

Uji Diagnostik Cepat Sebagai Metode Alternatif Diagnosis Kholera yang Disebabkan oleh Agen *Vibrio Cholera*

Kambang Sariadji, Sunarno, Rudi Hendro Putranto

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Balitbangkes, Kemenkes RI
kambang_sar@yahoo.com

Abstract

Cholera is one of health problems in Indonesia. The high fatality rate is caused by the enterotoxin. The symptoms are dehydration, electrolyte loss and increased blood acidity, so that in severe case can cause death. Diarrheal disease cholera can lead to an out break. Conventional techniques such as culture, isolation and identification are the gold standard to diagnose *V.cholerae*, but required considerable time and adequate equipment. thus rapid diagnostic test plays an important role to detect *V.cholerae*.. The use of rapid diagnostic test can be need as the initial examination, so that preventive actions can be conducted . Rapid diagnostic tests are performed by various methods such can be used directly in the field and the results can be identified quickly, so it can replace the conventional techniques. The advantages of rapid test are quick, easy, inexpensive, practice ; thus it can be used in the field. Rapid test has a sensitivity of 94-100% and a specificity of 84-100% when compared with the conventional technique.

Key words : *Vibrio cholerae*, *Diarhoeae*, *Rapid diagnostic test*

Abstrak

Kholera merupakan penyakit yang masih menjadi masalah kesehatan di Indonesia. Penyebabnya adalah enterotoksin yang dihasilkan oleh bakteri *Vibrio cholerae* . Gejala yang ditimbulkannya menyebabkan dehidrasi, kehilangan elektrolit dan meningkatnya keasaman darah, sehingga pada kasus yang berat dapat menimbulkan kematian. Penyakit diare kholera ini dapat menimbulkan kejadian luar biasa (*out break*) dan menyebar ke daerah sekitarnya. Mengingat standar baku diagnosis bakteri *V.cholerae* dengan menggunakan tehnik konvensional (kultur, isolasi dan identifikasi) memerlukan waktu yang cukup lama dan peralatan yang memadai, maka penggunaan rapid test diagnostik untuk deteksi bakteri *V.cholerae* sangat berperan pada kasus kejadian luar biasa kholera. Penggunaan rapid diagnostik test ini dapat menjadi pemeriksaan awal di lapangan, sehingga tindakan yang bersifat preventif dapat segera dilakukan. Uji diagnostik cepat yang dilakukan dengan berbagai metode dapat dipakai langsung di lapangan dan hasilnya dapat diketahui dengan cepat , sehingga dapat menjadi tehnik awal pengganti teknik konvensional. Kelebihan dari uji cepat ini adalah cepat, mudah, murah dan dapat dilakukan di tempat. Uji cepat t ini mempunyai sensitifitas antara 94 – 100 % dan spesifitasnya antara 84 – 100 % jika dibandingkan dengan teknik yang dilakukan secara konvensional .

Kata kunci : *Vibrio cholerae*, Diare, Uji diagnostik Cepat

Pendahuluan

Diare adalah buang air besar (defekasi) dengan tinja berbentuk cair atau setengah padat karena kandungan air pada tinja lebih banyak dari biasanya. Menurut WHO (World Health Organization), diare adalah buang air besar encer dan cair lebih dari tiga kali sehari, sementara diare akut adalah diare yang awalnya mendadak dan berlangsung singkat dalam beberapa jam atau hari.¹

Diare akut karena infeksi dapat disebabkan oleh infeksi bakteri, parasit, dan virus, namun infeksi yang sering terjadi biasanya disebabkan karena bakteri. Diare yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae* (disebut dengan kholera) merupakan salah satu penyakit oleh karena enterotoksin yang dihasilkannya dan membentuk koloni di dalam usus kecil. Gejala – gejala yang ditimbulkannya meliputi muntah, berak seperti air 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 bila tidak diobati akan menyebabkan kematian.^{1,2,3}

Angka kejadian kasus kholera yang tinggi umumnya terjadi di negara – negara yang sedang berkembang dikarenakan karena belum baiknya higiene, sanitasi serta penyediaan air minum yang memadai. *Vibrio cholerae* banyak ditemui di permukaan air yang terkontaminasi dengan tinja yang mengandung kuman tersebut, sehingga air memegang peran utama dalam terjadinya wabah penularan di daerah pedesaan tempat kholera berjangkit secara endemik³. Penyakit kholera dapat menjadi epidemi atau kejadian luar biasa yang menimpa masyarakat suatu daerah yang melebihi perkiraan. Menurut Departemen

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.⁴

Tahun 2003 WHO menerima laporan 11.575 kasus kejadian kholera dari 45 negara dan 1.894 dilaporkan meninggal . Mayoritas kasus cholera tersebut terjadi di sebagian besar negara Afrika .¹ Indonesia tercatat angka kejadian luar biasa cholera dari tahun 1993 – 1998 sebanyak 9 % disebabkan oleh bakteri *V.cholerae* O1. Dari 7 provinsi angka kejadian cholerae yang tertinggi adalah daerah Bandung, Garut dan Timika.⁵ Sementara pada bulan Juni 2005 menurut Dirjen P2PL Dep-Kes terdapat Kejadian Luar Biasa Cholera di daerah Tangerang yang memakan korban 20 orang dari 362 kasus.⁶ Data terakhir kejadian luar biasa cholera terjadi di Papua Timika yang menewaskan hampir 108 orang antara bulan April sampai Agustus 2008.⁷

Saat ini diagnosis yang dilakukan untuk pemeriksaan *V.cholerae* masih dilakukan secara konvensional yang memerlukan waktu yang cukup lama dan memerlukan fasilitas laboratorium yang memadai. Masih seringnya kejadian luar biasa kholera pada tiap tahunnya, menyebabkan penanganan kasus kejadian luar biasa kholera harus dilakukan secepat mungkin untuk mendapatkan tindakan pengobatan dan pencegahan agar tidak menyebar meluas ke daerah-daerah sekitarnya. Untuk itu perlu suatu cara diagnosis laboratorium penunjang yang cepat dengan menggunakan uji diagnostik cepat yang hasilnya dapat diketahui dalam beberapa menit dan tidak perlu memerlukan banyak peralatan, serta biaya yang dikeluarkan menjadi lebih murah.

Metode

Penelusuran literatur dilakukan melalui pencarian informasi ilmiah terkait dengan uji diagnostik cepat *Vibrio cholerae*, epidemiologi dan beberapa kasus kejadian luar biasa kholera di beberapa tempat antara tahun 1991 – 2009. Hasil penelusuran literatur dilakukan analisa secara deskriptif .

Hasil

Dari pencarian literatur berupa buku dan jurnal melalui kepustakaan didapatkan terbitan antara tahun 1991 – 2009 yang terdiri dari 6 buku yang membahas secara mendalam tentang karakteristik *Vibrio cholerae* , patogenesis dan diagnosis konvensional laboratorium, kemudian ada 8 jurnal internasional yang membahas kejadian luar biasa, epidemiologi, diagnostik cepat *Vibrio cholerae* sebagai alternatif diagnosis laboratorium serta ada 2 publikasi laporan kasus kejadian luar biasa kholera ^{6,7} .

Pembahasan

Vibrio Cholerae

Morfologi dari *Vibrio* dapat dideskripsikan sebagai berikut: bakteri batang bengkok seperti koma berukuran (0,5 µm x 1,5 – 3,0 µm), Gram negatif, tidak berspora, hidup secara aerob atau anaerob fakultatif, bergerak melalui flagel yang monotrik, tidak membentuk spora, pada biakan tua dapat menjadi berbentuk batang lurus. Suhu optimum untuk pertumbuhan untuk *V. 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. *V. cholera* tumbuh baik pada agar *thio sulfat citrate bile sucrose* (TCBS), yang menghasilkan koloni berwarna kuning. ^{3,8}

Salah satu ciri khas dari *V. cholera* ini adalah dapat tumbuh pada pH yang

sangat tinggi (8.5 – 9.5) dan sangat cepat mati oleh keadaan asam. Pertumbuhan sangat baik pada pH 7,0. Pada pembiakan dengan media yang mengandung karbohidrat yang dapat difermentasi, *V. cholerae* akan cepat mati. *V. cholera* meragi sukrosa dan manosa tanpa menghasilkan gas tetapi tidak meragi arabinosa. Kuman ini juga dapat meragi nitrit. Ciri khas lain yang membedakan dari bakteri enterik Gram negatif lainnya yang tumbuh pada agar darah adalah pada test oksidasi hasilnya positif. Biakan *V. cholera* pada air peptone alkali, setelah pada suhu ruangan selama 6 jam akan tampak pertumbuhan kuman pada perbatasan udara dan cairan. Medium air peptone alkali ini berfungsi sebagai medium transpor yang penting untuk tinja atau usapan dubur dari tersangka kasus kholera . ^{8,9}

V.cholerae adalah salah satu spesies dari family Vibrionaceae dengan genus *Vibrio*. Adapun pembagian *V.cholerae* adalah sebagai berikut :¹⁰
Pembagian *V. cholerae* :

1. *V. cholerae* O1
 - a.Biotipe : El Tor , Klasik
 - b.Serotipe: Ogawa, Inaba, Hikojima
2. *V. cholerae* non-O1
3. *V. cholerae* O139

Patogenesis *Vibrio Cholerae*

Kholera adalah suatu penyakit yang masa inkubasinya berlangsung selama 1 sampai 3 hari dengan gejala dan gangguan metabolik yang menyebabkan hilangnya cairan dan elektrolit dalam waktu singkat. Dengan penggantian cairan yang hilang, maka pemulihan fisiologis terjadi dengan cepat walaupun diare masih berlangsung. Meningkatnya sekresi elektrolit disebabkan oleh suatu protein toksin kholera (enterotoksin). Toksin ini merangsang meningkatnya kegiatan adenil siklase di dalam sel-sel lendir usus. Hal tersebut menyebabkan naiknya adenosine

monofosfat siklik yang menyebabkan sekresi elektrolit ke dalam rongga usus.³

Terjadinya muntah dan buang air besar yang sangat sering menjadikan penderita akan banyak kehilangan cairan dan elektrolit yang dapat menyebabkan proses kematian dalam waktu 12 jam dari permulaan penyakitnya. Angka kematian kholera berkisar antara 5 – 75 %, angka kematian yang tinggi disebabkan terutama karena pertolongan yang terlambat.^{1,8,10}

Diagnosis Konvensional *Vibrio Cholerae*

Diagnosis untuk menentukan *V.cholerae* dilakukan dengan isolasi (biakan). Isolasi dilakukan dengan 2 cara yakni cara langsung menanam bahan (*rectal swab*, tinja, muntahan) ke lempeng agar *thiosulfat citrate bile salts sucrose* (TCBS), dan cara tidak langsung yakni bahan (*rectal swab*, tinja, muntahan) ditanam terlebih dahulu di media perbenihan *alkaline peptone water* (APW) dan diinkubasi selama 18 – 20 jam pada suhu 37° C. Dari media perbenihan APW dapat dilakukan subkultur ke media TCBS.^{8,10}. Untuk identifikasi dapat dilakukan dengan melakukan serangkaian test biokimia seperti oksidase, pertumbuhan dengan NaCl, *Kliger Iron Agar* (KIA), *Motility Indole Ornithine* (MIO), *Sucrose Semi Solid* (SSS), lysine, arginine, ornithine, maltose, arabinose . Kemudian dilanjutkan dengan uji serologis untuk konfirmasi isolat yang diidentifikasi sebagai *V. cholerae* dengan cara reaksi aglutinasi antigen somatik (antigen O), antiserum spesifik *V. cholerae* O1 (polivalen, monovalen ogawa dan inaba) .¹⁰

Kelebihan dalam melaksanakan diagnosis konvensional adalah dengan melakukan kultur yang tingkat sensitivitasnya tinggi (1-10 CF u/mL) sehingga dapat dijadikan *gold tandard* dalam penentuan diare yang disebabkan oleh *V.cholerae*.

Sedangkan kekurangannya adalah memerlukan waktu beberapa hari agar sampel sampai ke laboratorium. Selain itu proses identifikasinya memerlukan waktu 2 – 3 hari dilakukan oleh tenaga laboratorium yang terlatih, dan umumnya pada kasus kejadian luar biasa fasilitas mikrobiologi tidak tersedia.¹²

Uji Diagnostik Cepat *Vibrio Cholerae*

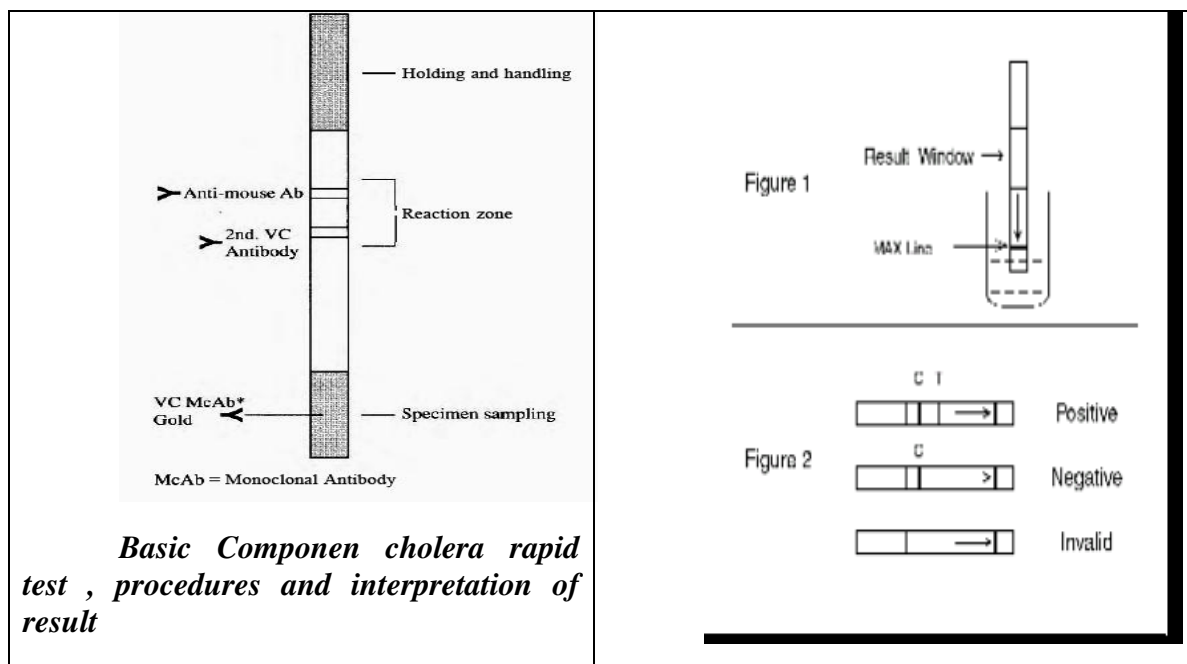
Uji diagnostik cepat dilakukan dikarenakan keterbatasan peralatan minimal di lapangan sehingga diperlukan suatu metode yang praktis..Beberapa kelebihan pada diagnosis *V.cholerae* dengan menggunakan rapid diagnostik test adalah dapat dilakukan beberapa menit sampai beberapa jam, murah, dan tidak memerlukan tenaga ahli yang khusus untuk melakukannya.Kerugiannya adalah sensitivitasnya rendah bila dibandingkan dengan teknik kultur.^{13,14}

a. Uji Strip

Uji ini menggunakan metode *sandwich imunochromtography assay* . Strip ini menggunakan plastik strip yang dilapisi kertas membran berukuran 5mm X 80 mm. Pada daerah bawah strip tersebut merupakan area spesimen yang dilapisi dengan antibodi monoklonal yang diberi *gold*. Area ini digunakan sebagai sistem deteksi. Pada bagian tengah dari membran strip didesain sebagai zona reaksi antara antigen yang terdeteksi dengan tes kontrol. Sementara pada bagian atas dari strip digunakan sebagai pegangan dalam melakukan tes. Pada zona reaksi terdapat 2 pita, pada pita pertama dilapisi dengan antibodi *V.cholerae* dan pada pita kedua dilapisi dengan *anti mouse antibody*. Antibodi *V.cholerae* pada pita pertama akan mengikat *site* kompleks antigen *V.cholerae- Monoclonal antibody*, sedangkan *anti mouse antibody* akan mengikat *site monoclonal antibody*, sehingga terbentuk warna merah muda pada daerah pita.¹⁵

Pada spesimen berupa feses yang cair, *V.cholerae* dapat langsung dideteksi dengan sensitivitas 10^6 CFU/mL. Apabila sampel berupa *tipped-cotton swab*, *V.cholerae* dapat dideteksi dengan 10^6 CFU/mL, akan tetapi harus dilakukan perbanyakkan bakteri terlebih dahulu dengan menggunakan medium alkalis pepton water dan diinkubasi selama 4 – 6 jam. Uji ini dilakukan dengan cara

mencelupkan strip ke wadah yang berisi spesimen, kemudian interpretasi hasil dapat dilakukan selama 5 -15 menit. Hasil dengan terbentuknya 2 pita merah muda menunjukkan hasil positif *V.cholerae* dan bila terbentuk satu pita menunjukkan hasil yang negatif. Metode *strip test* ini mempunyai sensitivitas 94 – 100% dan spesivitasnya 84 – 100%^{14, 15,16}.



Gambar 1. Komponen Rapid Diagnostic Test¹⁵

b. Co-agglutination Test

Tes ini dilakukan dengan menggunakan antisera yang mengandung antibodi monoklonal yang langsung direaksikan dengan bahan sampel dengan menggunakan sediaan gelas. Tes ini juga menggunakan protein A dari bakteri *Staphylococcus aureus* (Cowan 1) yang dilapisi pada antibodi monoklonal. Antigen 3 (*V.cholerae*) akan bereaksi dengan reagen yang mengandung antibodi monoklonal sehingga terbentuk aglutinasi. Spesimen yang digunakan dapat berupa

swab tinja atau dengan menggunakan medium perbenihan terlebih dahulu yang diinkubasi 37 ° C selama 4-6 jam. Tes ini selain cepat , mudah dan dapat dilakukan di lapangan, tetapi mempunyai keterbatasan yakni jumlah minimal bakteri yang terdapat pada spesimen feses atau *rectal swab* yang telah dibuat suspensi adalah 10^6 CFU/mL. Dengan jumlah minimal bakteri *V.cholerae* 10^6 CFU/mL Uji diagnostik cepat akan menunjukkan reaksi positif, apabila jumlahnya kurang dari 10^6 CFU/mL maka sampel feses atau

rectal swab harus dilakukan perbanyak terlebih dahulu dengan medium APW. Metode *coagglutination test* ini mempunyai sensitifitas 97 % dan spesifitasnya 99%^{13,14,15,16,17}

c. *Dark Field Test*

Metode *dark field test* (mikroskop lapangan gelap) dilakukan untuk uji skrining feses untuk menentukan ada tidaknya *V.cholerae*. Spesimen feses bentuk cair dapat dilakukan pemeriksaan langsung dengan meneteskan spesimen pada gelas kaca dan ditutup dengan penutup gelas kaca dan dilihat dibawah mikroskop lapang gelap. Spesimen dapat juga dilakukan perbenihan dulu pada medium alkalis pepton water. Spesimen di bawah mikroskop lapang gelap akan tampak kuman *V.cholerae* yang menunjukkan gerak yang khas yang disebut "*darting motility*", terlebih bila jumlah organisme dalam tinja > 10⁵ per mL. Kuman akan tampak berhenti, tidak bergerak, bila ditambahkan antiserum spesifik. Metode *dark field test* ini mempunyai sensitivitas 90% dan spesivitas 96%¹⁷

d. Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Reaksi berantai polimerase atau lebih umum dikenal sebagai PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan suatu teknik atau metode perbanyak (replikasi) DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme. Dengan teknik ini, 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 rapid bakteri *V.cholerae*. Adanya bakteri *V.cholerae* dari sampel faeses atau rectal swab dapat dideteksi dengan metode PCR ini. Metode ini dilakukan dengan menggunakan primer spesifik dari gen *V.cholerae*. Metode PCR

test ini mempunyai sensitifitas 100% dan spesifitas 100%¹²

Kesimpulan

Kejadian luar biasa diare kholera di Indonesia masih akan terus terjadi mengingat Indonesia adalah negara yang berkembang. Infrastruktur, sanitasi dan higiene yang masih buruk menyebabkan angka kejadian diare kholera di beberapa daerah Indonesia masih harus diwaspadai. Mengingat standar baku diagnosis bakteri *V.cholerae* dengan menggunakan tehnik konvensional (kultur, isolasi dan identifikasi) memerlukan waktu yang cukup lama dan peralatan yang memadai, maka penggunaan uji diagnostik cepat untuk deteksi bakteri *V.cholerae* sangat berperan pada kasus kejadian luar biasa diare cholera. Penggunaan uji diagnostik cepat ini dapat menjadi pemeriksaan awal di lapangan karena sifatnya yang cepat, mudah, murah, sehingga tindakan yang bersifat preventif dapat segera dilakukan.

Saran

Pada keadaan kasus luar biasa kolera yang terjadi di daerah dengan kapasitas sarana dan prasarana laboratorium yang terbatas dan kurang memadai untuk melakukan pemeriksaan, penggunaan diagnosis cepat seperti strip tes, *co-agglutination test* dan *dark field test* menjadi suatu diagnosis pilihan yang patut dipertimbangkan

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada kawan-kawan Laboratorium Bakteriologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang telah membantu selama proses pencarian literatur penulisan.

Daftar Rujukan

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

2. Faruque SH, Albert MJ, Mekalanos. American Society for Microbiology: Epidemiology, and Ecology of Toxigenic *Vibrio Cholerae*, 1998.
3. Pelczar J.M . Dasar – Dasar Mikrobiologi . Universitas Indonesia. Jakarta. 2005.
4. Departemen Kesehatan R.I. Undang – Undang Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 2004.
5. Simanjuntak CH, Larasati W, Arjoso S, et al. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene :Cholera in Indonesia in 1993 - 1999”. NIHRD and NAMRU 2 , 2001
6. Pusat Komunikasi Publik Direktur Jenderal Pemberantasan Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Departemen Kesehatan RI. Jakarta. 2008.
7. Direktur Jenderal Pemberantasan Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Departemen Kesehatan RI. Laporan Hasil Investigasi KLB Diare di Kabupaten Nabire dan Kabupaten Paniai. 2008.
8. Jawetz, Melnick, and Adelberg. Mikrobiologi Kedokteran, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, 2004
9. Suharyono. Diare Akut. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 1991.
10. Lesmana M. *Vibrio & Campylobacter*. Universitas Trisakti. Jakarta. 2003.
11. University Sains Malaysia. Cholera DNA Rapid :Single Tube DNA Test for rapid *Vibrio cholerae* Detection. Kelantan , Malaysia, 2009
12. Islam M, Kabir, Tariqul I, Rakib A. Coagglutination: A Rapid and Sensitive Assay Method for Detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 serogroups Directly from Stool Specimens, Pakistan Journal of Biological Sciences, 7 (8):1360-1364,2004
13. Wang XY, Ansaruzzaman M, Raul Vaz, et al. BMC Infectious Diseases:” Field evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick test for the diagnosis of cholera in a high-risk population “.Journal List BMC Vol.26, 2006.
14. Rohani MY, Hasinidah, Sand MBB.” Evaluation of the Cholera Spot Test: a chromatographic immunoassay for the rapid detection of Cholera antigen, Bacteriology Division, Institute for Medical Research, Kuala Lumpur and Malaysia Bio-Diagnostic, Kualalumpur, Malaysia 1998.
15. Nato F, Boutonnier A, Rajerison , et al . American Society for Microbiology : “ One – Step Immunochromatographic Dipstick Tests For Rapid Detection”. 2003.
16. Islam M, Kabir, Tariqul I, Rakib A. Coagglutination: A Rapid and Sensitive Assay Method for Detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 serogroups Directly from Stool Specimens, Pakistan Journal of Biological Sciences, 7 (8):1360-1364,2004

