

PREVALENSI GEN *estA2-4* PADA ISOLAT KLINIS *Escherichia coli* DI INSTALASI MIKROBIOLOGI KLINIK RSUP SANGLAH

Setiawan YHL¹, Fatmawati NND²

¹ Mahasiswa Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana

² Bagian Mikrobiologi Klinik, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran
Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia

Koresponden : Setiawan YHL

yosuahendrata@gmail.com

ABSTRAK

Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) merupakan bakteri yang sering mengakibatkan diare pada wisatawan. Salah satu gen penghasil toksin pada ETEC adalah *estA2-4* pada ETEC. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui prevalensi gen *estA2-4* pada isolat klinis *E.coli* di Instalasi Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah. Penelitian ini menggunakan *convenient purposive sampling* dengan memakai 25 isolat klinis dari pasien diare terduga akibat infeksi *E.coli* periode 2014-2015 di RSUP Sanglah yang memenuhi kriteria inklusi. Beberapa tahap penelitian ini yaitu merejuvenasi *E.coli*, mengisolasi DNA *E.coli* dengan teknik *boiling*, melakukan *Uniplex PCR* terhadap kontrol dan sampel, elektroforesis hasil PCR, dan dokumentasi hasil PCR. PCR dilakukan dengan program suhu pre-denaturasi 95°C (3 menit), suhu denaturasi 95°C (1 menit), suhu annealing 55°C (1 menit), suhu ekstensi 72°C (1 menit) dan suhu final ekstensi 72°C (5 menit) dan resep Mix PCR yaitu 5 µl Master Mix Kapa Biosystems (ROCHE), Primer *Forward* 0,8 µl, Primer *Reverse* 0,8 µl, RNase free water 2,2 µl dan DNA 1,2 µl. Hasil *uniplex PCR* menunjukkan bahwa ditemukan 3 dari 25 sampel mengandung gen *estA2-4*. Penelitian ini dapat dijadikan dasar untuk studi lanjutan terhadap diare akibat ETEC.

Kata Kunci: *E.coli*, *estA2-4*, ETEC, *uniplex PCR*, Bali

ABSTRACT

Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) is a bacterium that often cause diarrhea in travelers. One of the toxin-producing genes in ETEC is *estA2-4*. This study was aimed to determine prevalence of *estA2-4* in *Escherichia coli* clinical isolates at Sanglah Hospital Clinical Microbiology Laboratory. This study used *convenient purposive sampling*. These samples were twenty five clinical isolates from patients with diarrhea which suspected to be infected by *E.coli* in the 2014-2015. Several stages of this research were rejuvenation of *E.coli*, DNA isolation of *E.coli* using *boiling* technique, performing *uniplex PCR* to the control and samples, electrophoresis of PCR results and documentation of PCR results. PCR program were pre-denaturation temperature 95°C (3 minutes), denaturation temperature 95°C (1 minute), annealing temperature 55°C (1 minute), extension temperature 72°C (1 minute) and final

extension temperature 72°C (5 minutes) and Mix PCR recipes as 5 mL Master Mix Kapa Biosystems (ROCHE), 0.8 mL Forward Primer, 0.8 mL Reverse Primer, 2.2 mL RNase-free water and 1.2 mL DNA. The results of Uniplex PCR shown that three of 25 samples contained the estA2-4 gene. This research can be used as a basis for further study of the diarrhea caused by ETEC.

Keywords: *E.coli*, estA2-4, ETEC, uniplex PCR, Bali

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi gastrointestinal yang mengakibatkan diare masih menjadi masalah global yang serius. Diare akut adalah salah satu masalah kesehatan masyarakat yang memiliki morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Di Cina, insiden diare akut adalah 55,9/100.000 dan 700.000 kasus diare dilaporkan terjadi setiap tahunnya dan berada di peringkat 3 dari 38 di antara penyakit infeksi serius.¹ Diperkirakan 2 miliar hingga 4 miliar diare akibat infeksi terjadi setiap tahunnya dan menyebabkan kematian pada 3 juta hingga 5 juta kematian di seluruh dunia dengan insiden dan case fatality rates tertinggi pada balita.²

Diperkirakan setengah dari kasus diare di dunia disebabkan karena bakteri yang memproduksi enterotoxin dengan *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) sebagai penyebab infeksi yang terbanyak.² Bakteri ETEC menyebabkan ratusan juta kasus setiap tahunnya terutama di negara berkembang dan menyebabkan 300.000-500.000 kematian setiap tahunnya. Bakteri ini sering menginfeksi wisatawan dan juga merupakan patogen diare yang sering menginfeksi personil militer yang dikirim ke daerah endemik. Organisme ini juga berkontribusi secara substansial terhadap keterlambatan pertumbuhan dan malnutrisi akibat infeksi diare yang berulang.³ Data lain menyatakan bahwa ETEC merupakan penyebab umum diare di negara berkembang, yaitu hingga 1 miliar kasus dimana 300-400 juta terjadi pada balita.² Diare juga merupakan masalah di Indonesia, karena morbiditas dan mortalitasnya masih tinggi.⁴ Salah satu daerah yang sering menjadi tempat tujuan wisatawan domestik ataupun mancanegara adalah kota Denpasar, Bali. Berdasarkan beragamnya wisatawan yang mengunjungi daerah ini, penulis beranggapan bahwa pengetahuan mengenai ETEC pada populasi ini akan menghasilkan data yang berguna secara klinis kedepannya. Penelitian oleh Subekti dkk. di Denpasar pada tahun 2001 terdapat ETEC yang terisolasi pada 14,9% rectal swabs pasien, dengan tipe toksin yang terbanyak adalah ST dengan jumlah 69,9%.⁵ Penelitian

terakhir pada tahun 2015 mengenai ETEC pada rectal swab penjamah makanan dengan menggunakan teknik deteksi molekuler dengan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR), ditemukan 2 dari 34 spesimen mengandung gen estA2-4.⁶ Berdasarkan uraian diatas peneliti ingin mengetahui prevalensi estA2-4 sebagai pengkode toksin ST tipe STh dari isolat klinis *E.coli* periode 2014-2015 di RSUP Sanglah.

BAHAN DAN METODE

Rancangan penelitian ini adalah *laboratory explorative*. Penelitian ini dilaksanakan pada Mei 2016 hingga Oktober 2016 di Laboratorium Mikrobiologi PSPD FK UNUD. Teknik penentuan sampel dengan cara *convenient purposive sampling* dan didapatkan sebanyak 25 sampel yang telah melebihi jumlah sampel minimal. Kriteria inklusi sampel yaitu Isolat *E.coli* yang terisolasi dari spesimen feses pasien periode 2014-2015 yang tersimpan dalam stok -80°C RSUP Sanglah Denpasar dan tiap isolat berasal dari satu pasien.

Proses penelitian ini dimulai dari persiapan proposal penelitian, proses penelitian dengan tahapan merejuvenasi *E.coli*, mengisolasi DNA *E.coli* menggunakan teknik *boiling*, melakukan Uniplex PCR terhadap kontrol dan sampel, elektroforesis hasil PCR, dokumentasi hasil PCR dan penulisan laporan. Isolasi DNA *E.coli* diawali dengan menginkubasi tabung *microcentrifuge* yang berisi sampel dalam 200µl TE *buffer* pada *waterbath* dengan suhu 100°C selama 10 menit, selanjutnya didinginkan pada *icebath* selama 1-3 menit. Setelah dingin, dilakukan sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Supernatan yang mengandung DNA kemudian diambil untuk dilakukan proses *uniplex* PCR. Gen target pada PCR adalah estA2-4 dengan ukuran pita 120 bp pada elektroforesis. dengan primer *forward* 5'-TTCACCTTCCCTCAGGA TG-3' dan *reverse* 5'-CTATTCATGCTTTCAGG ACCA-3'.⁷ Resep Mix PCR yang digunakan yaitu 5 µl Master Mix Kapa Biosystems (ROCHE), 0.8 µl Primer *Forward*, 0.8 µl Primer *Reverse*, 2.2 µl RNase free water dan 1.2 µl DNA dan PCR dilakukan

dengan program suhu pre-denaturasi 95°C (3 menit), denaturasi suhu denaturasi 95°C (1 menit), suhu annealing 55°C (1 menit), suhu ekstensi 72°C (1 menit) dan suhu final ekstensi 72°C (5 menit). Setelah proses PCR selesai, selanjutnya dilakukan proses elektroforesis dengan gel agarosa 1,5% dan kemudian dilakukan dokumentasi hasil elektroforesis. Penelitian ini telah mendapatkan kelaikan etik dengan nomor: 687/UN.14.2/Litbang/2016.

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan 25 stok isolat *Escherichia coli* yang didapatkan dari spesimen klinis di RSUP Sanglah Denpasar periode tahun 2014-2015. Identifikasi gen estA2-4 dengan menggunakan metode PCR dilakukan pada 25 sampel tersebut. Adapun langkah-langkah yang dikerjakan terdiri dari membuat isolasi DNA sampel, primer kerja 10 µM 50ml, membuat mix PCR dengan volume akhir sebesar 10 µl, melakukan *uniplex* PCR, membuat campuran gel agarosa, elektroforesis dan dokumentasi hasil elektroforesis.

Pada pengujian 25 sampel, gen estA2-4 dinyatakan positif apabila ditemukan pita spesifik 120 bp (seperti pada gambar 1 Kontrol positif dan sampel positif) dan dinyatakan negatif apabila tidak ditemukan adanya pita spesifik 120 bp (seperti pada gambar 1 kontrol negatif dan sampel negatif) pada hasil elektroforesis.

Identifikasi PCR terhadap 25 sampel didapatkan 3 sampel (L26, L62 II/16 dan L137) mengandung gen estA2-4.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis yang dilakukan pada gel agarosa 1,5% dengan gambaran Marker (M), Kontrol Positif (K+), Kontrol Negatif (K-), Sampel Positif (S+), Sampel Negatif (S-)

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, dari identifikasi PCR terhadap 25 sampel didapatkan 3 sampel mengandung gen estA2-4, sehingga prevalensi dari gen estA2-4 pada isolat klinis *E.coli* di Instalasi Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah periode tahun 2014-2015 adalah 12%. Prevalensi ini adalah dua kali lipat apabila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya oleh Gitaswari, dimana proporsi pada rectal swab penjamah makanan dengan menggunakan teknik deteksi molekuler dengan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR), ditemukan 5,88% (2 dari 34 spesimen) mengandung gen estA2-4. Perbedaan ini disebabkan oleh perbedaan dari sumber isolat diperoleh dimana dalam penelitian oleh Gitaswari, sampel diperoleh dari penjamah makanan yang merupakan karier yang tidak menunjukkan manifestasi klinis, sedangkan dalam penelitian ini sampel diperoleh dari pasien diare yang telah mengalami manifestasi klinis.⁶

SIMPULAN

Pada penelitian ini dilakukan identifikasi gen estA2-4 memakai 25 isolat klinis dari pasien diare terduga akibat infeksi *E.coli* periode 2014-2015 di RSUP Sanglah. Dari identifikasi yang dilakukan didapatkan prevalensi gen estA2-4 dari isolat klinis *E.coli* di Instalasi Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah adalah 12% (3 dari 25 sampel). Adapun kelemahan dari penelitian ini adalah jenis gen yang diidentifikasi pada penelitian ini masih terbatas pada gen estA2-4 sebagai pengkode toksin ST tipe STh.

SARAN

Data-data yang didapat dalam penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar untuk penelitian lanjutan dalam mendeteksi gen lain pada ETEC seperti elt sebagai pengkode toksin tipe LT dan estA1 sebagai pengkode toksin tipe STp, sehingga selanjutnya data mengenai prevalensi seluruh gen penghasil toksin pada ETEC dapat diperoleh.

DAFTAR PUSTAKA

1. Zhang Y, Zhao Y, Ding K, Wang X, Chen X, Liu Y, Chen Y. Analysis of bacterial pathogen causing acute diarrhea on the basis of sentinel surveillance in Shanghai, China, 2006-2011. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67:264-268.
2. Sanchez J, Holmgren J. Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in

- cholera and ETEC diarrhea. *Current Opinion in Immunology*. 2005;17(4):388-398.
3. Fleckenstein JM, Harwidge PR, Munson GP. Molecular mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes and Infection*. 2010;12(2):89-98.
 4. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Situasi Diare di Indonesia. Jakarta, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2011. Tersedia di: <http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/buletin/buletin-diare.pdf>. [diunduh: 11 Oktober 2015]
 5. Subekti DS1, Lesmana M, Tjaniadi P, Machpud N, Sriwati, Sukarma, Daniel JC, Alexander WK, Campbell JR, Corwin AL, Beecham HJ 3rd, Simanjuntak C, Oyofa BA. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in hospitalized acute diarrhea patients in Denpasar, Bali, Indonesia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2003;47(2):399-405.
 6. Gitaswari DAI. Identifikasi Subtipe Enterotoxigenic *Escherichia coli* dan Enteroaggregative *Escherichia coli* dari Spesimen Usap Dubur Penjamah Makanan di Denpasar Menggunakan Polymerase Chain Reaction. Fakultas Kedokteran. Universitas Udayana. 2015.
 7. Tobias, J., Vutukuru, S. Simple and rapid multiplex PCR for identification of the main human diarrheagenic *Escherichia coli*. *Microbiological Research*. 2012;167(9): 564-570.