroup O139.¹²

4.1.3. Cholera Toxin (CT) dan Toxin Co-regulated Pilus (TCP)

Toksin *Vibrio cholerae* merupakan faktor virulensi pada kejadian kolera, penyakit diare parah yang bertanggung jawab terhadap morbiditas dan mortalitas yang signifikan di seluruh dunia. Dua determinan, cholera enterotoksin (CT) dan toxin coregulated pilus (TCP) merupakan faktor penting yang bertanggung jawab terhadap virulensi *Vibrio cholerae*. *Vibrio cholerae* tidak bersifat invasif, bakteri ini tidak masuk ke dalam aliran darah tetapi tetap berada di saluran usus. Pada

saat terjadi infeksi *Vibrio cholerae* melalui makanan dan minuman terkontaminasi yang tertelan, maka setelah melewati pertahanan asam lambung *Vibrio cholerae* menghasilkan dua faktor virulensi yang menyebabkan kolera yakni *toxin co-regulated pilus* (TCP) yang berperan dalam proses kolonisasi pada intestinal dan *cholera toxin* (CT) yang menyebabkan seseorang mendapatkan gejala yang khas pada diare kolera. Genom *Vibrio cholerae* mempunyai dua kromosom yakni kromosom I berukuran 3 Mb dan kromosom II berukuran 1 Mb. Pada kromosom I terdapat faktor virulen yang terkenal yakni CT dan TCP. CT dikode oleh gen α AB, sementara TCP terletak pada daerah yang disebut *Vibrio pathogenicity island* (VPI).^{11,12}

Toksin kolera terdiri dari dua sub unit yaitu sub unit A dan sub unit B. Toksin kolera sub unit A mengandung 1 sub unit A (*active*) dan sub unit B mengandung 5 sub unit B (*binding*). Sub unit A mempunyai 2 komponen yakni A1 dan A2 (gambar 2.4). Toksin berikatan pada reseptor gangliosida permukaan sel inang melalui 5 sub unit B selanjutnya terjadi perubahan konformasi holotoxin, yang memungkinkan presentasi sub unit A pada permukaan sel. Setelah toksin berikatan dengan reseptor kemudian sub unit A masuk ke dalam sel ikatan disulfida dari sub unit A berkurang dan kemudian membebaskan komponen A1 dan A2. Komponen A1 bertugas meningkatkan aktivitas adenil siklase mengakibatkan perubahan Adenosin Tri Pospat (ATP) menjadi adenosin mono pospat siklik (cAMP). Produksi cyclic AMP yang meningkat akan mengakibatkan terhambatnya absorpsi NaCl dan merangsang ekskresi klorida yang menyebabkan hilangnya cairan, NaCl, kalium dan bikarbonat.⁹



Gambar 4.4. Struktur 3 dimensi molekul toksin kolera (merah: sub unit A1, kuning: sub unit A2, biru: sub unit B)^{1,4}

Bakteri *Vibrio cholerae* mengeluarkan toksin kolera (CT) dan berikatan dengan reseptor pada gangliosida GM1 yang mengandung galactose, *N-acetylgalactosamine*, glucose, dan *N-acetylneuraminic acid*. Interaksi ikatan antara toksin kolera dengan reseptor diperantarai oleh sub unit B. Ikatan antara toksin kolera dan reseptor akan meningkat dengan adanya neuraminidase yang diproduksi oleh *Vibrio cholerae*. Target intraseluler toksin kolera adalah enzim adenil siklase yang berada pada membran basolateral sel epitel intestinal. Setelah toksin kolera berikatan dengan sel, maka ada waktu sekitar 15–60 menit sebelum adenil siklase diaktifkan. Hal ini terjadi untuk memberi kesempatan peptida A1 untuk dapat bertranslokasi melalui membran sel dan melakukan kontak dengan protein G. Sub unit A masuk ke dalam sel secara endositosis. Peptida A1 diaktifkan oleh *ADP ribosylation factors* (ARFs) dan menyebabkan transfer ADP ribosa dari NAD ke sub unit protein G. Protein G akan menyebabkan aktifitas adenil siklase dan meningkatkan siklik AMP dari ATP. Peningkatan produksi siklik AMP akan menghambat absorpsi NaCl dan merangsang ekskresi klorida, yang menyebabkan hilangnya cairan, NaCl, Kalium dan Bikarbonat.^{9,11}

Toksin kolera sub unit B monomer berbentuk kecil, kompak, dan merupakan sub unit yang sangat terstruktur. Toksin kolera sub unit B pentamer stabilkan dengan berbagai interaksi, diantaranya ikatan hidrogen diantara sub

unit B yang merupakan hal yang penting. Jumlah ikatan hidrogen antara sub unit B tunggal dan molekul tetangganya adalah 30 pada CT atau 26 pada LT. Setiap sub unit membentuk tujuh jembatan garam pada CT atau empat jembatan garam pada LT dengan tetangga masing-masing, sehingga total lebih dari 20 jembatan garam antar-sub unit pada pentamer, dengan sepuluh terlokalisasi dalam pusat pori. Choleraenoid atau CTB pentamer lebih stabil dengan interdigitasi yang ketat kelompok hidrofobik pada interfase sub unit.¹⁵

Permukaan bagian dalam pada cincin sub unit B merupakan bagian yang hidrofobik, dengan jumlah total tidak kurang dari 25 positif dan 15 negatif yang melapisi dinding pusat. Monomer termasuk dalam bentuk pentamer untai enam antiparalel untai β dengan helai dari sub unit berikutnya, menghasilkan penampilan cincin dengan permukaan luar yang halus. Pentamer memiliki diameter keseluruhan sekitar 64 Å dan tinggi 40 Å. Pada semua toksin dari kelompok AB5 terdapat pusat pori atau saluran sepanjang lima kali lipat dari sumbu perakitan B5. Batas-batas pori berbentuk kerucut yang dibentuk panjang, dikemas secara erat, paralel α heliks.¹⁵

Enzimatik fragmen A1 terdiri dari satu domain dengan bentuk baji, dibentuk oleh banyak elemen tetapi tidak terlalu teratur elemen struktur sekundernya dan terdiri dari 192 asam amino. Fragmen ini diorganisasi dalam tiga struktur berbeda. Pertama 132 asam amino membentuk unit globuler kompak yang terdiri dari campuran α heliks dan helai β (A1). Struktur (A1)₂ (residu 133-161) membentuk sebuah jembatan panjang antara domain kompak (A1)₁ dan (A1)₃. Struktur (A1)₂ bertindak sebagai tambahan molekul seperti A2. Mata rantai (A1)₂ meluas sebesar 23 Å dari permukaan distal bebas (A1)₁ dekat situs katalitik interfase (A1)₁/A2. Rantai (A1)₂ distal cukup fleksibel dan menjadi semakin teratur saat mendekati situs nick yang terletak sepanjang tepi. Struktur globular ketiga (A1)₃ dibentuk dari residu 31 C-terminal yang mengelilingi jembatan disulfida dan menghubungkan fragmen A1 dan A2. Potongan ini terletak jauh dari A1/A2 dan interface A/B dan mungkin sebagai tempat berikatan NAD dan substrat. Hal ini memungkinkan rantai A1 untuk bertindak baik sebagai ADP-ribosyltransferase dan NAD-glycohydrolase.^{9,13}

Toksin kolera rantai A2 terdiri dari α heliks yang saling berdekatan. Sebaliknya, rantai A2 LT dibagi menjadi tiga segmen, sebuah amino-terminal helix panjang (residu 197-224), panjang rantai diperpanjang melalui pori dari sub unit B pentamer (residu 225-231), dan C-terminal heliks kecil (Residu 232-236). Urutan dari empat residu terakhir dari rantai A2 pada CT (KDEL) dan pada LT (RDEL) meniru sinyal retensi endoplasma. Residu KDEL berada di luar pembukaan sentral pori dengan sedikit atau tanpa stabilisasi dengan sub unit B. Meskipun tetrapeptida ini terlihat jelas dalam peta kepadatan elektron CT, residu yang sesuai secara acak dalam struktur kristal LT. Delesi terminal residu keempat memiliki pengaruh yang kecil pada oligomerisasi sub unit B tetapi secara signifikan mengurangi stabilitas holotoxin.⁹

Toksin kolera Rantai A2, bagaimanapun, berbagi sebuah interfase yang luas dengan rantai A1 dan sub unit B pentamer. Rantai A2 juga berinteraksi dengan erat dengan kelima sub unit B. Sub unit A2 melewati pori sentral dari B pentamer baik sebagai terusan helix (CT) atau sebagai rantai yang diperpanjang dan berakhir di C-terminal dengan helix yang pendek (LT). Diameter pori cukup lebar untuk menampung rantai A2 sebagai heliks. Kestabilan kontak dalam pori antara rantai A2 dan Sub unit B sangat hidrofobik, dengan sangat sedikit ikatan hidrogen spesifik.¹⁶

Reseptor toksin pertama kali diidentifikasi oleh King dan Van Heyningen (1973), yang mengamati bahwa ganglioside GM1 mencegah CT terhadap peningkatan permeabilitas pada kapiler kulit kelinci (membirukan kulit pada saat pengujian). mencegah CT menginduksi akumulasi cairan di ileal loop usus kelinci, dan menghambat aksi CT pada sistem adenilat siklase dalam usus halus pada kelinci percobaan. CT dan LT berikatan dengan ganglioside GM1. CT tidak berikatan dengan ganglioside lainnya yang terkait, seperti GM2, GM3, dan lainnya, sedangkan LT dapat berinteraksi dengan reseptor kelas kedua yang tidak dikenali oleh CT. Pengenalan spesifik pada GM1 pada CT, sel tidak memperlihatkan sakarida GM1 yang tidak terikat toksin, dan sebaliknya penambahan endogen GM1 memungkinkan imun sel sebelumnya yang akan diserang. Lima molekul GM1 pada permukaan membran terikat oleh lima situs ikatan yang identik pada toksin B pentamer.^{9,13}

Bagian dari sakarida GM1 berikatan dengan AB5 heksamer lengkap dan juga dengan B pentamer tetapi tidak dengan sub unit B monomer. Ada lima situs ikatan toksin, dan ikatan GM1 ke lima situs dikenal sangat kooperasi. Neuraminidase yang dihasilkan oleh *Vibrio cholerae* dapat meningkatkan jumlah reseptor dengan bertindak sebagai gangliosida pada tingkat tinggi untuk mengkonversikannya ke GM1.¹⁷

Interaksi LT atau CT sub unit B pentamer dengan GM1 menyebabkan berubah biru sekitar 12 nm pada emisi fluoresensi maksimum tryptophan. Karena hanya ada satu residu triptofan (Trp-88) di setiap B monomer, keterlibatannya dalam reseptor ikatan jelas ditunjukkan. Pembentukan formasi kompleks antara CT dan GM1 menghasilkan energi transfer antara bagian residu indol triptofan dan turunan dansil dari GM1, menunjukkan bahwa residu dalam atau dekat situs reseptor ikatan. CT dan LT mengikat secara khusus bagian oligosakarida dari ganglioside GM1, komponen normal dari luar membran sel. Toksn AB5 lain mengenali Gangliosida lain.⁹

4.1.4. Zonula Occludens Toxin (zot)

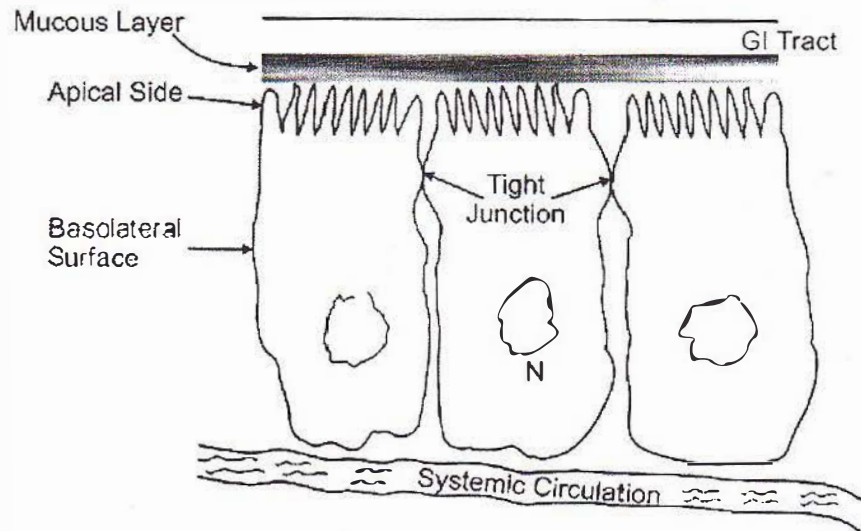
Zot merupakan salah satu toksin lain yang diproduksi *Vibrio cholerae* yang menyebabkan sekresi cairan ke dalam lumen usus. Produksi toksin tersebut dikode oleh gen *zot* yang terletak pada kromosom 1. Intestinal Zonula occludens (ZO) merupakan *junction* antar sel yang dibatasi oleh dua membran plasma dan berada pada permukaan apikal sel epitel. Pada keadaan normal intestinal ZO mempunyai aktifitas untuk membatasi dan mencegah difusi molekul larut air melalui ruang interseluler kembali ke dalam lumen. Pada keadaan terjadinya infeksi *Vibrio cholerae*, toksin zot menyebabkan mukosa usus menjadi lebih permeabel sehingga air serta elektrolit masuk ke dalam lumen karena tekanan hidrostatik dan menyebabkan diare.¹⁹

Zot yang merupakan toksin *Vibrio cholerae* akan berinteraksi dengan reseptor yang terdapat pada permukaan intestinal. Toksin ini akan mengarahkan pembukaan *tight junction intestinal*. Kemudian akan mengaktivasi fosfolipase C dan menghidrolisis fosfatidil inositol untuk melepaskan 1,4,5 trifosfat inositol dan diasilgliserol. Protein kinase C (PKC) α dependent kemudian diaktifkan dan

terjadi proses kaskade yang menyebabkan pelebaran *tight junction intestinal* dan berakibat pada keluarnya cairan ke lumen.¹⁸

Epitel usus merupakan interfase terbesar antara lingkungan eksternal dan lingkungan internal host, dan merupakan barier utama dimana molekul dapat dengan baik diserap atau dilepaskan. Saat ini sudah terbukti bahwa zonula occludens memainkan peran utama dalam mengatur permeabilitas epitel dengan mempengaruhi aliran cairan paraseluler dan zat terlarut. *Zonula occludens* (ZO) merupakan antar persimpangan khusus di mana dua membran plasma dipisahkan 1-2 nm, yang ditemukan dekat permukaan apikal sel dalam epitel sederhana, dan membentuk gasket di sekitar sel. Persimpangan terdiri dari percabangan jaringan penyegel, masing-masing untai bertindak secara independen satu dengan yang lain. Oleh karena itu, efisiensi persimpangan mencegah bagian ion meningkat secara eksponensial dengan jumlah untai. Setiap untai terbentuk dari deretan protein transmembran yang melekat pada kedua membran plasma, dengan domain ekstraseluler bergabung satu sama lain secara langsung. Meskipun lebih banyak protein, jenis utama adalah claudin dan occludin.¹⁹

Tight junction bergabung dengan cytoskeleton sel yang berdekatan secara bersama-sama yang akan mencegah fluida bergerak melalui celah-celah antar sel dan difusi lateral membran protein intrinsik antara domain apikal dan basolateral dari membran plasma (gambar 2.5). *Zonula occludens* bertindak untuk: (i) menjaga sel bersama-sama, (ii) memblokir pergerakan protein membran antara permukaan apikal dan basolateral dari sel, yang memungkinkan fungsi-fungsi khusus dari setiap permukaan, dan (iii) mencegah bagian molekul dan ion melalui ruang antar sel. Oleh karena itu, bahan harus benar-benar masuk ke dalam sel (dengan difusi atau transpor aktif) untuk lolos melalui jaringan. *Zonula occludens* membatasi atau mencegah difusi molekul larut dalam air melalui ruang antar sel (jalur paraselular) kembali ke lumen. Difusi didorong oleh konsentrasi gradien yang dibuat dengan proses transpor aktif transepitelial. Pada beberapa tahun terakhir, banyak hal yang telah ditemukan mengenai struktur, fungsi, dan regulasi dari *tight junction*. Namun mekanisme yang tepat melalui bagian mana untuk mereka beroperasi masih tidak lengkap dipahami.^{20,21}



Gambar 4.5. Sel epitel intestinal yang menunjukkan *tight junction*¹⁹

4.1.5. Accessory Cholera Enterotoxin (Ace)

Accessory cholera enterotoxin (Ace) merupakan toksin yang berpotensi menyebabkan diare kolera dengan cara meningkatkan transpor membran ion transeluler. Pada penelitian dengan menggunakan model sel T84, toksin Ace dapat meningkatkan perbedaan potensial yang berakibat sekresi cairan. Melalui sinyal *second messenger* Ca^{2+} terhadap sel epitel mukosa usus ini akan terjadi mekanisme sekresi bikarbonat dan klorida ke dalam lumen usus.²²

Ace telah diidentifikasi oleh Trucksis dkk. (1993) sebagai enterotoksin potensial ketiga pada *Vibrio cholerae*. Ekstrak toksin pada hewan percobaan menunjukkan bahwa Ace meningkatkan transportasi ion transelular, yang memungkinkan untuk berkontribusi diare pada kolera. Ace meningkatkan hubungan arus pendek (Isc) pada jaringan ileum kelinci dalam chamber dan dalam model sel epitel usus, dan hal itu menyebabkan sekresi cairan pada ileal loop kelinci. Seperti halnya CT namun berbeda dengan Zot, Ace meningkatkan beda potensial daripada konduktivitas jaringan.²²

Mekanisme kerja Ace telah digambarkan oleh Trucksis dkk. (2000) dalam sel T84, sel tumor kolon manusia yang menyerupai morfologis sel crypt dan memelihara transportasi elektrolit. *Cell line* ini mensekresi Cl^- dalam merespon sekretagog, efek yang dimediasi melalui mekanisme cAMP, cGMP, atau Ca^{+2} . Mekanisme sekresi oleh Ace melibatkan Ca^{2+} sebagai *messeger* kedua, dan toksin

ini menstimulasi novel Ca^{2+} -dependent secara sinergi. Peran Ace dalam patogenesis kolera belum ditentukan dengan menggunakan mutan isogenik pada manusia. Telah dikemukakan bahwa Ace dapat berkontribusi pada fase awal dari sekresi usus pada infeksi *Vibrio cholerae* sebelum timbulnya sekresi yang dirangsang oleh aksi yang lebih lambat toksin kolera.²³

4.1.6. Toksin Lain pada *Vibrio cholerae*

Selain toksin diatas, *Vibrio cholerae* juga memproduksi beberapa toksin lain yang tidak mempunyai peran besar dalam kejadian diare kolera. Beberapa toksin tersebut antara lain hemolysin / cytolysin, RTX toxin, Chinese hamster ovary (CHO) cell elongation factor (Cef), New cholera toxin (NCT), Shiga-like toxin (SLT). Thermostable direct hemolysin (TDH), Heat-stable enterotoxin of nonagglutinable vibrios (NAG-ST), dan toxin WO-7.¹²

Hemolisin merupakan eksotoksin yang dapat merusak membran sel darah merah yang disekresikan oleh *Vibrio* yang patogen. Produksi *cytolysin* atau *haemolysin* (VCC) dikode oleh gen *hlyA*, yang merupakan elemen genetik yang *conserved* pada bakteri *Vibrio cholerae*. Pembagian *Vibrio cholerae* menjadi biotipe klasik dan El Tor didasarkan pada uji hemolisis menggunakan darah domba. VCC diduga dapat menyebabkan gastroenteritis pada manusia walaupun hal tersebut masih diperdebatkan. Pada percobaan menggunakan kelinci, efek toksin *Vibrio cholerae* menyebabkan hemolisis dengan cara membentuk lubang pori-pori pada eritrosit kelinci. Sementara dengan menggunakan sel intestinal manusia pada kultur jaringan menyebabkan efek sitolisis. Hal ini berakibat pada pengeluaran klorida dari mukosa kolon manusia.²⁴

Toksin RTX adalah famili bakteri yang mensekresi sitotoksin yang diproduksi oleh beragam kelompok patogen Gram negatif. Toksin ini mempunyai beberapa fitur umum seperti organisasi gen umum, maturasi pasca-translasi, dan ekspor keluar dari sel bakteri melalui sistem sekresi tipe I (T1SS). Toksin RTX ini umumnya terbagi dalam dua kategori yaitu hemolysin yang mempengaruhi berbagai jenis sel dan leukotoksin dengan jenis sel dan spesies tertentu. Contohnya termasuk *E. coli* alpha-hemolysin (HlyA), *Bordetella pertussis*

adenylat cyclase hemolysin toxin, *Actinobacillus actinomycescomitans* leukotoxin (LtxA), dan *Pasteurella haemolytica* leukotoxin (LktA).^{25,26}

Studi klinis dengan strain vaksin konsisten melaporkan tingkat residu diare dan aktivitas reaktogenik. Pencarian keberadaan toksin lainnya menyebabkan penemuan toksin seperti Zot dan Ace. Namun, *Vibrio cholerae* galur CVD110 tanpa gen *ctx*, *zot*, *ace* dan *hlyA* masih menyebabkan diare ringan, hal ini menunjukkan masih terdapat toksin tambahan. Aktivitas sekresi enterotoksin sering dicirikan dalam sistem model seperti pada sel *Chinese Hamster Ovary* (CHO) assay atau melalui akumulasi cairan dalam percobaan tikus. Morfologi pemeriksaan sel CHO dilakukan dalam kultur jaringan dengan mikroskop cahaya menunjukkan pemanjangan sel CHO dengan adanya faktor virulensi dari beberapa bakteri patogen termasuk CT. Aktivitas sitotoksik diukur dalam satuan CHO. Satu unit CHO didefinisikan sebagai kebalikan dari pengenceran yang menyebabkan sel memanjang >50%. Aktivitas spesifik untuk CT adalah sekitar 1000×10^6 unit CHO per mg protein. Aktivitas elongasi sel CHO sebagian dimumkan dan ditemukan menyebabkan akumulasi cairan dalam model tikus, sehingga menunjukkan enterotoksik alam, dan itu disebut faktor elongasi CHO (CEF).³¹

Pada tahun 1983, dilaporkan dari India bahwa beberapa *Vibrio cholerae* O1 strain lingkungan nontoksinogenik yang gagal berhibridisasi dengan probe CT atau LT, dapat menyebabkan akumulasi cairan dalam ileal loop kelinci dan diare pada anak kelinci. Kultur filtrat dari strain ini mampu menyebabkan akumulasi cairan. Filtrat juga meningkatkan permeabilitas kapiler kulit kelinci, tetapi tidak menyebabkan warna biru keputihan atau nekrosis. Toksin dalam kultur filtrat tidak dapat dinetralkan pada kulit kelinci atau tes ileal loop dengan antiserum CT atau sub unit A dan B. Toksisitas untuk loop dan kulit akan hilang ketika kultur filtrat dipanaskan sampai 100°C selama 10 menit. Toksin ini ditetapkan sebagai toksin kolera yang baru dan dianggap menjadi penyebab diare pada strain *Vibrio cholerae* CT. Penelitian berikutnya pada *Vibrio cholerae* O1 biotipe klasik dan El Tor strain CT⁺ dan CT⁻ yang berasal dari spesimen klinis dan lingkungan mengungkapkan bahwa NCT dihasilkan oleh strain *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1 / non-O139.³²

Shiga-like Toxin (SLT) atau verotoxins, dinamai berdasarkan prototipe toksin yang dihasilkan jenis *Shigella dysenteriae* tipe 1, dan juga diproduksi oleh strain *E. coli* tertentu, sebagai penyebab diare berdarah dan diare tidak berdarah di seluruh dunia. SLT bersifat sitotoksik pada kultur sel jaringan tertentu, enterotoksik pada ileal loop kelinci, dan neurotoksik (menyebabkan kelumpuhan anggota badan dan kematian) pada kelinci dan tikus.³³

Thermostable Direct Hemolysin (TDH) adalah toksin putatif yang secara epidemiologis terkait dengan kasus gastroenteritis pada manusia yang disebabkan oleh *Vibrio parahaemolyticus*. Produksi TDH secara rutin diuji melalui hemolisis eritrosit tipe β yang dimasukkan ke dalam media khusus yang disebut agar Wagatsum. Reaksi hemolitik dikenal sebagai fenomena Kanagawa. Hemolisin ini diberi nama *Thermostable Direct Hemolysin* (TDH), karena toksin stabil pada pemanasan (100°C, 10 menit), dan aktivitas hemolitik tidak meningkat pada penambahan lesitin, menunjukkan aktivitas secara langsung terhadap eritrosit. Aktivitas biologis TDH mencakup hemolisis pada eritrosit berbagai spesies, sitotoksitas, toksisitas letal terhadap hewan percobaan kecil, dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah pada kulit kelinci.³⁴ Keberadaan toksin TDH belum dilaporkan pada *Vibrio cholerae* O1, tetapi toksin ini ditemukan dalam plasmid seperti dalam lokasi kromosom pada beberapa *Vibrio cholerae* non-O1.³⁵

Beberapa strain *Vibrio cholerae* non-O1 ditemukan terkait dengan penyakit yang secara klinis tidak dapat dibedakan dari kolera, sementara beberapa strain lain menyebabkan demam dan diare berdarah. Sebagian besar strain *Vibrio cholerae* non-O1 tidak menghasilkan CT. Pertama kali dijelaskan tipe baru *heat-stable enterotoxin* (ST) pada *Vibrio cholerae* non-O1 yang menunjukkan 50% homologi urutan asam amino dengan enterotoksigenik ST dari ETEC *E. coli*. Seperti ST pada *E. coli*, NAG-ST *Vibrio cholerae* menyebabkan akumulasi cairan dengan cepat pada uji yang dilakukan dengan menggunakan hewan percobaan tikus. Terjadinya NAG-ST pada isolat non-O1 cukup rendah dan jarang ditemukan pada bakteri *Vibrio cholerae* O1.^{36,37}

Sebuah toksin ekstraseluler diidentifikasi pada suatu strain *Vibrio cholerae* El Tor Inaba yang diisolasi dari wabah kolera di Kota Warangal Andhra Pradesh India selatan. Jenis ini diasumsikan sebagai *Vibrio cholerae* W07, ditemukan

tanpa gen *ctx* *Vibrio cholerae*, ace atau zot sebagaimana ditentukan dengan studi hibridisasi, tetapi masih menyebabkan penyakit yang mirip kolera. Kultur supernatan strain ini menyebabkan akumulasi cairan pada uji ileal loop kelinci, perpanjangan dari sel *Chinese Hamster Ovary* (CHO) dan pembulatan sel Vero. Toksin ini merupakan antigen yang berbeda dari CT, Zot, Ace atau hemolisin, dan disebut toksin WO7 berdasarkan tata nama dari strain induk. Produksi maksimal WO7 diamati dalam medium AKI (1,5% Bacto Peptone, ekstrak yeast 0,4%, NaCl 0,5%, 0,3% filter-sterilized NaHCO₃ pada pH 7,4) disesuaikan dengan pH 8,5 dan 37°C.³⁸

Dibandingkan dengan CT, toksin WO7 empat kali lebih sedikit dalam menstimulasi terjadinya akumulasi cairan. Meskipun toksin WO7 mirip dengan CT pada beberapa sifatnya, antibodi poliklonal terhadap toksin WO7 tidak bereaksi silang dengan CT atau LT *E. coli* pada imunodifusi atau pada uji imunoblot. Toksin ini dianggap menginduksi apoptosis pada sel Hep-2 berdasarkan deteksi DNA nucleosomal dalam merespon WO7 dan adanya histon yang terkait fragmen DNA dalam sitosol dengan deteksi kematian sel ELISA. Toksin WO7 telah dilaporkan menyebabkan perubahan dalam transportasi usus pada tikus dengan mengubah tingkat Ca²⁺ intraseluler / ekstraseluler. Pada kolera yang menunjukkan gejala seperti yang berhubungan dengan *Vibrio Cholerae* WO7, toksin WO7 mungkin memainkan peran penting dalam mengubah tingkat mediator kunci pada jalur sinyal transduksi yang berbeda.³⁹

4.2. Epidemiologi *Vibrio cholerae*

Pertama kali kejadian penyakit kolera ditemukan di sekitar sungai Gangga dan Brahmaputra di India Timur dan Pakistan Timur. Pada tahun 1884 Robert Koch mengisolasi kuman tersebut yang disebut *Vibrio cholerae*. Kolera yang endemik di Asia dan yang merupakan pandemik besar pada abad ke 19 disebabkan oleh *Vibrio cholerae* klasik, serotipe Ogawa dan Inaba. Di Indonesia, tercatat pertama kali pada tahun 1937 muncul kolera di Sulawesi Selatan yang waktu itu dikenal dengan nama Celebes. Penyakit ini disebabkan oleh suatu biotipe *Vibrio cholerae* yang disebut El Tor, sesuai dengan nama tempat pertama

diidentifikasi kali di kampus karantina jemaah haji di dekat El Tor Semenanjung Sinai oleh Gotschlich pada tahun 1905.^{6,7}

Di dalam sejarah kolera terdapat tujuh pandemi yang melanda dunia. Organisme penyebab dari empat pandemi yang pertama belum dapat dikenali pada saat itu, tetapi dua pandemi yang berikutnya diketahui disebabkan oleh *Vibrio cholerae* O1 biotipe klasik. Pandemi ketujuh terjadi pada bulan Januari tahun 1961, berasal dari kota Makasar yang merupakan pandemi pertama yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae* O1 biotipe Eltor. Saat pandemi ketujuh ini meluas, *Vibrio cholerae* O1 biotipe Eltor menggeser biotipe klasik yang menjadi penyebab pandemi sebelumnya. Saat ini Eltor merupakan biotipe yang dominan dijumpai di seluruh dunia. Diperkirakan sekitar 5,5 juta kasus kolera terjadi setiap tahunnya di Asia dan Afrika, 8 % kasus cukup berat sehingga memerlukan perawatan rumah sakit dan 20 % kasus ini berakhir dengan kematian sehingga jumlah kematian berkisar 120,000 kasus per tahun.⁷

4.3. Diagnosis *Vibrio cholerae*

Diagnosis untuk identifikasi bakteri *Vibrio cholerae* dapat dilakukan dengan menggunakan metode kultur konvensional maupun dengan menggunakan teknik biomolekuler yang masing-masing mempunyai kelebihan dan kekurangan.

4.3.1. Diagnosis Konvensional

Diagnosis untuk menentukan *Vibrio cholerae* secara konvensional dapat dilakukan dengan kultur. Bahan pemeriksaan dapat diambil dari swab rektal, feses ataupun muntahan. Kultur *Vibrio cholerae* dapat dilakukan dengan dua cara yaitu secara langsung menanam bahan pemeriksaan ke medium selektif agar *thiosulfat citrate bile salts sucrose* (TCBS), dan secara tidak langsung yaitu bahan pemeriksaan ditanam terlebih dahulu di media perbenihan alkaline peptone water (APW) dan diinkubasi selama 18 – 20 jam pada suhu 37°C. Dari media perbenihan APW selanjutnya dapat dilakukan subkultur ke media TCBS.^{3,7}

Untuk identifikasi *Vibrio cholerae* dapat dilakukan dengan melakukan serangkaian uji biokimia seperti yang ada pada tabel 2.1. Uji kemudian

dilanjutkan dengan uji serologi untuk konfirmasi isolat yang diidentifikasi sebagai *Vibrio cholerae* dengan cara reaksi aglutinasi antigen somatik (antigen O).⁷

Tabel 4.1. Uji biokimia *Vibrio cholerae*

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	-

Kelebihan diagnosis konvensional dengan kultur adalah sensitivitasnya yang sangat tinggi (1-10 CFU/mL), dan metode ini merupakan baku emas dalam mendiagnosa diare yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae*. Sedangkan kekurangan metode ini adalah memerlukan waktu beberapa hari agar sampel sampai ke laboratorium dan identifikasinya memerlukan waktu 2-3 hari serta harus dilakukan oleh tenaga laboratorium yang terlatih dan umumnya pada kasus kejadian luar biasa kolera fasilitas mikrobiologi tidak tersedia.⁷

4.3.2. Metode Pemeriksaan dengan PCR (Polimerase Chain Reaction)

Reaksi berantai polimerase atau lebih umum dikenal sebagai PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan suatu teknik atau metode perbanyakan (replikasi) DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme. Dengan teknik ini akan dapat menghasilkan DNA dalam jumlah besar dalam waktu singkat sehingga memudahkan berbagai teknik lain yang menggunakan DNA. Metode PCR merupakan salah satu cara yang dapat digunakan untuk diagnosis cepat bakteri *Vibrio cholerae*. Adanya bakteri *Vibrio cholerae* dari sampel feses atau rectal swab dapat dideteksi dengan metode PCR ini. Metode ini dilakukan dengan menggunakan primer spesifik dari gen *Vibrio cholerae*.⁴¹

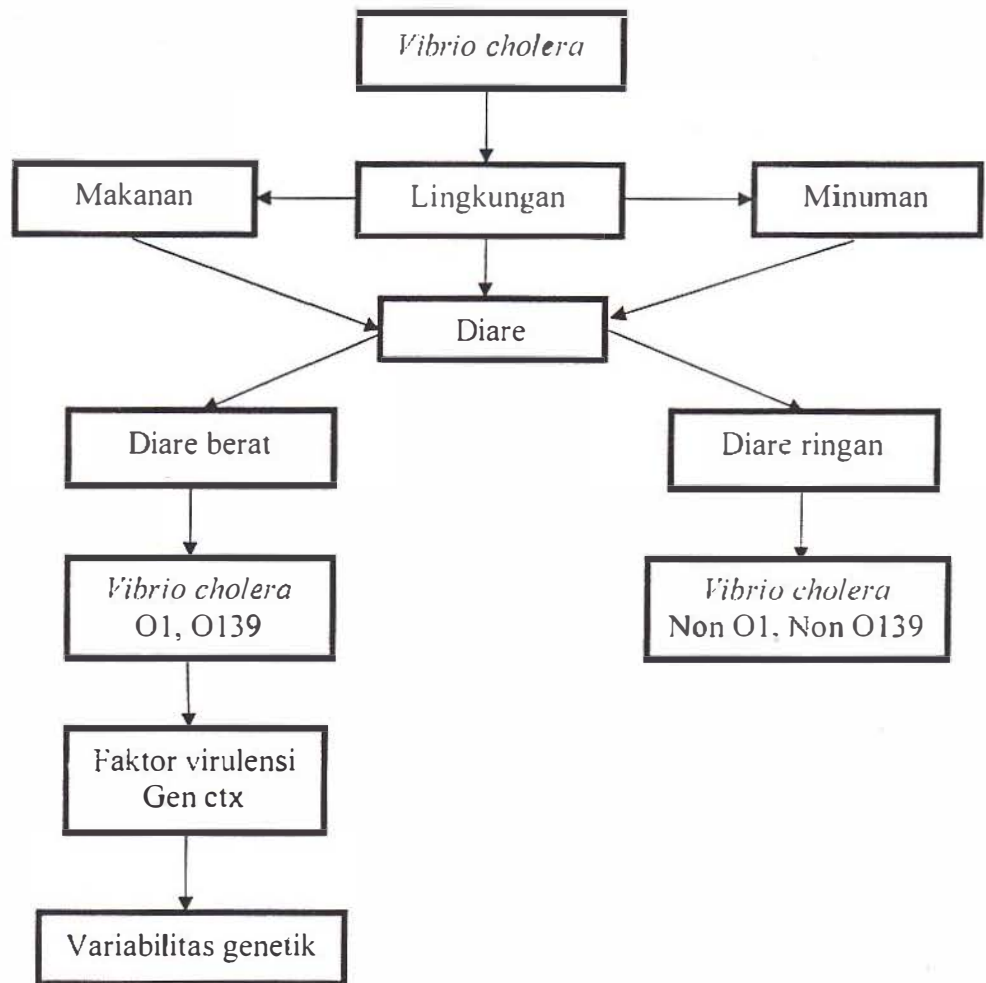
Inti dari teknik ini adalah amplifikasi fragmen genom DNA (yang sudah diisolasi) dengan menggunakan primer oligonukleotida. Unsur yang penting dalam PCR (Master Mix) adalah:⁵⁰

- Template DNA
- Primer Oligonukleotida sebanyak 2 buah yang komplementer (panjang biasanya 18-20 pasang basa) masing-masing dengan susunan mulai dari 3' (dikenal dengan forward dan reverse). Primer harus didesain unik dan tidak terdapat di tempat lain dari susunan DNA untuk mencegah amplifikasi bagian lain dari DNA. Untuk itu diperlukan informasi tentang susunan genom DNA, untuk menentukan daerah spesifik (biasanya *conserved region*).
- Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang terdiri dari 4 macam, yaitu dATP, dTTP, dGTP, dan dCTP
- Enzim DNA polymerase, yang berasal dari bakteri *Thermus aquaticus* yang hidup pada tempat dengan temperatur tinggi (100°C atau lebih)
- Mg^{2+} sebagai kofaktor
- Larutan buffer yang membuat lingkungan ionik dan pH yang optimum bagi reaksi PCR.

Teknik ini dilakukan dengan menggunakan alat *thermo cycler* untuk amplifikasinya dan hasil PCR dibaca dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa.⁵⁰

V. METODE PENELITIAN

5.1. Kerangka Konsep Penelitian



5.2. Tempat Penelitian dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.

Waktu penelitian dilakukan selama delapan bulan, yaitu pada bulan Mei sampai dengan bulan Desember tahun 2012.

5.3. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif laboratorium dengan menggunakan arsip sampel dengan disain penelitian adalah eksperimen laboratorium.

5.4. Besar Sampel

Untuk penelitian ini tidak diperlukan perhitungan sampel minimal karena sampel adalah seluruh isolat *Vibrio cholerae* yang diambil dari arsip sampel yaitu bahan biologi tersimpan (BBT) yang tersimpan di Laboratorium Bakteriologi Badan Litbangkes yang merupakan hasil isolasi dari penderita diare dan isolat lingkungan pada KLB Kabupaten Bogor tahun 2009 yang berjumlah 31 isolat.

5.5. Variabel

Variabel pada penelitian ini adalah lingkungan yang terkontaminasi, spesies dan serotype bakteri, karakteristik gen *ctx* isolat *Vibrio cholerae* dari penderita diare dan isolat dari lingkungan pada KLB Kabupaten Bogor tahun 2009.

5.6. Bahan dan Prosedur Kerja

1. Alat

Jarum ose, batang pengaduk, cawan petri, erlenmeyer, *hot plate*, lemari pendingin, bunsen, lampu UV, pipet mikro, *water bath*, inkubator, objek glass, *Rotary shaker* inkubator, *laminar air flow*, serta alat gelas standar lainnya, mesin PCR, seperangkat alat elektroforesis, sentrifugator, timbangan digital, vortex, alat sekuensing.

2. Bahan

TCBS agar, NaCl, peptone, phosphate buffer saline (PBS), ethanol absolut, alkohol 70%, antisera polivalen *Vibrio cholerae*, antisera monovalen ogawa *Vibrio cholerae*, antisera monovalen inaba *Vibrio cholerae*, mueller hinton agar (MHI), akuades steril, tissue towel, sabun cuci tangan antiseptik, aerosol barrier tips (10, 20, 100, 200, 1000 μ l), biohazard bag, sarung tangan nitril non powder (M, L), aluminium foil, gas elpiji, DNA extraction kit, DNA PCR kit, 10x TBE, loading dye, 100 bp DNA Ladder, Primer *ctxA* (F) dan Primer *ctxA* (R), Primer *ctxB* (F) dan Primer *ctxB* (R), ultra pure agarose, ethidium bromide, 1,5 ml nuclease free tube, thinwall individual tube 0,2 ml, big dye

terminator V3.1 cycle sequencing, big dye terminator purification kit, dye X 2,0 spin kit, buffer EDTA.

3. Prosedur Kerja

Metode baku untuk kultur bakteri digunakan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri.

a. Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Vibrio cholerae*

Sampel dari penderita diambil dari swab rectal yang dibawa ke Laboratorium Bakteriologi Badan Litbangkes dengan menggunakan medium transport cary blair. Penyimpanan dan pengiriman sampel pemeriksaan dilakukan pada suhu kamar, bukan suhu dingin, karena *Vibrio cholerae* lebih peka terhadap suhu dingin dibanding kuman-kuman enterik. Swab rectal kemudian dimasukkan ke medium pengayaan alkaline pepton water (APW) dan diinkubasi selama 18-20 jam pada suhu 37°C. Cairan pada bagian paling atas biakan APW diambil dan ditanamkan pada lempeng TCBS yang merupakan media selektif untuk pertumbuhan *Vibrio cholerae* dan diinkubasi selama 18-20 jam pada suhu 37°C. Koloni yang tumbuh pada media TCBS dipindahtanamkan ke dalam media biokimia. Sampel dari lingkungan diambil dari sumber air yang digunakan untuk minum dan juga untuk mengolah makanan. Sampel air ditambahkan dengan alkaline pepton water (APW) pekat dengan perbandingan 4 berbanding 1, misalkan 200 ml air ditambah dengan 50 ml alkaline pepton water (APW) dan kemudian diinkubasi selama 18-20 jam pada suhu 37°C. Tahapan berikutnya sama seperti pada sampel swab rectal. *Vibrio cholerae* yang berhasil diisolasi kemudian dimasukkan dalam tube yang berisi TSB gliserol 20% dan kemudian disimpan pada lemari penyimpanan sampel dengan suhu -80°C.

Vibrio cholerae dihidupkan kembali dari stok strain dengan menumbuhkan di medium air pepton alkali 37°C, kemudian diinokulasikan pada subkultur pada medium TCBS 37°C 24 jam, setelah inkubasi 24 jam diambil koloni yang spesifik dan dilanjutkan dengan reaksi biokimia dan serologi dari koloni yang spesifik. Hasil strain yang didapat akan dilanjutkan dengan ekstraksi

DNA *Vibrio cholerae*. Pipet tetes steril digunakan untuk mengambil sampel lalu dimasukkan ke dalam pot salep yang telah disterilisasi dengan menggunakan alkohol. Ke dalam sampel kemudian ditambahkan 225 ml media Alkaline Pepton Water (APW). Erlenmeyer digoncang dan dikocok selama 5 menit, lalu diinkubasi selama 6 jam pada *Rotary Shaker Inkubator*. Sampel kemudian ditanam di dalam media Thiosulfat Citrate Bile Sucrose (TCBS) Agar. Koloni warna kuning dengan ukuran 2-3 mm diambil dengan jarum Ose dan kemudian dipindahkan dan ditanam dalam media CHROM agar *Vibrio*. Setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, diamati koloni yang tumbuh. Koloni warna biru kehijauan atau biru terang dalam media CHROM agar *Vibrio* adalah bakteri *Vibrio cholerae*. Selanjutnya koloni dipindahkan dengan jarum Ose ke dalam media Kligler Iron Agar (KIA) dan media Motility Indone Ornithine (MIO), diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Isolasi dan identifikasi *Vibrio cholerae* juga dilakukan pada sampel air yang diambil dari lingkungan tempat KLB.

b. Identifikasi Spesies Bakteri *Vibrio cholerae*

Disiapkan sediaan gelas dan ditetaskan satu tetes antisera polivalen *Vibrio cholerae* terlebih dahulu, kemudian diambil spesimen dengan menggunakan ose dan dicampur dengan antisera yang telah ditetaskan. Kemudian diaduk sambil sediaan gelas digoyang-goyangkan. Dilihat ada tidaknya aglutinasi. Bila terbentuk aglutinasi dilanjutkan dengan antisera monovalen Ogawa dan Inaba.

c. Identifikasi Serotype Bakteri *Vibrio cholerae*

Satu tetes antisera polivalen *Vibrio cholerae* Inaba dan Ogawa ditetaskan pada kaca objek, lalu ditambahkan salah satu suspensi isolat bakteri yang diduga bakteri *Vibrio cholerae*. Penambahan isolat bakteri dilakukan dengan cara dioleskan satu ose isolat tersebut mulai dari pinggir tetesan antisera monovalen *Vibrio cholerae*, lalu diaduk dan amati terbentuknya aglutinasi. Terbentuknya aglutinasi ditandai dengan pembentukan endapan berupa pasir halus. Bila terbentuk aglutinasi hal ini menandakan bahwa uji positif dan kultur dapat

dinyatakan sebagai kultur bakteri *Vibrio cholerae*. Uji dikatakan positif *serotype* Inaba, Ogawa dan Hikojima bila :

<i>Serotype V. Cholerae</i> O1	Aglutinası	
	Antisera Ogawa	Antisera Inaba
Ogawa	+	-
Inaba	-	+
Hikojima	+	+

d. Ekstraksi DNA *Vibrio cholerae*

Deteksi gen *ctx Vibrio cholerae* dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu ekstraksi DNA dari bakteri *Vibrio cholerae*, amplifikasi DNA target dengan menggunakan mesin polymerase chain reaction (PCR) dan kemudian konfirmasi dengan elektroforesis. Sebelum memulai proses ekstraksi DNA, terlebih dahulu panaskan heat block sampai suhu mencapai 56°C. Pipet 20 µl Protease (atau proteinase K) ke dalam 1,5 ml microcentrifuge tube. Tambahkan 200 µl sampel ke microcentrifuge tube. Gunakan sampai 200 µl suspensi bakteri dalam 200 µl PBS. Tambahkan 200 µl Buffer AL pada sampel kemudian vortex selama 15 detik. Inkubasi pada 56°C selama 30 menit dan 95°C selama 15 menit. Spin down tabung microcentrifuge 1,5 ml untuk menghapus tetes dari dalam tutup. Tambahkan 200 µl ethanol absolute (96-100%) ke dalam sampel, dan vortex selama 15 detik. Setelah itu centrifuge dengan tabung microcentrifuge 1,5 ml untuk menghapus tetes dari bagian dalam tutupnya. Dengan hati-hati masukkan ke dalam mini spin kolom tanpa membasahi rim, tutup dan centrifuge pada 8000 rpm selama 1 menit. Buang supernatant dan ganti collection tube. Dengan hati-hati buka kolom spin mini dan tambahkan 500 µl Buffer AW1 tanpa membasahi rim. Tutup topi dan centrifuge pada 8000 rpm selama 1 menit. Buang supernatant dan ganti collection tube. Dengan hati-hati buka kolom spin mini dan tambahkan 500 µl buffer AW2 tanpa membasahi rim. Tutup topi dan centrifuge dengan kecepatan penuh 14.000 rpm selama 3 menit. Tempatkan kolom spin mini dalam tabung 1,5 ml microcentrifuge bersih, dan membuang tabung berisi

koleksi filtrat. Hati-hati terbuka kolom spin tambahkan 150 μ l Buffer AE atau air suling. Inkubasi pada suhu kamar (15-25°C) selama 1 menit, dan kemudian centrifuge pada 8000 rpm selama 1 menit. Buang spin column dan sampel siap digunakan untuk PCR. Apabila sampel tidak langsung digunakan untuk PCR, maka sampel dapat disimpan pada suhu -80°C untuk waktu yang lama.

e. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR *Biorad*. Sebelumnya disiapkan terlebih dahulu PCR mix dengan menambahkan komponen-komponen ke dalam tabung reaksi steril 1,5 ml. Komponen PCR mix untuk 1 kali reaksi terdiri dari nuklease free water 5,5 μ l, 2x PCR master mix 12,5 μ l, Primer F dan Primer R masing-masing 0.5 μ l, dan Taq polymerase 1 μ l. Sekuen primer F dan primer R yang digunakan untuk *ctxA* dan *ctxB* dapat dilihat pada tabel 3.2.

Tabel 3.2. Primer amplifikasi gen *ctx* *Vibrio cholerae*

Target	Sekuen Primer	Produk Amplifikasi
<i>ctxA</i> (F)	5'-CTCAGACGGGATTTGTTAGGCACG-3'	302
<i>ctxA</i> (R)	5'-TCTATCTCTGTAGCCCCTATTACG-3'	302
<i>ctxB</i> (F)	5' ATGATTAAATTA AAAATTTGG'3	375
<i>ctxB</i> (R)	5' TTAATTTGCCATACTAATTGC'3	375

Untuk menyiapkan PCR master mix lebih dari satu reaksi, kalikan jumlah volume dengan jumlah reaksi yang dibutuhkan dan tidak lupa selalu menyiapkan sekurang-kurangnya 1 atau 2 lebih dari reaksi yang dibutuhkan. Campurkan semua komponen dengan vorteks dan disentrifus beberapa detik, kemudian aliquot ke dalam tabung 200 μ l masing-masing 20 μ l. Tambahkan kedalam tabung yang telah diisi master mix tersebut dengan *Template* DNA sebanyak 5 μ l. 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, extention (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.

f. Elektroforesis

Hasil PCR masing-masing sebanyak 6 µl kemudian dicampur dengan *loading dye* 1 µl. Masukkan ke dalam *well* gel agarosa 2% di dalam elektroforesis *chamber*. Salah satu *well* diisi dengan marker sebanyak 10 µl. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt selama 45 menit. Gel kemudian diletakkan di dalam alat pengamat DNA (Gel Doc) dan diamati dibawah lampu UV. Pada elektroforesis kontrol negatif yang digunakan adalah akuades. Pada foto dapat dilihat pola pita DNA yang ukurannya diketahui melalui perbandingan dengan ukuran pita-pita standar "100 bp DNA ladder", dimana ukuran pola pita gen *ctxA* adalah 302 bp dan gen *ctxB* adalah 375 bp.

g. Purifikasi Produk PCR

Hasil dari elektroforesis akan dilakukan konfirmasi dengan sekuensing menggunakan *Genetic Analyzer* (GA3130) dari *Applied Biosystem*, yang bertujuan melihat urutan nukleotida gen *ctx Vibrio cholerae* pada isolat *Vibrio cholerae* penderita diare dan isolat lingkungan pada KLB diare di Bogor tahun 2009.

Sebelum dilakukan sekuensing, produk PCR yang dihasilkan dimurnikan terlebih dahulu. Isopropanol 75% ditambahkan ke masing-masing tube produk PCR sebanyak 60 µl dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 15 menit, kemudian dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 15 menit lalu supernatan dibuang. Langkah selanjutnya adalah penambahan etanol 70 % sebanyak 60 µl dan disentrifugasi selama 15 menit. Supernatan dibuang dan dikeringkan dengan angin selama 1 jam. Produk presipitat digunakan langsung untuk sekuensing.

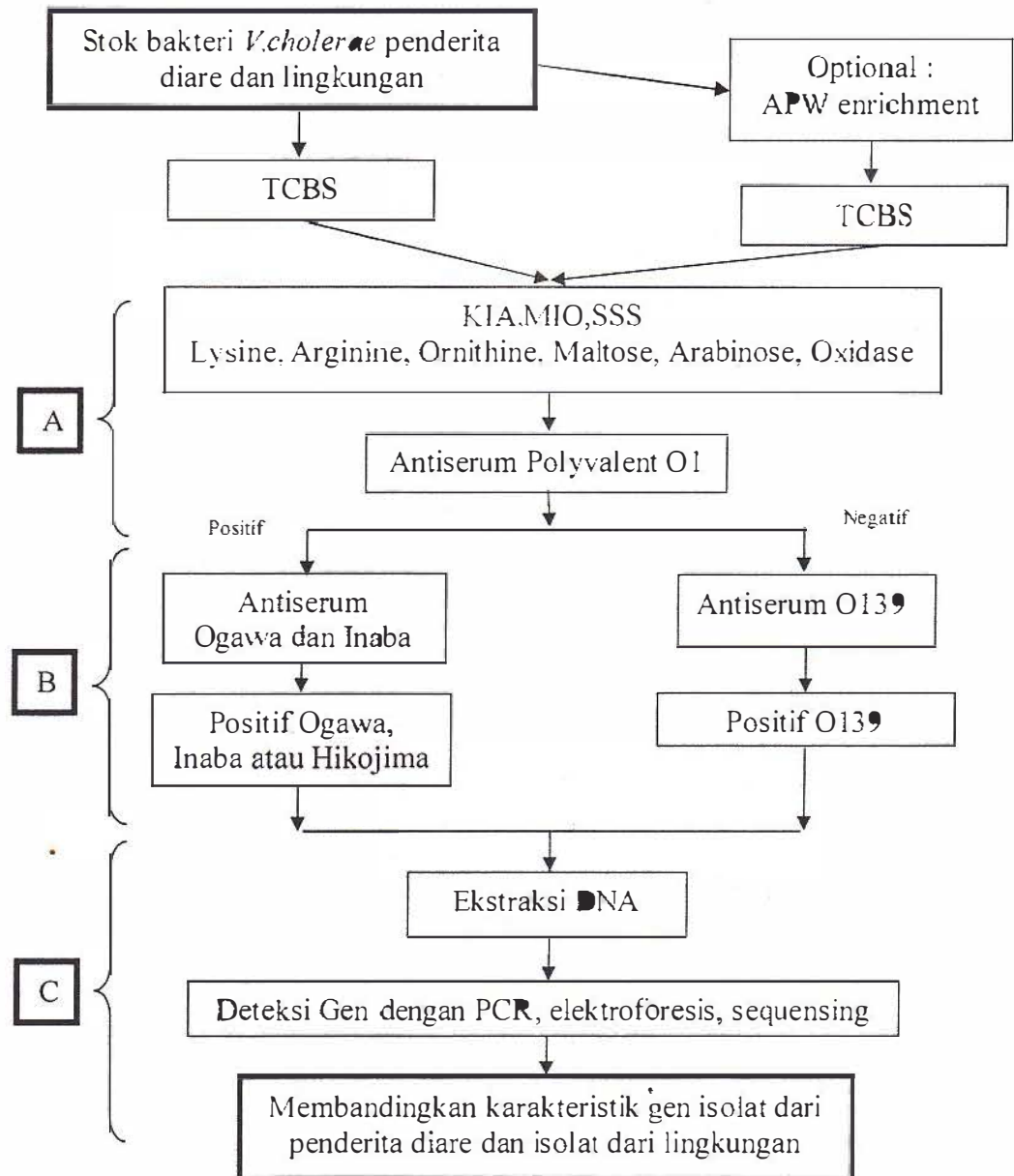
h. Sekuensing

Sekuensing dilakukan dengan menggunakan 5 µl dari *Big dye* (ABI Prism® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit), 4 µl dari 5x *sequence*

buffer menggunakan kit siap pakai, 0.5 μ l dari 10 μ M primer dan produk PCR yang diperkirakan 1 ~ 50 ng (estimasi 100 ~ > 2000 bp) dari produk PCR. Reaksi PCR dilakukan dengan kondisi : tahap pertama 96°C selama 1 menit, kemudian tahap kedua menggunakan 25 siklus : 96°C selama 10 detik, 50°C selama 5 detik dan 60°C selama 4 menit dan 4°C sampai digunakan untuk analisis selanjutnya. Sebelum analisis sekuen, untuk menghilangkan dye berlebih digunakan *Big Dye Ex* yaitu campuran antara 10 μ l *SAM solution* dengan 45 μ l *buffer solution*. Sampel dianalisis menggunakan sistem sekuen DNA 3130 (*Applied Biosystems*), fmol DNA sequencing System; Promega dan tehnik sekuense flourecent (dRodhamine Terminator Cycle Sequencing kit; Applied Biosystem) menggunakan ABI 377 *automatic sequencer*.

i. Analisis Hasil Sekuensing

Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan metode deskriptif. Sekuen DNA hasil sekuensing dibandingkan antara isolat yang satu dengan lainnya, baik antara isolat penderita diare dengan isolat lingkungan, dan juga dibandingkan antara isolat yang digunakan dalam penelitian ini dengan isolat *Vibrio cholerae* lain yang dilaporkan dari berbagai tempat di dunia yang diakses melalui *gene bank*. Urutan nukleotida fragmen gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit A dan sub unit B sesuai urutan yang sama diposisikan sejajar (aligned) menggunakan program SeqScape v2.5 dan BioEdit 5.0.6. Urutan nukelotida yang sudah disejajarkan diubah kemudian menjadi bentuk protein sesuai asam amino yang dikode oleh triplet kodon tersebut.



Keterangan :

A = identifikasi spesies *Vibrio cholerae*

B = identifikasi serotype *Vibrio cholerae*

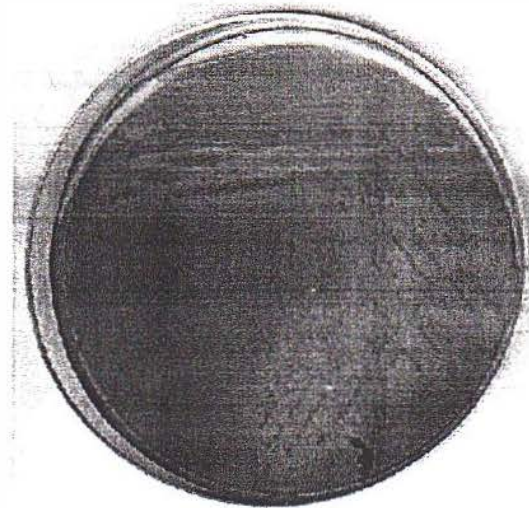
C = deteksi gen penghasil toksin *Vibrio cholerae*

VI. HASIL PENELITIAN

6.1. Kultur Ulang Isolat *Vibrio cholerae*

Setelah diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C, kemudian diamati koloni yang tumbuh. Semua isolat penderita diare dan lingkungan

yang dikultur kembali pada agar TCBS menunjukkan pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae*. Koloni *Vibrio cholerae* memiliki morfologi yang besar dengan diameter 2-3 mm, permukaan yang halus, agak datar, bagian tengah buram dan bagian pinggir terang, berwarna kuning (meragi sukrosa). Pertumbuhan isolat *Vibrio cholerae* yang ditumbuhkan kembali pada agar TCBS dapat dilihat contohnya seperti yang tampak pada gambar 4.1.



Gambar 6.1. Pertumbuhan isolat *Vibrio cholerae* pada medium TCBS Agar

6.2. Identifikasi Serogroup dan Serotipe Bakteri *Vibrio cholerae*

Hasil uji aglutinasi dengan antisera polivalen *Vibrio cholerae* menunjukkan hasil positif pada semua isolat penderita diare dan lingkungan, sehingga dapat dinyatakan bahwa seluruh isolat KLB diare di Bogor tahun 2009 merupakan bakteri *Vibrio cholerae* serogroup O1. Semua kultur juga menunjukkan hasil positif pada uji aglutinasi dengan menggunakan antisera monovalen *Vibrio cholerae* Ogawa, sehingga dapat dinyatakan bahwa kultur tersebut merupakan *Vibrio cholerae* O1 serotipe Ogawa. Hasil identifikasi Serogroup dan serotipe *Vibrio cholerae* dapat dilihat pada tabel 4.1.

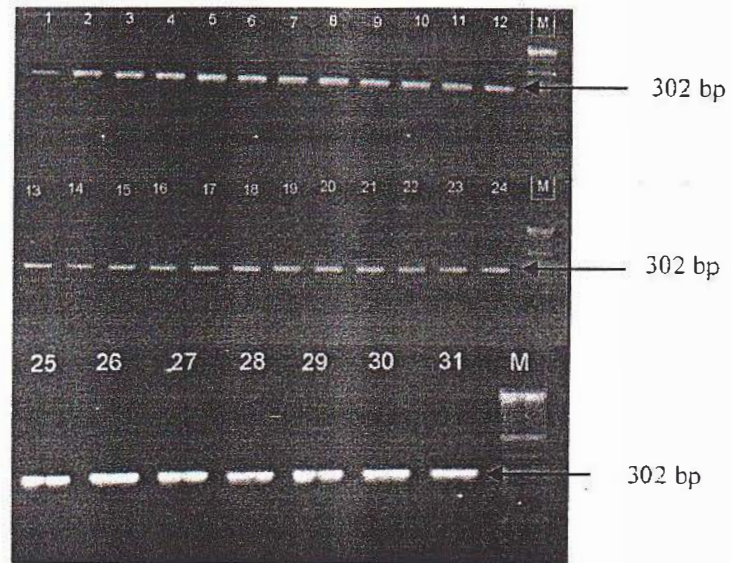
Tabel 6.1. Hasil Identifikasi Serogroup dan serotipe *Vibrio cholerae*

Asal Sampel	Jumlah	Antisera Polivalen	Antisera Monovalen	
			Antisera Ogawa	Antisera Inaba
Penderita Diare	26	26	26	0
Lingkungan	5	5	5	0

6.3. Deteksi Gen *ctx* *Vibrio cholerae*

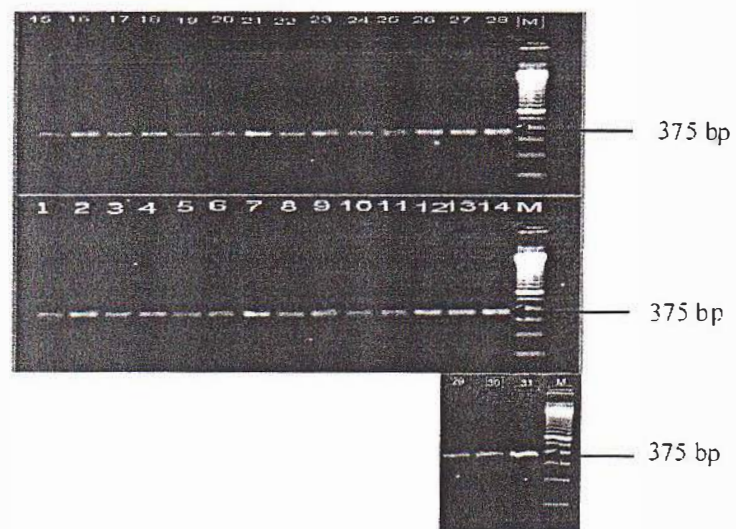
Hasil amplifikasi produk PCR sepanjang sekitar 300-400 basa kemudian dilihat dengan menggunakan elektroforesis dan dilihat dengan pencahayaan ultraviolet. "Marka" atau penanda (*marker*) yang merupakan campuran molekul dengan ukuran berbeda-beda yang dapat digunakan untuk menentukan ukuran molekul dalam pita sampel dengan melakukan elektroforesis marka tersebut pada lajur di gel yang paralel dengan sampel. Pita pada lajur sampel tersebut dapat dibandingkan dengan pita marka untuk menentukan ukuran masing-masing sampel.

Terlihat dari foto bahwa hasil elektroforesis dari seluruh isolat yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan hasil positif gen *ctx* *Vibrio cholerae* dengan adanya pita pada semua lajur. Pita pada semua lajur sampel dicocokkan dengan *band ladder* (marka) untuk mengetahui jumlah pasang basa DNA yang terdeteksi dan terisolasi dari sampel. Panjang pita yang diharapkan disini adalah 302 bp untuk gen *ctx* *Vibrio cholerae* sub unit A dan 375 untuk gen *ctx* sub unit B sedangkan pada kontrol negatif tidak akan terbentuk pita. Pada pembacaan elektroforesis produk amplifikasi gen *ctx* sub unit A didapatkan hasil pita yang terbentuk dari semua lajur sampel yang kemudian dicocokkan dengan penanda menunjukkan bahwa semua sampel positif gen *ctx* *Vibrio cholerae* karena pada semua lajur sampel menghasilkan pita sepanjang 302 bp (gambar 4.2).



Gambar 6.2. Hasil elektroforesis amplifikasi gen *ctxA* dengan gel agarosa 2%

Hasil pembacaan elektroforesis produk amplifikasi gen *ctx* sub unit A menunjukkan bahwa semua sampel positif gen *ctx* *Vibrio cholerae* dengan dihasilkan pita pada semua lajur sampel pita sepanjang 375 bp (gambar 4.3).

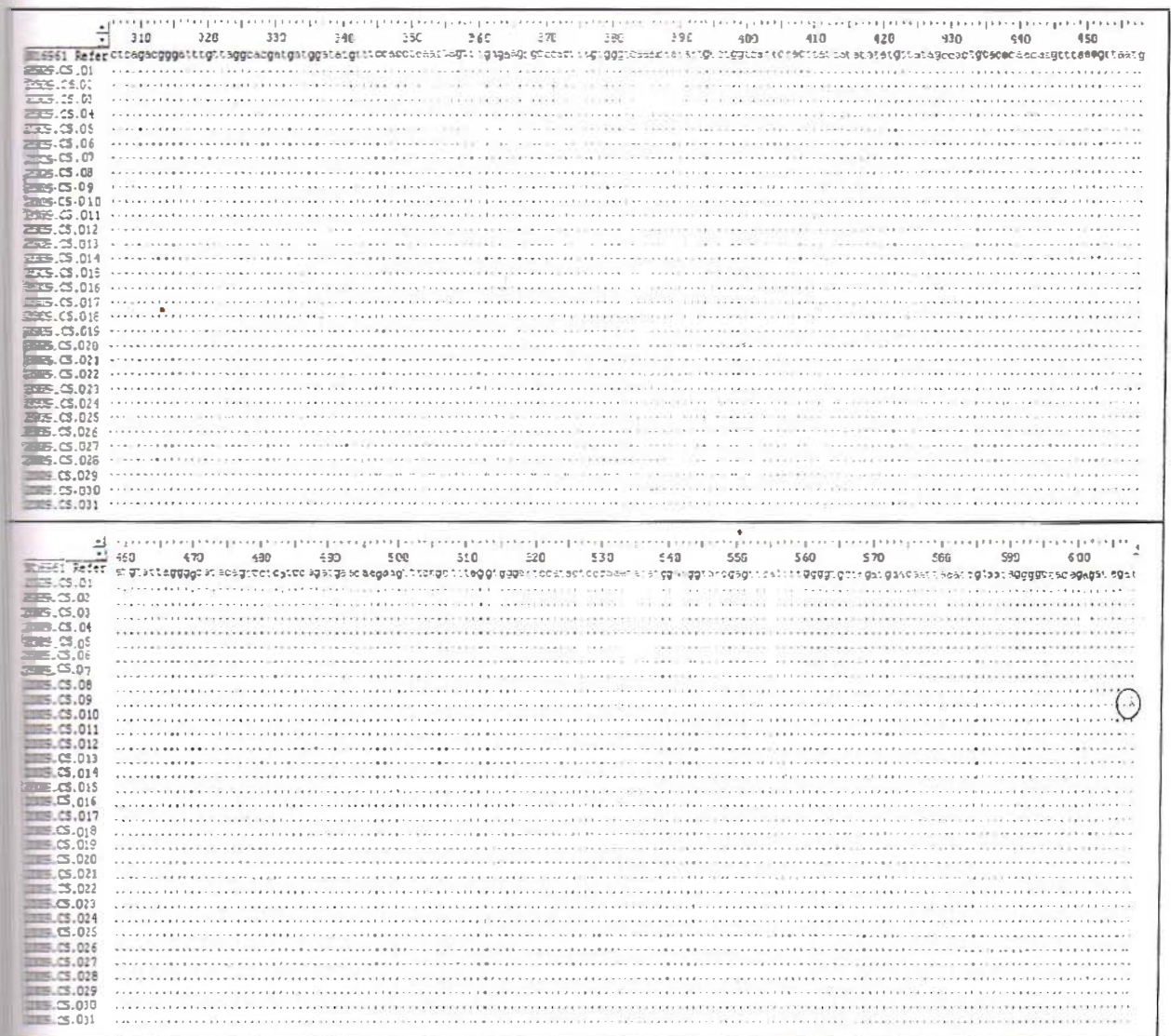


Gambar 6.3. Hasil elektroforesis amplifikasi gen *ctxB* dengan gel agarosa 2%

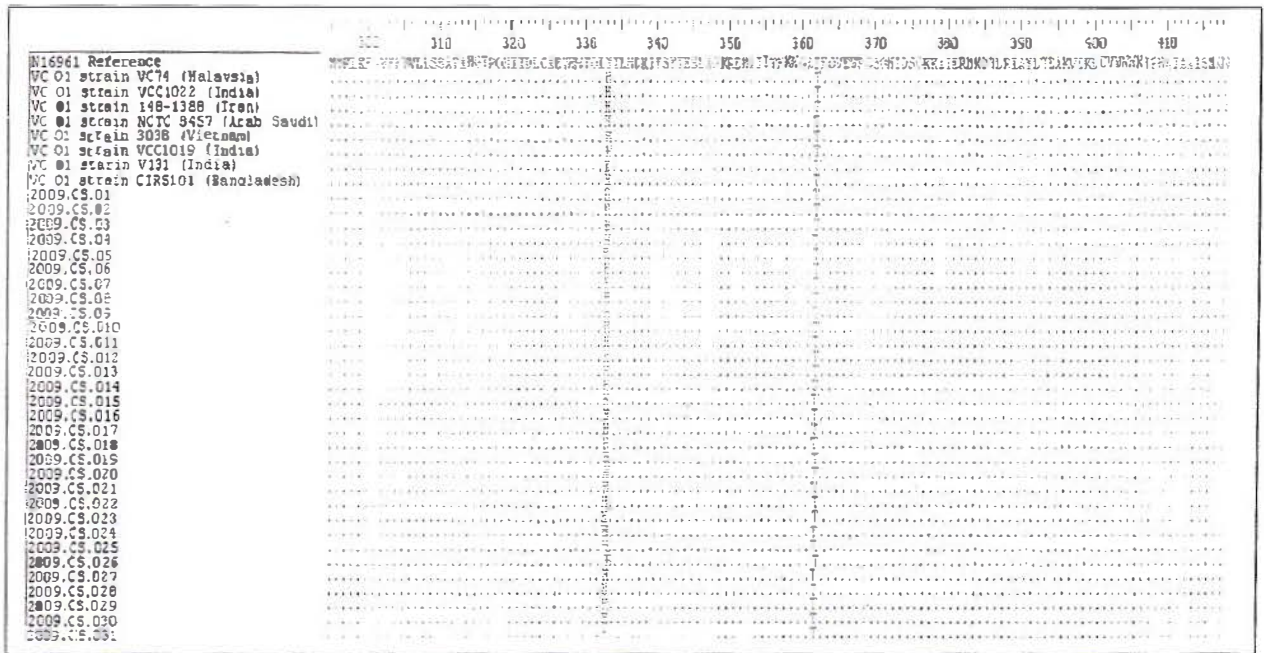
6.4. Sekuensing

Setelah dilakukan konfirmasi produk PCR dengan menggunakan elektroforesis, selanjutnya dilakukan sekuensing untuk mengetahui urutan basa

nukleotida hasil amplifikasi. Sekuen nukleotida dari fragmen gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit A dan sub unit B yang telah berhasil diamplifikasi dari semua isolat kemudian disejajarkan dan dibandingkan antar isolat yang digunakan dalam penelitian ini, baik antara isolat penderita diare yang satu dengan penderita diare lainnya dan juga antara isolat penderita diare yang disejajarkan dengan isolat lingkungan. Pada sekuen nukleotida gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit A didapatkan perbedaan pada sampel dengan kode 2009.CS.09 (sampel penderita diare) yaitu terjadi perubahan basa dari Timidin menjadi Adenosin pada posisi basa 608 (608T>A). Sekuen nukleotida gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit A dapat dilihat pada gambar 4.4.



Gambar 6.4. Pensejajaran nukleotida gen *ctx* sub unit A dari semua isolat sampel



Gambar 6.8. Pensejajaran asam amino sub unit B dari isolat yang digunakan dalam penelitian dengan beberapa strain di beberapa tempat

VII. PEMBAHASAN

Pada penelitian ini berhasil diidentifikasi isolat *Vibrio cholerae* hasil isolasi KLB diare di Bogor tahun 2009. Hasil uji aglutinasi dengan menggunakan antiserum polivalen *Vibrio cholerae* menunjukkan bahwa semua isolat KLB diare di bogor tahun 2009 yang digunakan dalam penelitian ini termasuk *Vibrio cholerae* serogrup O1, sedangkan hasil uji aglutinasi dengan menggunakan antiserum monovalen *Vibrio cholerae* menunjukkan bahwa semua isolat termasuk serotipe Ogawa.

Bakteri *Vibrio cholerae* dibedakan menjadi beberapa serogrup berdasarkan antigen O-nya. Meskipun terdapat lebih dari 200 macam serogrup, namun terdapat dua serogrup yang dianggap sangat patogen dan menjadi penyebab kejadian wabah kolera di dunia yaitu serogrup O1 dan O139. Pada umumnya *Vibrio cholerae* yang diisolasi di Indonesia merupakan serogrup O1 dan serotipe ●gawa.⁴⁰

Hasil penelitian ini sesuai dengan beberapa hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan di Indonesia yang hasilnya menunjukkan *Vibrio cholerae*

serogrup O1 serotipe Ogawa. Pada tahun 2007 Marlina dan kawan-kawan melakukan isolasi dan identifikasi terhadap keberadaan *Vibrio cholerae* dari sampel yang diambil dari beberapa rumah sakit di Padang. Dari sampel yang berhasil diidentifikasi didapatkan hasil bahwa semua *Vibrio cholerae* yang diisolasi merupakan *Vibrio cholerae* serogroup O1 serotipe Ogawa.⁴³ Penelitian lain yang telah dilakukan oleh Dadik Rahardjo dan kawan-kawan pada tahun 2009 terhadap *Vibrio cholerae* yang berhasil diisolasi dari beberapa tempat di Surabaya juga menghasilkan data bahwa dari sampel yang diisolasi dari semua *Vibrio cholerae* yang berhasil diisolasi merupakan serogroup O1 dan serotipe Ogawa.⁴⁴ Hasil survey pada tahun 1993 sampai 1999 yang dilakukan oleh Cyrus Simanjuntak bersama timnya juga didapatkan data bahwa dari seluruh *Vibrio cholerae* yang berhasil diisolasi sebanyak 98.81 % merupakan *Vibrio cholerae* serogroup O1.^{46,48}

Berdasarkan data yang ada di Badan Kesehatan Dunia (WHO), pada pandemi kolera pertama yang dimulai pada tahun 1817 di wilayah Asia, dan pandemi berikutnya disebabkan oleh serogroup O1 biotipe klasik. Pandemi kolera ketujuh pada tahun 1961 juga disebabkan oleh *Vibrio cholerae* serogroup O1 biotipe El Tor berasal dari Indonesia dan kemudian menyebar dengan cepat di sebagian besar daratan Asia. Pada tahun 1970, biotipe Eltor berhasil diisolasi di wilayah Afrika Barat, dan sekarang biotipe Eltor telah menjadi endemik di banyak negara di Afrika. Pada tahun 1991 berhasil diisolasi di Peru yang sebelumnya tidak pernah ditemukan selama hampir 100 tahun, dan dari Peru kemudian menyebar ke seluruh negara Amerika Latin. Dalam beberapa tahun terakhir kolera di Amerika Latin telah dapat dikendalikan. *Vibrio cholerae* serogroup O1 kini mendominasi di beberapa bagian Afrika dan Asia. *Vibrio cholerae* O1 merupakan penyebab kolera asiatik atau kolera epidemik. Pada awalnya hanya *Vibrio cholerae* O1 yang dianggap memproduksi enterotoksin yang menyebabkan kolera endemik dan epidemik namun belakangan *Vibrio cholerae* O139 juga diketahui memproduksi enterotoksin dalam jumlah yang besar seperti pada yang terdapat *Vibrio cholerae* O1. *Vibrio cholerae* serogroup O139, ditemukan sebagai penyebab wabah kolera di India dan Bangladesh pada tahun 1992 dan sejak itu kemudian menyebar ke negara lain di wilayah Asia Tenggara.⁴⁰

Pemeriksaan *Vibrio cholerae* dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) dan konfirmasi dengan elektroforesis didapatkan hasil bahwa semua isolat *Vibrio cholerae* positif mengandung gen *ctx Vibrio cholerae*. Gen *ctx Vibrio cholerae* merupakan gen yang terdapat pada *Vibrio cholerae* patogen yang berperan dalam menghasilkan toksin kolera (CT). Gen *ctx Vibrio cholerae* ini hanya terdapat pada *Vibrio cholerae* sehingga untuk mengidentifikasi bakteri ini bisa hanya dengan melihat gen spesifik yang dimilikinya tersebut menggunakan metoda biomolekuler *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Tidak semua bakteri *Vibrio cholerae* mempunyai gen *ctx Vibrio cholerae*, hanya bakteri *Vibrio cholerae* yang patogen mempunyai gen ini, dan selama ini hanya terdapat dua jenis *Vibrio cholerae* yang patogen dan menyebabkan terjadinya wabah kolera di banyak negara yaitu *Vibrio cholerae* serogroup O1 dan *Vibrio cholerae* serogroup O139. Deteksi gen *ctx* dengan PCR dilakukan untuk mengkonfirmasi keberadaan gen *ctx* pada setiap sampel sebelum dilakukan sekuensing. Berdasarkan hasil identifikasi, semua isolat yang digunakan dalam penelitian ini merupakan isolat *Vibrio cholerae* O1 serotipe Ogawa sehingga dari hasil pemeriksaan metoda biomolekuler *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dapat dideteksi keberadaan gen *ctx Vibrio cholerae* pada semua sampel.

Pensejajaran sekuen nukleotida gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit A antara isolat penderita diare yang satu dengan lainnya menunjukkan hasil 100% identik. Pada sekuen nukleotida gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit A terdapat mutasi tunggal hanya pada sampel dengan kode 2009.CS.09 yaitu pada posisi basa ke 608 yang mengalami perubahan basa Timin menjadi Adenin (608T>A) yang mengakibatkan terjadinya perubahan asam amino dari Tirosin menjadi Aspargin (T203I). Pada penelitian ini tidak bisa ditarik kesimpulan mengenai efek dari perubahan asam amino gen *ctx* tersebut terhadap kondisi penderita diare karena tidak tersedia data klinis penderita diare. Pensejajaran sekuen nukleotida gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit B isolat penderita diare satu dengan yang lain menunjukkan hasil 100% identik. Meskipun jika disejajarkan dengan fragmen gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit B dari *genbank* terdapat mutasi substitusi pada basa 997 yang mengalami substitusi dari Timidin menjadi Cytosin (997T>C) dan pada basa 1085 yang mengalami substitusi dari Timidin menjadi Cytosin (1085T>C),

namun sekuen nukleotida gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit B pada penderita diare yang disejajarkan dengan sekuen nukleotida isolat lingkungan menunjukkan 100% identik.

Perbandingan sekuen nukleotida yang identik antara semua isolat penderita diare kemungkinan dikarenakan sumber infeksi *Vibrio cholerae* berasal dari spesies yang sama dan berasal dari lokasi yang sama atau berdekatan. Pensejajaran antara isolat dari penderita diare menunjukkan hasil 100% identik karena tidak terdapat perbedaan antara satu dengan lainnya. Perbandingan sekuen nukleotida yang identik dikarenakan sumber infeksi *Vibrio cholerae* didapatkan dari lingkungan. Lingkungan dapat menjadi sumber infeksi *Vibrio cholerae*. Beberapa faktor yang dapat dilihat sebagai kemungkinan terjadi penularan adalah lingkungan yang tidak bersih dan tercemar oleh bakteri *Vibrio cholerae*. Dari lingkungan yang tercemar kemudian mencemari sumber air yang digunakan untuk minum dan juga air untuk penanganan makanan. Sumber air yang telah tercemar bakteri *Vibrio cholerae* kemudian dikonsumsi oleh manusia sehingga bakteri *Vibrio cholerae* akan menginfeksi manusia.

Lingkungan sangat berperan sebagai sumber infeksi bakteri *Vibrio cholerae*. Infeksi kolera sangat erat hubungannya dengan keadaan hygiene dan sanitasi lingkungan, terutama yang berkaitan dengan persediaan air untuk rumah tangga dan cara pembuangan kotoran yang tidak baik. Penyebaran sumber infeksi kolera dapat berupa tinja dan muntahan penderita yang mengandung bakteri *Vibrio cholerae*.⁵⁰

Analisis sekuen nukleotida gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit B dari sampel yang digunakan dalam penelitian menghasilkan gen *ctx Vibrio cholerae* *Vibrio cholerae* dengan sekuen nukleotida yang identik dengan sekuen nukleotida pada gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit B serogroup O1 biotipe El Tor. Sekuen asam amino yang ditunjukkan dari semua sampel yang digunakan dalam penelitian ini identik dengan delapan perwakilan serogroup O1 biotipe El Tor yang selaras dengan sekuen gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit B strain referensi N16961 yang termasuk biotipe El Tor. Sekuen asam amino dari semua sampel yang digunakan dalam penelitian ini menjadi identik dengan sekuen asam amino dari gen *ctx*

Vibrio cholerae strain referensi N16961, dengan histidin pada posisi 333 dan treonin pada posisi 362.⁴³

Beberapa studi perbandingan sekuen menunjukkan homologi sekuen gen *ctx Vibrio cholerae* antara berbagai serogrup *Vibrio cholerae*. Kumar et al. (2009) mendokumentasikan varian gen *ctx Vibrio cholerae* baru dari *Vibrio cholerae* O1 biotipe El Tor yang diisolasi dari Orissa (India). Studi ini menyoroti mutasi baru (H20N) pada gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit B dan adanya perubahan gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit B dalam biotipe El Tor dari isolat klinis. Sebuah studi oleh Ansaruzzaman (2004) melaporkan substitusi H18Y dan T47I pada gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit B biotipe El Tor dan sekuen ini mirip dengan sekuen gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit B dari biotipe Klasik. Sebelumnya, sebuah penelitian menunjukkan munculnya strain baru El Tor dengan modifikasi gen *ctx Vibrio cholerae* biotipe Klasik. Dengan demikian, sekuen untuk gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit A dan sub unit B mewakili beragam serogroup yang diisolasi pada berbagai periode waktu dari berbagai sumber dan lokasi yang tersedia di GenBank dibuat untuk berbagai penelitian. Beberapa studi telah menunjukkan efek mutasi yang diarahkan pada gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit A serta pada sub unit B pada O1 wild type. Terjadinya situs mutan dilaporkan menyebabkan penurunan atau kerugian pada toksisitas seperti yang terjadi pada gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit A (R7K, R11K, I16A, R25G, E29H, S68Y +V72Y, E112Q, F223D) dan pada sub unit B (R35D, H57A, L77D, I74D, T78D). Dengan demikian, peran situs mutan mengarah pada hilangnya toksisitas seperti pada O1 wild type. Oleh karena itu,] penting untuk mengevaluasi pengaruh mutasi yang disebabkan oleh tekanan seleksi alam di antara serogroup.⁴⁹

Sekuen nukleotida dan asam amino hasil penelitian ini identik dengan sekuen nukleotida dari beberapa tempat di Asia, seperti identik dengan sekuen nukleotida dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Balakrish dan kawan-kawan. Balakrish dan kawan-kawan pada tahun 2005 melakukan penelitian terhadap isolat yang berada di Pusat Penelitian dan Kesehatan Dhaka Banglades. Isolat-isolat tersebut dilakukan pemeriksaan sekuensing untuk mengetahui sekuen nukleotida dan asam amino gen *ctx* terutama sub unit B. Sekuen nukleotida dari

isolat yang diteliti kemudian disejajarkan dan dibandingkan dengan sekuen lengkap gen *ctx Vibrio cholerae* yang diambil dari *GeneBank* sebagai referensi.

Pengaruh mutasi pada pembentukan toksin kolera secara fungsional (AB5 hetero-heksamer) sangat penting. Laporan gambaran munculnya serogroup baru dengan mutasi yang terjadi pada gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit A dan sub unit B telah tersedia. Mutasi pada gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit A dan sub unit B mempunyai peran terhadap perakitan struktur AB5 toksin kolera. Beberapa mutasi (kutub non-polar atau wakil) sebagian besar non-identik (menyebabkan perubahan sifat fisik dan kimia) di alam dan memiliki efek potensial terhadap interaksi protein-protein dari sub unit gen *ctx Vibrio cholerae* yang mempengaruhi pembentukan struktur AB5. Signifikansi terhadap peningkatan kompleks protein rekombinan gen *ctx Vibrio cholerae* analog untuk desain vaksin terhadap multi serogroup.⁴⁹

VIII. KESIMPULAN DAN SARAN

8.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan :

1. Semua isolat *Vibrio cholera* KLB diare di Bogor tahun 2009 merupakan *Vibrio cholerae* serogrup O1 serotipe Ogawa.
2. Hasil amplifikasi terhadap gen *ctx Vibrio cholerae* sub A dan sub unit B menunjukkan bahwa semua isolat penderita diare dan isolat lingkungan KLB diare di Bogor tahun 2009 mengandung gen *ctx Vibrio cholerae*.
3. Hasil sekuesing terhadap seluruh isolat menunjukkan bahwa :
 - Pada gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit A menunjukkan terdapat mutasi tunggal pada sampel dengan kode 2009.CS.09 pada posisi basa ke 608 yaitu terjadi perubahan basa Timin menjadi Adenin (608T>A).
 - Pada gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit B menunjukkan terdapat substitusi pada basa 997 yang mengalami substitusi dari timidin menjadi sitosin (997T>C) dan pada basa 1085 yang mengalami substitusi dari timidin menjadi sitosin (1085T>C).

4. Sekuen nukleotida gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit A dan sub unit B identik antar isolat penderita diare.
5. Sekuen nukleotida gen *ctx Vibrio cholerae* sub unit A dan sub unit B dari isolat penderita diare identik dengan isolat dari lingkungan.

8.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk penyempurnaan penelitian ini. Beberapa saran yang dapat digunakan untuk penelitian lanjutan antara lain perlu dilakukan:

1. Penelitian secara mendalam untuk identifikasi dan karakterisasi gen *ctx Vibrio cholerae* yang dapat mewakili populasi *Vibrio cholerae* di Indonesia untuk mengetahui pola khas mutasi gen *ctx Vibrio cholerae* asal Indonesia yang dapat mengarah pada perubahan patogenitas *Vibrio cholerae*.
2. Penelitian untuk melihat hubungan mutasi yang terjadi pada *ctxAB* dengan tingkat keparahan diare kolera.
3. Penelitian lebih lanjut dengan menggunakan gen *ctx Vibrio cholerae* secara utuh agar dapat memastikan posisi mutasi yang terjadi secara keseluruhan.
4. Penelitian untuk identifikasi biotipe *Vibrio cholerae* untuk mengetahui epidemiologi kolera di Indonesia.

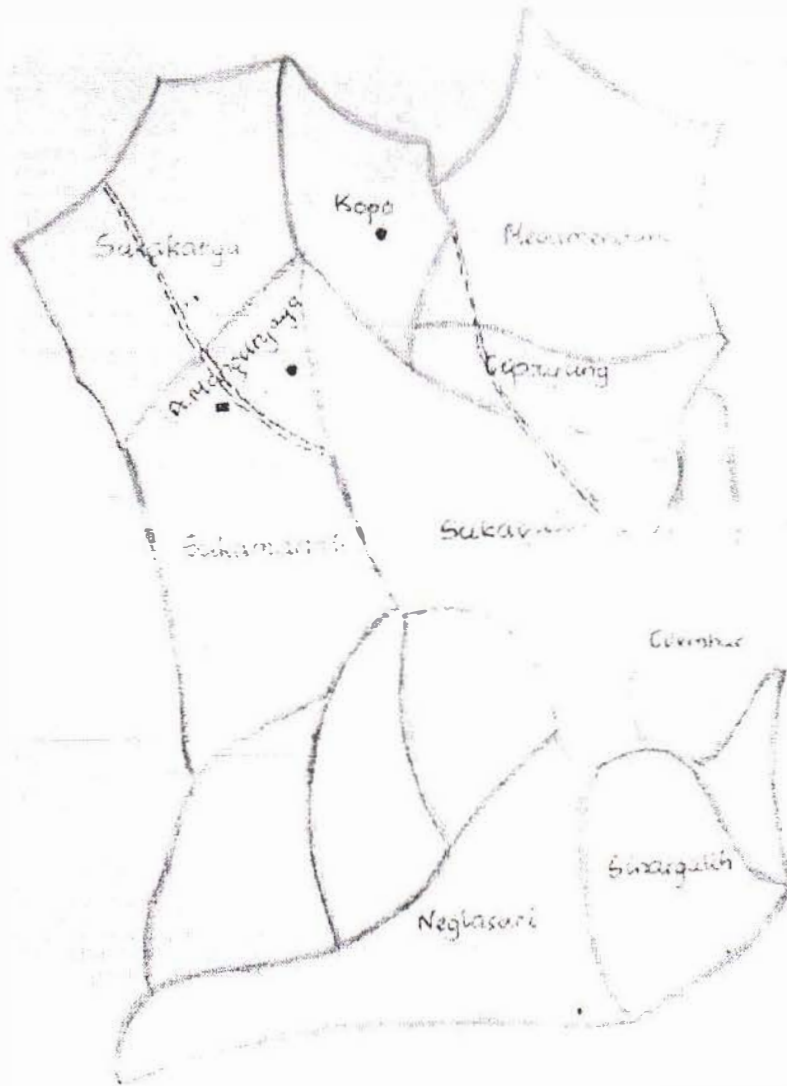
DAFTAR PUSTAKA

1. Soemarsono H. Kolera: dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jakarta: Balai Penerbit FKUI, 1996. p. 443.
2. Pelczar J.M. Dasar – Dasar Mikrobiologi. Jakarta: Universitas Indonesia, 2005.
3. Simanjuntak CH, Larasati W, Arjoso S, Putri M, Lesmana M, A Buhari et al. Cholera in Indonesia in 1993 - 1999 .2001: 65(6): 788–97.
4. Pusat Komunikasi Publik Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Departemen Kesehatan RI. Jakarta. 2008
5. Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Departemen Kesehatan RI. Laporan Hasil Investigasi KLB Diare di Kabupaten Nabire dan Kabupaten Paniai. 2008.
6. Suharyono. Diare Akut. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1991.
7. Lesmana M. *Vibrio & Campylobacter*. Jakarta: Universitas Trisakti. 2003. p .4 – 23.
8. Jawetz, Melnick, Adelberg. Mikrobiologi Kedokteran. Buku Kedokteran EGC. Jakarta; 2005.p.274 - 6.
9. Chaudhuri K, Chatterjee SN. Cholerae Toxin. Germany: Springer; 2009.
10. Rocka Polka. Pewarnaan Gram *Vibrio cholerae*. 2011 (Cited 2011 Apr 11). Available from: <http://panjil102.blogspot.com/2009/11/pewarnaan-gram.html>. 21 April 2012.
11. Lindmark Barbro. Modulators of *Vibrio cholerae* Predator interaction and Virulence. Sweden: Department of Molecular Biology Umea University; 2009.
12. Kaper JB, Morris JG, Levine MM. Cholera. Clinical Microbiology Reviews. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1):48.
13. Ganguly NK, Kaur T. Mechanism of action of cholera toxin & other toxins. Indian J Med Res. 1996; 104(1): 28-37.
14. R.-G. Zhang, D. L. Scott, M. L. Westbrook, S. Nance, B. D. Spangler, G. G. Shipley and E. M. Westbrook. The Three-Dimensional Crystal Structure of Cholera Toxin. *Journal of Molecular Biology.* 1992; 251(1): 563-573.

27. Welch RA. RTX toxin structure and function: A story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2001; 257(1): 85–111.
28. Fullner KJ, Mekalanos JJ. In vivo covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin. *Embo J*. 2001; 19(20): 5315–23.
29. Steele-Mortimer O, Knodler LA, Finlay BB. Poisons, ruffles and rockets: Bacterial pathogens and the host cell cytoskeleton. *Traffic*. 2000; 1(2): 107–18.
30. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003; 112(4): 453–65.
31. Cryz SJ, Jr., Kaper JB, Tacket C, Nataro J, Levine MM. *Vibrio cholerae* CVD103-HgR live oral attenuated vaccine: Construction, safety, immunogenicity, excretion and non-target effects. *Dev Biol Stand*. 1995. 84(1): 237–44.
32. Tikoo A, Singh DV, Shukla BN, Sanyal SC. Development of an improved synthetic medium for a better production of the new cholera toxin and its immunological relationship with the toxin produced by *Vibrio cholerae* ●139 strains. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1996; 14(2-3): 67–72.
33. Nishibuchi M, Fasano A, Russell RG, Kaper JB. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin. *Infect Immun*. 1992; 60(9): 3539–45.
34. Nishibuchi M, Kaper JB. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: A virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect Immun*. 1995; 63(6): 2093–99.
35. Terai A, Baba K, Shirai H, Yoshida ●, Takeda Y, Nishibuchi M. Evidence for insertion sequence-mediated spread of the thermostable direct hemolysin gene among *Vibrio* species. *J Bacteriol*. 1991; 173(16): 5036–46.
36. Hoge CW, Sethabutr O, Bodhidatta L, Echeverria P, Robertson DC, Morris JG Jr. Use of a synthetic oligonucleotide probe to detect strains of non-serovar O1 *Vibrio cholerae* carrying the gene for heat-stable enterotoxin (NAG-ST). *J Clin Microbiol*. 1990; 28(6): 1473–76.
37. Takeda T, Peina Y, ●gawa A, Dohi S, Abe H, Nair GB, Pal SC. Detection of heat-stable enterotoxin in a cholera toxin gene-positive strain of *Vibrio cholerae* O1. *FEMS Microbiol Lett*. 1991; 64(1): 23–27.
38. Walia K, Ghosh S, Singh H, Nair GB, Ghosh A et al. Purification and characterization of novel toxin produced by *Vibrio cholerae* O1. *Infect Immun*. 1999; 67(10): 5215–22.

39. Bhattacharyya S, Shant J, Ganguly NK, Majumdar S, Ghosh S. A potential epidemic factor from the bacteria, *Vibrio cholerae* WO7. *Curr Microbiol.* 2008; 56(1): 98–103.
40. World Health Organization. Cholera: global surveillance summary, 2008. 2009; 84(31): 309-24.
41. Marlina, Almasdy D, Aufa I. Deteksi Gen ctx pada Bakteri *Vibrio cholerae* Isolat Limbah Cair Rumah Sakit dan Uji Resistensinya Terhadap Beberapa Antibiotik. *Kumpulan Abstrak Penelitian Fakultas Farmasi Universitas Andalas.* 2007; 1(1): 1-7.
42. Nishibori T, Cores G, Rahardjo D, Wasito EB, Ismoedijanto, et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Vibrio cholerae* Clinically Isolated in Surabaya. *Indonesia. J Infect Dis.* 2011; 64(1): 7-12.
43. Davy VB, Horvath C, Marc JS. *Vibrio cholerae*: Cholera toxin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2007; 39(10): 1771–5.
44. Lesmana M. Perkembangan mutakhir infeksi kolera. *J Kedokteran Trisakti.* 2004; 23(3): 101-9.
45. Balakrish N, Firdausi Q, Holmgren J, Svennerholm AM, Ashrafus S, et al. Cholera Due to Altered El Tor Strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J Clinical Microbiology.* 2006; 44(14): 4211-3.
46. Simanjuntak CH, Larasati W, Arjoso W, Putri M, Lesmana M, et al. Cholera in Indonesia in 1993-1999. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 65(6): 788–97.
47. Lesmana M. *Vibrio cholerae* O1, Viable but Nonculturable. *J Kedokteran Trisakti.* 2002; 21(3): 111-7.
48. Agtini MD, Soeharno R, Lesmana L, Punjabi NH, Simanjuntak CH, et al. The burden of diarrhoea, shigellosis, and cholera in North Jakarta. *Indonesia: findings from 24 months surveillance. BMC Infectious Diseases.* 2005; 5(1): 89.
49. Shamini S, Ravichandran M, Sinnott JT, Somboonwit C, Sidhu HS, et al. Structural inferences for Cholera toxin mutations in *Vibrio cholerae*. *Biomedicals Informatics,* 2011; 6(1): 1-9.
50. Peterson KM. Expression of *Vibrio cholerae* Virulence Genes in Response to Environmental Signals. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2002; 3(1): 29-38.

Lampiran 1. Lokasi pengambilan sampel pada saat KLB diare di Bogor



(diambil dari laporan hasil pemeriksaan sampel KLB diare di Bogor tahun 2009 di
Laboratorium Bakteriologi Badan Litbangkes.

Lampiran 2. Hasil isolasi *Vibrio cholerae* pada KLB diare tahun 2009

No.	Daerah pengambilan	Jumlah	Jumlah Positif <i>Vibrio cholerae</i>
A.	Sampel Penderita Diare		
1.	Sukagalih	3	2
2.	Sukamanah	8	6
3.	Sukakarya	13	11
4.	Neglasari	4	2
5.	Megamendung	2	1
6.	Kopo	2	1
7.	Pesanggrahan	1	1
8.	Cilember	2	1
9.	Sinargalih	2	1
A.	Sampel Lingkungan		
1.	Cipayung	1	1
2.	Kopo	2	1
3.	Sukamanah	5	3
	Total	45	31

Lampiran 3. Sumber asal sampel yang menghasilkan kultur positif *Vibrio cholerae*

NO	Kode Sampel	Asal Sampel	ASAL
1	2009.CS.01	Penderita diare	Sukagalih
2	2009.CS.02	Penderita diare	Sukagalih
3	2009.CS.03	Penderita diare	Sukamanah
4	2009.CS.04	Penderita diare	Sukamanah
5	2009.CS.05	Penderita diare	Sukamanah
6	2009.CS.06	Penderita diare	Sukamanah
7	2009.CS.07	Penderita diare	Sukamanah
8	2009.CS.08	Penderita diare	Sukamanah
9	2009.CS.09	Penderita diare	Sukakarya
10	2009.CS.010	Penderita diare	Sukakarya
11	2009.CS.011	Penderita diare	Sukakarya
12	2009.CS.012	Penderita diare	Sukakarya
13	2009.CS.013	Penderita diare	Sukakarya
14	2009.CS.014	Penderita diare	Sukakarya
15	2009.CS.015	Penderita diare	Sukakarya
16	2009.CS.016	Penderita diare	Sukakarya
17	2009.CS.017	Penderita diare	Sukakarya
18	2009.CS.018	Penderita diare	Sukakarya
19	2009.CS.019	Penderita diare	Sukakarya
20	2009.CS.020	Penderita diare	Neglasari
21	2009.CS.021	Penderita diare	Neglasari
22	2009.CS.022	Penderita diare	Megamendung
23	2009.CS.023	Penderita diare	Kopo
24	2009.CS.024	Penderita diare	Pesangrahan
25	2009.CS.025	Penderita diare	Cilember
26	2009.CS.026	Penderita diare	Sinargalih
27	2009.CS.027	Sungai	Cipayung
28	2009.CS.028	Sumur	Kopo
29	2009.CS.029	Sungai	Mangunjaya
30	2009.CS.030	Sumur	Mangunjaya
31	2009.CS.031	Tempayan	Mangunjaya

PERSETUJUAN ATASAN YANG BERWENANG

Menyetujui,
Kepala Bidang Biomedis

dr. Roselinda. M.Epid.
NIP. 195807011987012001

Jakarta, Januari 2013
Ketua Pelaksana

drh. Khariri. M.Biomed.
NIP. 19820222 200812 1004

DISETUJUI,

Ketua
Panitia Pembina Ilmiah

Dr. drg. Magdarina Destri A. MSc.
NIP. 19520427 198107 2001

Kepala
Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar
Kesehatan

Drs. Ondri Dwi Sampurno,MSi. Apt
NIP. 19621119 198803 1001



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881770
Fax (021) 42881754

Lampiran 1
Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar
Kesehatan
Nomor : HK.03.05/III/750/2012
Tanggal : 6 Februari 2012

SUSUNAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

PERBANDINGAN KARAKTERISTIK GEN CTX ISOLAT *Vibrio Cholerae*
PENDERITA DIARE DAN ISOLAT LINGKUNGAN PADA PADA KLB BOGOR

1. drh. Khariri : Peneliti Non Fungsional/Ketua Pelaksana
2. Fauzul Muna, S.Si : Peneliti Non Fungsional
3. Kartika Dewi Puspa, S.Si : Pembantu Peneliti
4. Melatiwati, AMAK : Pembantu Peneliti
5. Yudi Hartoyo : Sekretariat Penelitian

Kepala,

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP 19621119 198803 100 1



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881761
Fax (021) 42881754

Lampiran 2
Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi
Dasar Kesehatan

Nomor : HK.03.05/III/750/2012
Tanggal : 6 Februari 2012

JUDUL PENELITIAN : PERBANDINGAN KARAKTERISTIK GEN CTX ISOLAT *Vibrio Cholerae*
PENDERITA DIARE DAN ISOLAT LINGKUNGAN PADA PADA KLB
BOGOR

JUMLAH HONOR TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

- | | | | |
|----------------------------|--|-----|---------|
| 1. Peneliti Non Fungsional | : Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu sebesar | =Rp | 30.000 |
| 2. Pembantu Peneliti | : Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu sebesar | =Rp | 20.000 |
| 3. Sekretariat Penelitian | : Jumlah honor yang diterima setiap bulan sebesar | =Rp | 300.000 |



Kepala,
Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP 19621119 198803 100 1



KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226
Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933
E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id, Website: <http://www.litbang.depkes.go.id>

PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL APPROVAL)

Nomor : KE.01.05 /EC/ 401 /2012

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

"Karakterisasi Gen CTX Isolat Vibrio cholerae dari Penderita dan Sumber Air Minum KLB Diare di Bogor tahun 2009"

yang mengikutsertakan manusia sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana / Peneliti Utama :

drh. Khariri

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 21 Mei 2012

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,

Prof. Dr. M. Sudomo