

Identifikasi Gen ICSA pada Feses Anak Penderita Diare dengan Metode Polymerase Chain Reaction

Identification of ICSA Gene From Stool Children with Diarrhea Using Polymerase Chain Reaction Methode

Rusdianto^{1*}, Akbar Asfar², Hairil Akbar³

¹Program Studi Pendidikan IPA Universitas Jember

²Program Studi Ilmu Keperawatan Universitas Muslim Indonesia

³Program Studi Kesehatan Masyarakat STIKES Graha Medika

*Korespondensi Penulis : rusdian@unej.ac.id

Abstrak

Gen IcsA merupakan salah satu gen yang berperan dalam virulensi pada bakteri *Shigella sp* yang dapat menyebabkan diare pada manusia. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi *gen IcsA* pada feses anak penderita diare dengan metode PCR. Sebanyak 50 sampel klinis yang diperoleh dari 4 puskesmas di Kota Makassar, yaitu Barabaraya, Pampang, Antang Perumnas dan Tamangapa dari bulan Mei 2016 - Juli 2016. Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik rektal swab dan dilanjutkan pemeriksaan dengan PCR menggunakan primer *icsA*. Hasil penelitian menunjukkan dari 50 sampel yang diuji diperoleh 6 sampel (24%) positif mengandung gen IcsA. Kesimpulan penelitian ini yaitu gen *icsA* efektif digunakan sebagai target gen (primer) untuk mendeteksi bakteri *Shigella sp* dengan metode PCR.

Kata Kunci : Diare, *IcsA*, PCR

Abstract

IcsA gen is one of Gens that have a part of virulent on *Shigella sp* that causes diarrhea of human. This research aim to detect *IcsA* gen of diarrhea in the stool of children with diarrhea using PCR method. There are 50 clinical sample that tooks from 4 medical center at Makassar city which are Barabaraya, Pampang, Perumnas Antang and Tamangapa from may 2016 - july 2016. Sampling was held by rectal swab technique and continued by PCR using *icsA* primarry. The research result shows that from 50 sample have been tested, there are 6 samples (24%) confirmed positive witj *icsA* gen. This research conclude that *Shigella sp* causees diarahrea to 6 positive *icsA* gen samples.

Keywords : Diarrhea, *IcsA*, PCR

PENDAHULUAN

Pada tahun 2015, infeksi diare di dunia mencapai sekitar 688 juta kasus, dan sebanyak 499.000 kasus pada anak yang berusia di bawah 59 bulan meninggal dunia [1]. Menurut WHO dan UNICEF, terdapat 2 miliar kasus diare di dunia setiap tahun, dengan angka kematian sebanyak 1,9 juta balita, dan kasus terbanyak ditemukan di negara berkembang. Ini berjumlah 18% dari semua kematian balita dan artinya lebih dari 5000 anak meninggal setiap hari akibat diare [2].

Di negara berkembang, sebagian besar morbiditas dan mortalitas yang terjadi pada anak disebabkan oleh 5 penyakit yaitu infeksi saluran pernapasan akut, diare, campak, malaria, dan kekurangan gizi [3]. Diare adalah penyakit endemis yang yang peluang untuk menjadi kasus KLB dan disertai dengan kematian. Pada tahun 2012, kasus diare pada semua golongan usia sebesar 214 per 1.000 penduduk dan pada balita sebesar 900 per 1.000 penduduk [4]. Berdasarkan Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT), Studi Mortalitas dan Riset Kesehatan Dasar dari tahun ke tahun diketahui bahwa diare masih menjadi penyebab utama kematian balita di Indonesia [5]

Secara etiologi diare dapat disebabkan oleh adanya infeksi (bakteri, virus atau parasit), malabsorpsi, alergi, keracunan bahan kimia atau makanan, dan imunodefisiensi [6]. Infeksi rotavirus merupakan penyebab diare yang paling umum sekitar 60%-70%, sekitar 10%-20% disebabkan oleh bakteri dan < 10% oleh parasit. *Shigella sp* adalah bakteri yang dapat menyebabkan diare mulai dari diare ringan sampai diare berat. Menurut Tjaniadi *et al* (2003), *Shigella sp* merupakan sebagai patogen nomor dua yang paling tinggi frekuensinya sebagai penyebab diare dengan infeksi terbesar ke 2 setelah *Vibrio cholera* (37,1%) sekitar 27,3% [7]. Bakteri ini memiliki kemampuan untuk bertahan hidup di lingkungan yang asam termasuk di lambung dan juga dapat menyebabkan infeksi dalam jumlah inokulum yang rendah sehingga mudah ditularkan ke orang lain. Hanya dengan 10-100 sel dalam tubuh, bakteri ini sudah mampu melakukan infeksi pada manusia [8].

Strain *Shigella* merupakan diferensiasi dari bakteri *Escherchia coli* sehingga antara seluruh strain *Shigella* dan *E. coli* memiliki keterkaitan DNA yang sangat erat [9]. Hal ini tentunya menimbulkan polemik di laboratorium mikrobiologi diagnostik khususnya terkait hasil pemeriksaan. Sebagian besar penelitian untuk deteksi *Shigella sp* dengan metode PCR menggunakan gen target plasmid invasif *ipaH* yang memberikan hasil yang bias. Hal ini disebabkan oleh gen plasmid invasif *ipaH* ini, juga terdapat pada bakteri *Escherchia coli* khususnya jenis *Enteroinvasif Escherhicia coli* (EIEC) [10]. Oleh sebab itu

diperlukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan gen target yang lebih khusus untuk mendeteksi *Shigella sp* mengingat bakteri ini mampu menginfeksi dalam jumlah yang sangat rendah.

METODE

Penelitian dilaksanakan di 2 tempat yang berbeda yaitu tempat pengambilan sampel klinis dan tempat pemeriksaan sampel dari bulan Maret sampai Juli 2016. Pengambilan sampel klinis dilakukan pada 4 puskesmas yaitu Puskesmas Barabaraya, Puskesmas Pampang, Puskesmas Antang Perumnas dan Puskesmas Tamangapa. Deteksi gen *IcsA* dengan metode PCR dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi RSPTN Universitas Hasanuddin. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan *cross sectional design*.

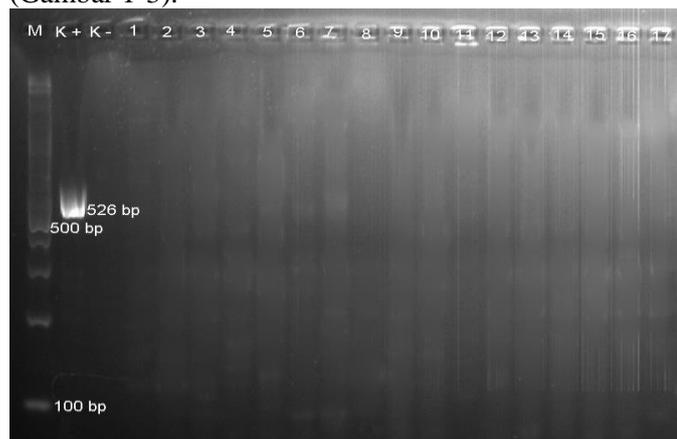
Populasi adalah seluruh pasien diare di Puskesmas Barabaraya, Puskesmas Pampang, Puskesmas Antang Perumnas dan Puskesmas Tamangapa. Sampel sebanyak 50 orang yang dipilih berdasarkan kriteria inklusi yaitu anak penderita diare, usia 0-59 bulan (< 5 tahun), belum mendapatkan terapi antibiotik, dan bersedia menandatangani *informed consent*.

Pengumpulan sampel feses dengan teknik rektal swab. Pasien dibaringkan dengan posisi menyamping ke kiri. Lubang anus dibuka menggunakan tangan, kemudian dimasukkan kapas swab ke dalam anus dengan cara diputar 360° yang sebelumnya direndam dalam larutan NaCl. Tip swab kemudian dimasukkan ke dalam medium transpor yaitu *Cair-Bair*. Setelah tiba di laboratorium sampel rektal swab diinokulasi pada medium pemupuk yaitu BHIB dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dilakukan ekstraksi DNA dengan menggunakan Presto™ DNA Kit Protocol dan dilakukan uji PCR dengan menggunakan primer *IcsA* (F: 5'- ATG CAG GCA TTC TAA AAA TGG 3' ; R: 5'-ACA GTG CCC TGT TTC AGG CG -3'). Pembuatan PCR mix dengan cara mencampurkan 12,5 µl master mix green (dNTP, DNA tag polymerase, MgCl₂), primer forward 0,5 µl, primer reverse 0,5 µl, nuclease free water 6,5 µl, DNA produk 5,0 µl, dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Tabung dimasukkan ke dalam mesin PCR. Program amplifikasi dilakukan dalam beberapa siklus. Siklus pertama dilakukan denaturasi pada suhu 94°C selama 3 menit. Selanjutnya sebanyak 35 siklus berikutnya dilakukan denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, annealing pada suhu 56°C selama 45 detik dan elongating pada suhu 72°C selama 1 menit dan siklus ketiga dilakukan final extention pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil PCR divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis gel agarose 2%.

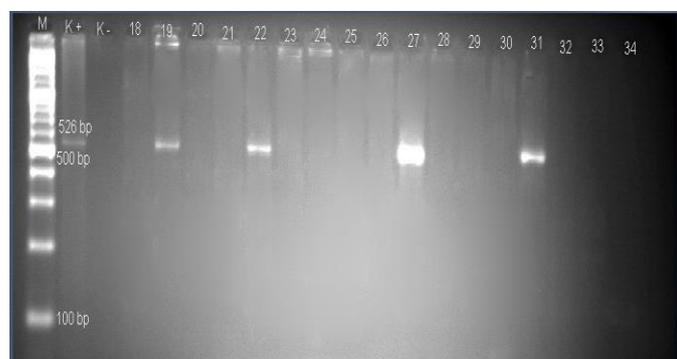
HASIL

Pemeriksaan feses adalah tes yang dilakukan pada sampel feses atau tinja untuk mendiagnosis sejumlah penyakit pada sistem pencernaan. Pemeriksaan ini dapat mendeteksi adanya infeksi yang berasal dari bakteri, virus, atau parasit, dan berbagai penyakit, mulai dari penyerapan gizi yang kurang baik hingga kanker

Dari 50 sampel yang diuji dengan metode PCR dan dilakukan visualisasi di bawah sinar ultra violet dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 2% (Gambar 1-3).



Gambar 1. Hasil elektroforesis dari DNA produk PCR sampel feses anak diare pada gel agarose 2% sampel 1 - 17



Gambar 2. Hasil elektroforesis dari DNA produk PCR sampel feses anak diare pada gel agarose 2% sampel 18 - 34



Gambar 3. Hasil elektroforesis dari DNA produk PCR sampel feses anak diare pada gel agarose 2% sampel 35 - 50

Hasil yang menunjukkan positif terdapat gen *icsA* di dalam sampel dapat dilihat dengan adanya terbentuk band target yang berukuran 526 bp. Berdasarkan hasil PCR, ada 6 sampel dari 50 sampel klinis yang positif terdeteksi gen *icsA*, sementara 44 sampel tidak menunjukkan band target. Terbentuknya band target pada 6 sampel tersebut menunjukkan bahwa penyebab diare pada 6 sampel tersebut adalah bakteri *Shigella sp* yang ditandai dengan adanya band target yang terbentuk. Dimana band target tersebut merupakan gen *IcsA* yang merupakan salah satu gen virulensi yang terdapat pada *Shigella sp*. Sedangkan tidak terbentuknya band target dalam 44 sampel menunjukkan bahwa penyebab diare pada anak tersebut bukan berasal dari spesies *Shigella sp*, tetapi disebabkan oleh bakteri lain atau faktor lain.

PEMBAHASAN

Diare merupakan penyakit dengan tingkat morbiditas dan mortalitas terjadi pada balita dan sekitar 18% kasus kematian bayi di dunia setiap tahun disebabkan oleh diare [11]. Gejala klinis dari penyakit ini ditandai dengan meningkatnya frekuensi BAB lebih dari biasanya (> 3 kali/24 jam) dan konsistensi tinja menjadi cair dengan atau tanpa darah dan lendir [12]. Faktor yang menyebabkan terjadinya diare yaitu kondisi lingkungan, kontaminasi makanan dan minuman, suplai air bersih yang kurang, kemiskinan dan taraf pendidikan yang rendah.

Shigella sp merupakan golongan bakteri dari famili enterobacteriae. Berdasarkan sifat biokimia dan antigen nya, dibedakan atas *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, dan *S. sonnei* [13]. Semua jenis *Shigella* mampu menginfeksi manusia dan menyebabkan diare, mulai diare ringan sampai diare berat [14].

Infeksi bakteri *Shigella sp*, biasanya diawali dengan demam dan *malaise*, diikuti oleh diare cair dan nyeri kram pada perut. Pada hari ke 2, feses biasanya mengandung darah dan mukus, serta *tenesmus* [15]. Namun, adanya darah dalam feses tidak selamanya merupakan infeksi oleh *Shigella sp*. Bakteri penyebab diare yang disertai dengan darah yaitu *Shigella* dan *E. coli invasif*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* dan *Balantidium coli* [16]. Namun pada penelitian ini pada sampel yang digunakan tidak menunjukkan adanya darah pada feses (diare ringan) tetapi mampu mendeteksi keberadaan gen *IcsA* yang merupakan gen virulensi pada bakteri *Shigella sp*.

Sifat virulensi dasar yang dimiliki oleh semua bakteri *Shigella sp* adalah kemampuannya menginvasi sel epitel kolon. Sifat ini dikodekan pada plasmid besar (120-140 MD) yang menyebabkan sintesis kelompok polipeptida yang terlibat dalam invasi dan pembunuhan sel. Plasmid ini terdiri dari invasi antigen plasmid (IPA), gen yang mengkode 4 polipeptida yang sangat imunogenik (IpaA, IpaB, IPAC, dan iPad).

Invasi juga diperantarai oleh gen *virF* yang terletak pada plasmid virulensi, dan gen *virR* yang terletak pada kromosom. Gen *virF* mengkodekan protein 30 kDa yang positif mengatur ekspresi gen-gen IPA dan *IcsA*. Selain sifat virulensi utama yang dikode plasmid, kromosom juga diperlukan untuk virulensi penuh. Beberapa sifat dari kromosom penting untuk semua *Shigella* seperti sintesis lipopolisakarida [17]

Virulensi dari *Shigella* berhubungan dengan 3 hal, yaitu (1) plasmid, karena plasmid berperan dalam mengenali sel epitel. *Shigella* yang tidak mempunyai plasmid menjadi tidak virulen, (2) aktin yang jika terjadi mutasi aktin intraselular (*IcsA*) akan menurunkan virulensi bakteri karena terjadi penurunan kemampuan bakteri untuk berpindah dan berkembang dalam intraselular, (3) kemampuan menempati epitel sehingga mampu melindungi diri dari kontak dengan lingkungan ekstraselular dan tidak pernah menembus mukosa menjadi suatu infeksi sistemik [18].

Seluruh spesies dari bakteri ini memiliki plasmid virulensi yang mengkodekan gen yang berperan dalam proses invasi. Gen *icsA*, *ipaJ* dan *ipgD* merupakan gen yang berperan dalam virulensi. Gen *icsA* merupakan gen yang menyandikan protein *iscA* yang terletak bagian luar membran protein berperan dalam mengontrol invasi secara intraseluler dan interseluler (May and Morona, 2008). Gen *icsA* dibagi atas 3 bagian yaitu bagian N-terminal yang tersusun atas 52 asam amino, α -domain yang tersusun atas 706 asam amino dan C-terminal β -core terdiri atas 344 asam amino [19].

Hasil deteksi gen *IcsA* dengan metode PCR didapatkan sebanyak 6 sampel (24%) yang positif, yaitu pada kode sampel F. 19, F. 22, F. 27, F. 31, F. 28, dan F. 45 ditandai dengan pita band yang terbentuk sesuai dengan ukuran pita band marker dan kontrol positif sebesar 526 bp. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa gen *icsA* efektif dalam mendeteksi bakteri *Shigella sp* pada feses anak penderita diare sehingga dapat dipilih sebagai alternatif primer yang digunakan dalam metode PCR dan selanjutnya dapat digunakan untuk mengidentifikasi pasien asimtomatik, yang berfungsi sebagai reservoir potensial *Shigella* dalam mentransmisikan penyakit dalam komunitas.

Hasil penelitian ini juga mendukung penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Alipour *et al* (2012) untuk mengetahui kemampuan set primer spesifik ini dalam mengkonfirmasi keberadaan gen *icsA* dengan menggunakan beberapa jenis bakteri yakni *S.dysenteriae*, *S. Flexeneri*, *S. sonnei*, *S. boydii*, *E. coli* (ATCC 43889) O157, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Clostridium perferingenes* yang menunjukkan gen *icsA* hanya ditemukan pada spesies bakteri *Shigella sp*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa gen *icsA* efektif digunakan sebagai primer dalam mendeteksi *Shigella sp* dengan metode PCR pada feses anak penderita diare. Berdasarkan penelitian ini maka dapat disarankan bahwa diperlukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang lebih banyak dan pada populasi yang berbeda Kota Makassar.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami ucapkan kepada pihak Puskesmas Barabaraya, Puskesmas Pampang, Puskesmas Antang Perumnas dan Puskesmas Tamangapa yang telah mengizinkan kami untuk mengambil sampel di instansi mereka serta pihak laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Pendidikan Tinggi Negeri UNHAS yang telah membantu kami dalam melakukan penelitian ini dan para anggota peneliti.

DAFTAR PUSTAKA

1. Walker, C.L.F., et al., *Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea*. The Lancet, 2013. 381(9875): p. 1405-1416.
2. Organisation, W.G., *World Gastroenterology Organisation global guidelines: acute diarrhea in adults and children: a global perspective*. 2012, World Gastroenterology Organisation (WGO) Milwaukee, WI.
3. Farthing, M., et al., *Acute diarrhea in adults and children: a global perspective*. Journal of clinical gastroenterology, 2013. 47(1): p. 12-20.
4. Kemenkes RI., *Data dan informasi tahun 2014 (profil kesehatan Indonesia)*. Kemenkes RI, Jakarta, 2015.
5. Kemenkes RI., *Situasi diare di Indonesia*. Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan, 2011. 2(2): p. 1-6.
6. Sukut, S.S., Y. Arif, and N. Qur'aniati, *Faktor kejadian diare pada balita dengan pendekatan teori Nola J. Pender di IGD RSUD Ruteng*. Jurnal Pediomaternal, 2015. 3(2): p. 230-249.
7. Tjaniadi, P., et al., *Antimicrobial resistance of bacterial pathogens associated with diarrheal patients in Indonesia*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2003. 68(6): p. 666-670.
8. Nascimento, A.M. and S.T. Van Der Sand, *Detection of the virulence plasmid pINV, using inv E gene in shigella sp. in sewage samples by PCR assay*. Biociências (On-line), 2008. 16(1).
9. van der Ploeg, C.A., et al., *Laboratory Protocol: Serotyping of Shigella spp*. Geneva: WHO Global Foodborne Infections Network, 2010.
10. Binet, R., D.M. Deer, and S.J. Uhlfelder, *Rapid detection of Shigella and enteroinvasive*

- Escherichia coli* in produce enrichments by a conventional multiplex PCR assay. Food microbiology, 2014. 40: p. 48-54.
11. Bryce, J., et al., *WHO estimates of the causes of death in children*. The Lancet, 2005. 365(9465): p. 1147-1152.
 12. Sudaryat, S., *Gastroenterologi Anak*. Lab/SMF Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran. Universitas Udayana, 2010.
 13. Brooks, G.F., J.S. Butel, and S.A. Morse, *Jawetz, Melnick, & Adelberg Mikrobiologi Kedokteran, Edisi 23*. Alih bahasa: Huriawati Hartanto et al. Editor edisi bahasa Indonesia: Retna Neary Elferia et al. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 2008.
 14. Levine, M.M., et al., *Clinical trials of Shigella vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road*. Nature Reviews Microbiology, 2007. 5(7): p. 540-553.
 15. Wyllie, R., J.S. Hyams, and M. Kay, *Pediatric gastrointestinal and liver disease*. 2015: Elsevier Health Sciences.
 16. Bhutta, Z.A., *Acute gastroenteritis in children*. Nelson textbook of pediatrics, 2007. 19: p. 1323-39.
 17. Marcadante, K.J., et al., *Nelson ilmu kesehatan anak esensial*. 2014: Elsevier.
 18. Nafianti, S. and A.B. Sinuhaji, *Resisten Trimetoprim–Sulfametoksazol Terhadap Shigellosis*. Sari Pediatri, 2005. 1(1): p. 39-44.
 19. May, K.L. and R. Morona, *Mutagenesis of the Shigella flexneri autotransporter IcsA reveals novel functional regions involved in IcsA biogenesis and recruitment of host neural Wiscott-Aldrich syndrome protein*. Journal of bacteriology, 2008. 190(13): p. 4666-4676.