

IDENTIFIKASI GEN PENYANDI PROTEIN TRANSPORT SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN SUBUNIT TERHADAP BAKTERI *ESCHERICHIA COLI* PENYEBAB DIARE WISATAWAN

Burhannuddin Rasyid¹, I Wayan Karta¹, Ni Luh Putu Eka Kartika Sari²,
I Gusti Ngurah Dwija Putra²

¹Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Denpasar
Denpasar, Indonesia

²Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Warmadewa
Denpasar, Indonesia

e-mail: boerhannuddin@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi gen penyandi protein transport sebagai kandidat vaksin subunit terhadap *E. coli* penyebab diare wisatawan. Pengambilan sampel feses dilakukan di Ubud Care Clinic pada wisatawan yang melakukan pemeriksaan diare. Sampel dikultur pada media *Eosin Metilen Blue*, koloni tersangka kemudian diuji biokimia untuk mengkonfirmasi jenis bakteri yang ditemukan. Isolat positif *E.coli* selanjutnya disubkultur pada media *Nutrient Broth*, kemudian DNA *E.coli* diisolasi dengan GeneJET Genomic DNA Purification Kit. DNA hasil isolasi selanjutnya digunakan sebagai *template* reaksi PCR menggunakan pasangan primer yang mengenali gen *aidA* penyandi protein transport pada *E.coli*. Berdasarkan hasil kultur pada media EMB dan hasil uji biokimia pada media TSIA, SIM, Simon Citrat dan uji gula-gula didapatkan sebanyak 20 (59 %) dari 34 sampel feses penderita diare wisatawan positif bakteri *E. coli*. DNA dari 20 isolat *E.coli* berhasil diisolasi dengan ukuran sekitar 12000-13000 bp. Hasil PCR dari 20 sampel DNA bakteri *E. coli* terdapat 5 sampel positif mengandung gen *aidA* yang ditunjukkan dengan adanya pita DNA tunggal dengan ukuran sekitar 585 bp. Keberadaan gen *aidA* yang menyandi protein transport menunjukkan sifat patogenitas, yang membedakan antara *E.coli* pathogen dengan *E.coli* non-patogen

Kata kunci: Diare Wisatawan, *E.coli*, Gen Protein Transport

Abstract

This study aims to isolate and determine the characteristics of the transport protein-coding gene for E.coli bacteria that cause traveler's diarrhea. Stool sampling was performed at the Ubud Care Clinic for tourists who checked diarrhea. Samples were cultured on Eosin Methylene Blue media. Suspect colonies on EMB media were tested biochemically to confirm the type of bacteria found. E.coli positive isolates were then subcultured on Nutrient Broth media, then bacterial DNA was isolated with the GeneJET Genomic DNA Purification Kit. The isolated DNA was then used as a PCR reaction template using a pair of primers that recognized the ai-dA gene of E. coli. Based on the culture results on the media Eosin Methylene Blue (EMB) and the results of biochemical tests on TSIA, SIM, Simon Citrate media and sugar tests were obtained as many as 20 (59%) from 34 stool samples of diarrhea patients positive E. coli bacteria

Keywords: Traveler's diarrhea, *E. coli*, Protein Transport Gene

PENDAHULUAN

Diare wisatawan terus menjadi masalah kesehatan yang paling sering dialami oleh wisatawan yang mengunjungi negara-negara berkembang terutama negara dengan kondisi sanitasi yang buruk (Olson et al., 2019; Steffen, 2017). Diare wisatawan ditandai dengan kondisi tinja yang tidak berbentuk sebanyak tiga kali atau lebih per hari, yang disertai dengan satu atau lebih gejala enterik seperti sakit perut atau kram. Gejala tersebut dialami oleh seseorang setelah kedatangan pada suatu wilayah dengan tujuan perjalanan wisata (Connor, 2019). Diare wisatawan me-nyebabkan morbiditas yang signifikan seperti adanya gejala sisa, hilangnya waktu per-jalanan, dan berkurangnya pendapatan bagi pelaku wisata pada negara yang dikun-jungi (Riddle et al., 2017).

Prevalensi diare wisatawan dilaporkan berkisar dari 30% hingga 70%, tergantung pada tujuan dan musim perjalanan yang dilakukan. Sekitar 25% wisatawan mengem-bangkan diare dalam 2 minggu pertama di luar negeri, dengan tingkat tertinggi terjadi ketika melakukan perjalanan ke Afrika dan Asia Selatan, Tengah dan Barat (Pitzurra *et al.*, 2010). Diare wisatawan dapat terjadi segera setelah kembali dan dapat dibedakan menjadi dua kategori, yaitu akut dan persisten. Tipe akut sebagian besar disebabkan oleh bakteri dan virus patogen, biasanya ringan dan dapat sembuh tanpa pengobatan. Sedangkan tipe persisten umumnya oleh infeksi parasit seperti *Giardia* dan *Entamoeba* (Saussure, 2009). Praktik kebersihan yang buruk di restoran lokal kemungkinan merupakan kontributor terbesar terhadap risiko terjadinya diare wisatawan (Connor, 2019)

Tingkat kejadian diare wisatawan khususnya di Indonesia belum banyak dipub-likasikan. Hasil survey suatu studi melaporkan angka kejadian diare pada wisatawan yang mengunjungi rumah sakit di Bali adalah 5% dari 2429 kasus diare. Masih ada kemungkinan insiden diare wisatawan meningkat jika survei dilakukan di semua klinik di Bali. Tingginya angka diare wisatawan dapat mempengaruhi jumlah kunjungan wisatawan internasional

dan secara tidak langsung mempengaruhi perekonomian masyarakat setempat, terutama yang menggunakan bidang pariwisata sebagai salah satu sumber pendapatan (Ani, Suwiyoga, 2016).

Terdapat berbagai faktor yang memengaruhi kejadian diare wisatawan antara lain faktor lingkungan, *host*, dan agen penyebab. Kondisi lingkungan terutama hotel dan restoran, khususnya di Bali sebagai daerah tujuan utama wisata di Indonesia dilaporkan bersih tetapi untuk beberapa tempat masih belum memenuhi syarat kesehatan. Wisatawan juga cenderung mengonsumsi makanan daerah yang tidak higienis sehingga beresiko mendapatkan infeksi bakteri. Faktor *host* juga memengaruhi kejadian diare wisatawan seperti usia, kebiasaan makan dan minum, sosial ekonomi, negara asal, daerah yang dikunjungi, riwayat profilaksis atau persiapan lain sebelum kunjungan (Ani, Suwiyoga, 2016).

Agen penyebab diare wisatawan terutama adalah bakteri, virus, dan parasit (Steffen et al., 2015). Bakteri menjadi penyebab utama diare wisatawan dengan angka kejadian mencapai 80%, sedangkan virus menyebabkan kira-kira 5% hingga 10% kasus. Statistik ini bervariasi sesuai dengan lokasi geografis, dapat naik mencapai 60% kasus jika terjadi infeksi campuran (Steffen, 2018).

Bakteri *E.coli* merupakan penyebab utama diare endemik dan epidemik di dunia. Secara genetik, bakteri *E. coli* bervariasi dan dapat menginfeksi jutaan orang tiap tahunnya (Tang & Saier, 2014). *E. coli* dilaporkan sebagai enteropathogen yang paling banyak diisolasi dari sampel feses penderita diare wisatawan (54,1%) di Denpasar, lebih tinggi dibandingkan jenis bakteri enterik lainnya seperti *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Shigella sp.* Berdasarkan tipe diare yang dialami wisatawan, diduga diare wisatawan tersebut disebabkan oleh *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC) dan *Enteraggregative E. coli* (EAEC). Kedua strain *E.coli* tersebut diketahui memiliki onset cepat mulai dari 8-48 jam (Masyeni et al., 2017).

ETEC) dan EAEC merupakan penyebab utama diare wisatawan yang

secara signifikan berkontribusi juga pada mortalitas bayi (Tang & Saier, 2014). Bakteri ini dapat mengkontaminasi makanan dan menyebabkan diare pada wisatawan. Hasil penelitian lain menunjukkan dari 40% sampel positif *E.coli* pada penjamah makanan, sebanyak 31,4% merupakan sub tipe EAEC; 5,7% sub tipe ETEC; dan 3% memiliki kedua gen yaitu ETEC dan EAEC. Pen-jamah makanan dapat bertindak sebagai carrier berbagai penyakit infeksi seperti diare (Gitaswari & Budayanti, 2019). Selain dua strain tersebut, tipe *E.coli Enteropathogenic* (EPEC), *Enterohaemorrhagic* (EHEC), *Enteroinvasive* (EIEC), dan *Diffusely Adherent* (DAEC) juga dapat menyebabkan diare (Tang & Saier, 2014).

Patogenesis dari berbagai strain *E.coli* dipengaruhi oleh faktor virulensi seperti adhesi, injeksi protein pada sel host, mekanisme signaling, dan kolonisasi yang mengganggu respon imun, kerusakan membran sel dan manipulasi sitoskeleton. Selama tahap injeksi, *E.coli* mensekresikan molekul efektor pada sel host yang menggunakan satu atau lebih system sekresi protein dengan tujuan menghindari system imun atau mengubah jalur signal sel (Tang & Saier, 2014).

Pemberian vaksin merupakan salah satu cara untuk mencegah diare yang diakibatkan infeksi bakteri *E.coli*, namun vaksin protektif yang luas terhadap *E. coli* patogen saat ini belum tersedia. *E. coli* diketahui memiliki sifat yang kompleks dan terus berkembang dari isolat non-virulen menjadi strain yang sangat patogen (Nesta & Pizza, 2018). Adanya peningkatan patogenitas, virulensi, dan resistensi terhadap multi-obat meningkatkan perhatian terhadap perawatan kesehatan dan membutuhkan upaya terus menerus dalam pengawasan epidemiologis dan pemantauan penyakit.

Pengetahuan yang berkembang tentang mekanisme patogenesis *E. coli* dan respon imun yang dimediasi setelah infeksi atau vaksinasi, bersama dengan kemajuan dalam teknologi "omics", membuka perspektif baru terhadap desain dan pengembangan vaksin *E. coli* yang efektif dan inovatif. Pengembangan vaksin alternatif terhadap *E. coli* penyebab diare

perlu terus diupayakan dengan memperhatikan pathogenesis infeksi sehingga bisa menghasilkan proteksi yang lebih baik dengan efek samping yang kecil.

Sejumlah protein transport telah diketahui berperan dalam patogenesis diare sehingga pemahaman tentang ekspresi, lokasi, dan regulasi protein setelah infeksi penting untuk mendesain terapi (Das et al., 2018). Salah satu jenis protein transport yang berperan dalam patogenesis *E. coli* adalah protein adhesin. Protein ini berperan memediasi penempelan bakteri *E. coli* pada sel host dan merupakan salah satu mekanisme penting dalam proses infeksi. Protein adhesin merupakan faktor virulensi yang signifikan berperan dalam kolonisasi bakteri pada usus dan pembentukan biofilm. Protein adhesin dikode oleh gen *aidA* yang terdapat pada genom bakteri *E.coli* patogen. Gen *aidA* pertama kali diidentifikasi dan dikarakterisasi dari bakteri *E.coli* penyebab diare pada neonatal (Ravi, 2006).

Identifikasi gen *aidA* dapat dilakukan dari strain bakteri *E. coli* penyebab diare dari berbagai serotype. Gen kemudian dapat diisolasi dan dikloning menggunakan plasmid untuk dapat diekspresikan menjadi protein adhesin. Saat ini, berbagai macam protein yang dihasilkan oleh bakteri dapat dijadikan protein rekombinan dan dikembangkan sebagai kandidat vaksin sub unit. Pada penelitian ini, gen *aidA* yang merupakan penyandi protein adhesin diidentifikasi dan diisolasi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Penelitian ini merupakan tahap awal untuk pengembangan protein adhesin sebagai vaksin subunit terhadap *E.coli* khususnya penyebab diare wisatawan. Penelitian tentang penggunaan protein adhesin sebagai kandidat vaksin *E. coli* khususnya di Indonesia belum banyak dilakukan. Penelitian ini diharapkan membuka peluang penemuan vaksin alternatif terhadap infeksi *E.coli* pathogen yang berbasis protein rekombinan.

METODE

Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif dengan mengidentifikasi bakteri *E.coli* penyebab diare wisatawan menggunakan metode konvensional dan molekuler berdasarkan keberadaan gen *aidA* pengkode protein transport.

Waktu dan tempat

Penelitian dilakukan dari bulan September 2019 - November 2019. Pengambilan sampel feses dilakukan di *Ubud Care Clinic*, Ubud, Gianyar pada wisatawan yang melakukan pemeriksaan diare. Identifikasi bakteri *E.coli* dari sampel feses dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar. Isolasi DNA dan identifikasi gen *aidA* dengan teknik PCR dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Warmadewa.

Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel feses yang diperoleh dari 34 wisatawan yang melakukan pemeriksaan diare di *Ubud Care Clinic*, Gianyar.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *biosafety cabinet* (Biobase), inkubator (T01892-Esco), mesin PCR (Biometra), alat elektroforesis (Biometra), alat pembacaan UV Solo (Sientra BD), *magnetic* dan *stirrer* (Jisico), *autoclave* (SX-500, TOMY), *oven* (wagtech), *micropipet* 50-500 μ l (Socorec), neraca analitik (Radwag), vortex, dan *water bath*.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu media NB (Oxoid), tabung eppendorf, pasangan primer spesifik *Aida1- F ACAGTATCATATGGAGCCA* dan *Aida1- R TGTGCGCCAGAACTATTA*, *buffer* TAE, *proteinase K*, *RNAse A solution*, etanol 50%, bubuk agarosa, *GenJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific)*, *loading dye*, PCR Mix, dan ddH_2O .

Prosedur Kerja

Sampel feses dikoleksi dari 34 wisatawan yang melakukan pemeriksaan diare di *Ubud Care Clinic*, Gianyar. Sampel dikultur pada media selektif Eosin Metilen *Blue* (EMB) yang diinkubasi pada suhu 37 oC selama 24 jam. Koloni tersangka *E.coli* pada media EMB dikonfirmasi dengan uji biokimia pada media TSIA, SIM, simon citrat, dan gula-gula dengan *E.coli* ATCC 25922 sebagai standar kuman. Koloni yang teridentifikasi *E.coli* dikultur pada media Nutrien Broth pada suhu inkubasi 37o C selama 24 jam. DNA *E.coli* diisolasi dari hasil kultur pada media Nutrien Broth dengan *GeneJET Genomic DNA Purification Kit*.

DNA *E.coli* hasil isolasi digunakan sebagai template untuk reaksi PCR dengan menggunakan pasangan primer gen *Aida*, yaitu *Forward- ACAGTATCATATGGAGCCA* dan *Revers- TGTGCGCCAGAACTATTA*. Reaksi PCR dilakukan dengan mencampur-kan 25 μ l PCR Mix, 2 μ l *primer Forward*, 2 μ l *primer Revers*, 5 μ l *DNA Template*, dan 16 μ l *nuclease free water*. Campuran reaksi kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR *thermo cycler* dengan suhu *Pre-denaturasi* (94°C, 15 menit), *Denaturasi* (94 °C, 45 s), *Anealing* (57 °C, 30), *Ekstensi* (72 °C, 45 s), *Post ekstensi* (72 °C, 10 menit) dengan 35 Siklus. Hasil PCR dielektroforesis menggunakan gel agarose 1.5 % selama 45 menit, kemudian pita DNA dibaca menggunakan UV *gel documentation*

Metode Pengumpulan Data

Data dikumpulkan melalui pemeriksaan laboratorium terhadap sampel, hasil isolasi bakteri *E.coli* dengan metode kultur, isolasi DNA total dengan *GeneJet Genomic DNA Purification Kit*, dan isolasi gen *aidA* dengan teknik PCR.

Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis deskriptif, dengan menggambarkan dan mengkarakterisasi gen pengkode protein transport yang diisolasi dari bakteri *E.coli* penyebab diare wisatawan

HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL PENELITIAN

Isolasi Bakteri *E.coli* dari Penderita Diare Wisatawan

Berdasarkan hasil kultur pada media Eosin Metilen Blue (EMB) dan hasil uji

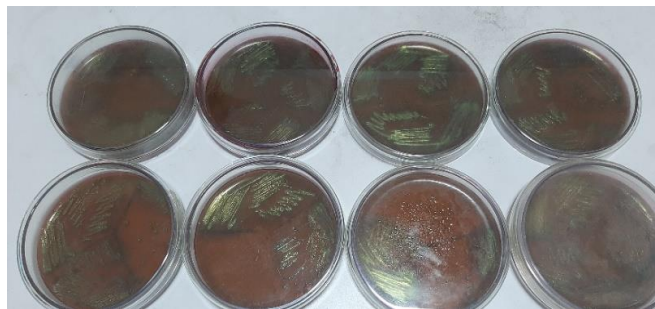
biokimia pada media TSIA, SIM, Simon Citrat dan uji gula-gula didapatkan sebanyak 20 (59 %) dari 34 sampel feses penderita diare wisatawan positif bakteri *E.coli* (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Bakteri *E.coli* dari sampel feses penderita diare

No	Hasil Pemeriksaan	Jumlah Sampel	%
1	Positif <i>Escherichia coli</i>	20	59
2	Negatif <i>Escherichia coli</i>	14	41
TOTAL		34	100

Bakteri *E.coli* pada media Eosin Metilen Blue memiliki ciri khas yaitu berwarna hijau Metalik dengan permukaan rata dan terdapat bintik hitam

di tengah koloni. Hasil subkultur bakteri *E.coli* pada media EMB ditunjukkan pada gambar di bawah ini (Gambar 1).

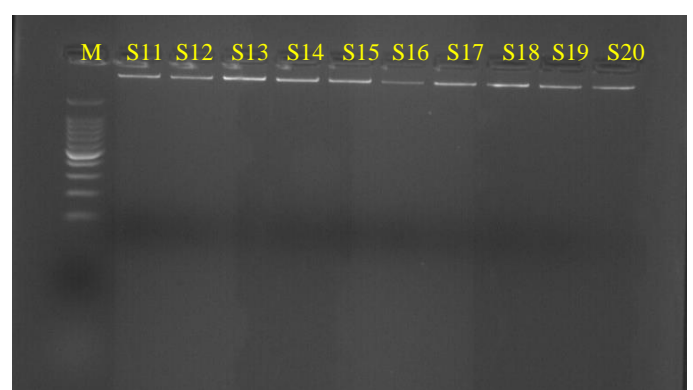
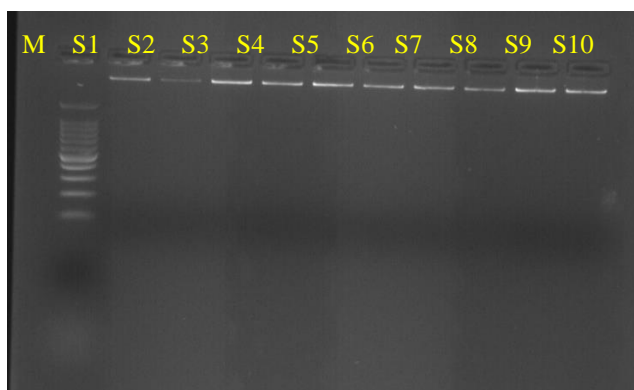


Gambar 1. Hasil isolasi Bakteri *E.coli* pada media EMB

Hasil Isolasi DNA Bakteri *Escherichia coli*

Isolat bakteri *E.coli* yang didapatkan sesuai hasil pemeriksaan di atas selanjutnya digunakan sebagai sumber untuk mengisolasi DNA bakteri *E.coli*. Masing-masing isolat diremajakan pada media *Nutrient Broth* selama 24 jam

kemudian DNA bakteri diisolasi dengan *GeneJET Genomic DNA Purification Kit*. DNA dari 20 sampel *E.coli* penyebab diare wisatawan berhasil diisolasi dengan ukuran pita DNA sekitar 12.000-13.000 bp. Hasil isolasi DNA ditunjukkan pada Gambar 2 di bawah ini :

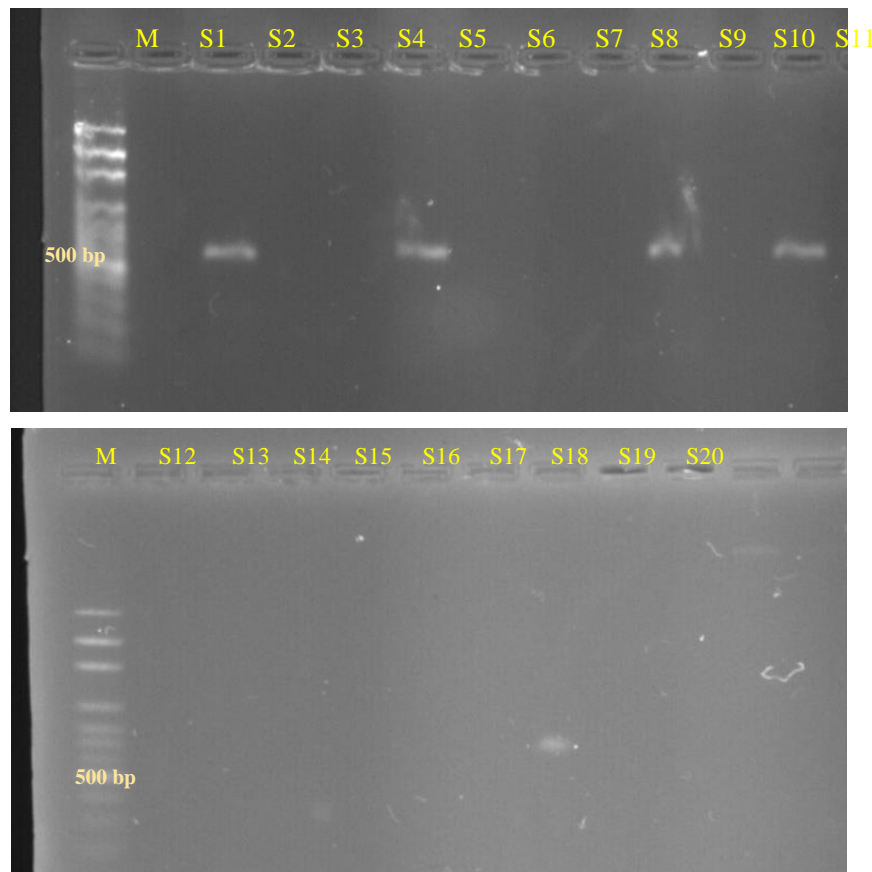


Gambar 2 Hasil isolasi DNA dari isolat bakteri *Escherichia coli*
Ket : M (Marker 100 bp), S1-S20 (Sampel 1-20)

Hasil Amplifikasi Gen Pengkode Protein Transport *E.coli* dengan Teknik PCR

Reaksi PCR dalam penelitian ini menggunakan pasangan primer *Forward*-ACAGTATCATATGGAGCCA dan *Revers*-TGTGCGCCAGAACTATTA yang spesifik mengenali gen *aidA* pengkode protein adhesin pada bakteri *E.coli*. Hasil PCR

menunjukkan 5 dari 20 sampel DNA *E.coli* penyebab diare wisatawan memiliki gen *aidA* pengkode protein adhesin dengan ukuran pita DNA sekitar 585 bp. Hasil PCR dari masing-masing sampel DNA *E. coli* penyebab diare wisatawan ditunjukkan pada Gambar 3 di bawah ini :



Gambar 3. Hasil PCR gen *aidA* pada bakteri *E. coli* penyebab diare wisatawan
Ket : M (Marker 100 bp), S1-S20 (Sampel 1-20)

PEMBAHASAN

E. coli penyebab diare wisatawan pada penelitian ini diisolasi pada media EMB. Media EMB merupakan media selektif dan diferensial untuk menumbuhkan bakteri *E. coli*. Pada media ini, bakteri *E. coli* memfermentasi laktosa dan memproduksi asam. Suasana asam pada media menyebabkan indikator warna asam bekerja dan mengubah warna media menjadi kehijauan (Gambar 1). EMB secara selektif menumbuhkan bakteri enterik gram negatif dan

menghambat pertumbuhan bakteri gram positif termasuk pertumbuhan yeast. Media ini mengandung zat pewarna metilen blue yang bersifat toksik pada mikroorganisme tersebut kecuali pada kelompok bakteri enterik. Bakteri *E. coli* pada media ini menunjukkan warna koloni yang khas yaitu hijau metalik (Antony et al., 2016). Ciri ini membedakan *E. coli* dengan bakteri enterik lain yang tumbuh pada media EMB.

Koloni yang berwarna hijau metalik kemudian diuji biokimia untuk mengkonfirmasi hasil pemeriksaan yang didapatkan. Berdasarkan hasil uji biokimia yang telah dilakukan, koloni-koloni tersebut menunjukkan hasil yaitu memfermentasi ketiga gula pada media TSIA, motilitas positif, indol positif, uji pada media gula-gula (glukosa, laktosa, sukrosa, manitol, maltosa) positif, dan negatif pada uji sitrat. Hasil uji biokimia ini sesuai dengan karakteristik biokimiawi bakteri *E. coli* (Lupindu, 2017; Hidayati *et al.* 2016)

Bakteri *E. coli* merupakan jenis bakteri yang menjadi penyebab umum kejadian diare. Penelitian oleh Masyeni *et al.* (2017) mendapatkan sebanyak 54,1 % kasus diare wisatawan di Denpasar disebabkan oleh *E. coli*. Hasil yang tidak jauh berbeda didapatkan pada penelitian ini, yaitu sebanyak 59 % kejadian diare wisatawan di wilayah Ubud disebabkan oleh *E. coli*. Penelitian lain oleh Ericsson *et al.* (2007) menunjukkan *E. coli* merupakan enteropatogen yang paling sering diidentifikasi dalam kultur tinja sebelum pengobatan pada kasus diare wisatawan. *Enterotoxigenic E. coli* diidentifikasi pada 109 (36%) dari 306 sampel yang diuji, dan enteroaggregative *E. coli*, terdeteksi dalam 50 (16%) dari 306 sampel. Vila *et al.*, (2001) sebelumnya telah melaporkan isolat *Enterotoxigenic E. coli* sebagai penyebab diare perjalanan pada 50 (9%) dari 517 pasien dan menunjukkan adanya peningkatan resistensi terhadap quinolone.

Bakteri *E. coli* penyebab diare wisatawan dalam penelitian ini merupakan jenis *E. coli* patogen yang dapat dibedakan dengan *E. coli* tipe komensal berdasarkan faktor virulensi yang dimiliki. Jenis *E. coli* patogen memiliki daya tahan dan berbagai faktor virulensi yang meningkatkan patogenitasnya sehingga dapat menimbulkan diare pada wisatawan. Menurut Gebisa *et al.* (2019) beberapa strain *E. coli* patogen menyebabkan penyakit diare dan dikategorikan ke dalam kelompok spesifik berdasarkan sifat virulensi, mekanisme patogenitas, sindrom klinis, dan serogrup O:H yang berbeda. Beberapa faktor virulensi paling penting dari *E. coli* antara lain yaitu resistensi

terhadap asam; keberadaan berbagai tipe protein adhesi seperti fimbriae, fibrillae, curli dan protein membran luar; penggunaan sistem sekresi tipe III untuk mengubah jalur pensinyalan sel dengan menyuntikkan protein yang virulen ke dalam sitoplasma sel inang seperti protein *alkaline phosphatase* yang dikodekan oleh gen Pho dan berbagai jenis toksin yang meningkatkan virulensi *E. coli* di dalam sel inang.

Selain faktor adanya virulensi *E. coli* yang meningkatkan kerentanan wisatawan terhadap diare, berbagai faktor lain dapat menyebabkan terjadinya diare wisatawan. Bakteri *E. coli* merupakan indikator sanitasi lingkungan yang dapat mengkontaminasi air, makanan, atau minuman. Wisatawan dapat mengalami intoleransi makanan atau malabsorpsi karena kebersihan makanan atau minuman yang tidak memadai (Wahyuni *et al.*, 2019). Faktor risiko lain yang menjadi penyebab diare perjalanan pada wisatawan asing di Bali meliputi usia wisatawan, lama tinggal, dan perilaku mencuci tangan (Ani, Suwiyoga, 2016). Diare wisatawan biasanya terjadi di daerah dengan keadaan sanitasi dan higienitas masih kurang (Steffen, 2017). Wahyuni *et al.* (2019) dalam penelitiannya melaporkan konsumsi makanan jalanan dan makanan tradisional hasil olahan daging babi ditemukan terkait dengan kejadian diare pada wisatawan asing saat berkunjung ke Bali. Menurut Bauch and DuPon (2011) faktor genetik juga dapat memengaruhi kerentanan wisatawan terhadap diare. Individu dapat mengalami variasi kerentanan karena predisposisi genetik yang muncul akibat adanya polimorfisme nukleotida tunggal. Variasi ini mengakibatkan perbedaan dalam regulasi ekspresi protein penanda inflamasi yang terkait diare.

DNA *E. coli* diisolasi sebagai template untuk reaksi PCR gen *aidA* pengkode protein transport *E. coli*. DNA bakteri *E. coli* berhasil diisolasi yang ditunjukkan dengan adanya pita DNA tunggal pada hasil pembacaan elektroforesis gel agarosa pada Uvdoc (Gambar 2). Elektroforesis gel agarosa berperan sebagai sirkuit elektrik untuk memisahkan fragmen-fragmen DNA berdasarkan

jumlah nukleotida penyusunnya. Semakin kecil ukuran pasang basa nukleotidanya, akan semakin mudah bermigrasi dan berada di bagian gel yang dekat dengan anoda (Radji *et al.*, 2010). DNA pada gel agarosa akan berpendar saat disinari dengan cahaya UV karena pada gel terdapat staining gel. Senyawa ini akan berinterkalasi diantara struktur molekul asam nukleat dan menyebabkan timbulnya pendaran berupa pita DNA saat disinari UV. Setelah dibandingkan dengan marker, band yang muncul memiliki genom DNA berukuran lebih dari 10.000 bp yakni berkisar antara 12.000-13.000bp.

Isolasi DNA dengan prosedur menggunakan GenJet Genomic DNA Purification Kit dalam penelitian ini menunjukkan kualitas hasil yang cukup baik. Prosedur ekstraksi yang dikerjakan relatif lebih sederhana dan cepat dibandingkan prosedur ekstraksi standar. Pita DNA yang didapatkan berupa pita tunggal, tampak tebal dan jelas, serta tidak tampak smear yang menandakan rendahnya kontaminasi baik oleh RNA maupun protein. Kemurnian DNA yang akan digunakan sebagai *template* sangat penting untuk meningkatkan efisiensi saat reaksi PCR. Ammazalorso *et al.* (2015) dengan kit ekstraksi DNA yang sama mendapatkan kualitas DNA paling tinggi dan hasil PCR yang konsisten dibandingkan ekstraksi DNA menggunakan prosedur standar. Ravintheran *et al.* (2019) menggunakan prosedur ekstraksi yang sama untuk mengisolasi genom bakteri *Sphingomonas paucimobilis* untuk tujuan sekuensing. Sedangkan Juhas and Ajioka (2016) menggunakan prosedur ini untuk mendapatkan genom *Bacillus subtilis* untuk tujuan rekayasa genetika.

Reaksi PCR dalam penelitian ini menggunakan pasangan primer *Forward*-ACAGTATCATATGGAGCCA dan *Reverse*-TGTGCGCCAGAACTATTA yang spesifik mengenali gen *aidA* pengkode protein adhesin pada bakteri *E.coli*. Hasil PCR menunjukkan 5 dari 20 sampel *E.coli* penyebab diare wisatawan memiliki gen *aidA* pengkode protein adhesin dengan ukuran pita DNA sekitar 585 bp (Gambar 3).

Keberadaan gen *aidA* pengkode protein transport pada sampel tersebut menunjukkan sifat patogenitas, yang membedakan antara *E.coli* patogen dengan *E.coli* non-patogen. Pada *E.coli* patogen memiliki system sekresi yang akan melepaskan protein ke permukaan sel atau menginjeksikan suatu protein efektor ke dalam sel inang (Tang & Saier, 2014). Beberapa strain *E.coli* telah dikarakterisasi sebagai agen etiologi diare baik pada anak-anak maupun orang dewasa, antara lain Enteropathogenic *E.coli* (EPEC), Verocytotoxigenic *E.coli* (VTEC), Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC), Enterogagregative *E.coli* (EAEC), Enteroinvasive *E.coli* (EIEC) dan Diffusely Adherent *E.coli* (DAEC) (Zhang *et al.*, 2016).

Pasangan primer yang digunakan dalam reaksi PCR ini memiliki sekuen yang spesifik terhadap gen *aidA* pengkode protein adhesin *E.coli*. Gen *aidA* secara alami ditemukan pada strain Enteroaggregative *E.coli* (EAEC) O126:H127 yang menyebabkan penyakit diare pada anak (Sherlock *et al.*, 2004). Strain Enteroaggregative *E.coli* (EAEC) saat ini diketahui menjadi penyebab diare persisten pada anak, diare pada wisatawan, dan diare terkait penyakit AIDS di negara berkembang dan industri (Zhang *et al.*, 2016).

Protein *aidA* merupakan salah satu type protein adhesin yang berperan dalam penempelan bakteri *E.coli* pada permukaan sel manusia. Protein *aidA* termasuk jenis auto-transporter protein yang terkait dengan faktor virulensi *E.coli*. Protein ini memuat semua informasi yang diperlukan untuk proses transfer molekul dalam sistem membran bakteri (Sherlock *et al.*, 2004). Protein ini juga digunakan untuk tampilan permukaan enzim, sebagai inhibitor enzim, antigen yang potensial untuk perkembangan vaksin, dan berbagai aplikasi lainnya (Gustavsson *et al.*, 2011).

Pada penelitian ini gen *aidA* berhasil diisolasi dari DNA *E.coli* penyebab diare wisatawan dengan ukuran pita DNA sekitar 585 bp. Gen *aidA* pada penelitian-penelitian sebelumnya berhasil diidentifikasi pada *E.coli* penyebab diare pada ternak. Ravi, (2006) dalam

penelitiannya berhasil mengisolasi gen *aidA* dari *E.coli* penyebab diare pada babi dengan ukuran DNA sesuai dengan hasil penelitian ini. Kanengoni et al. (2017) juga menemukan strain *E.coli* penyebab diare pada babi yang positif mengandung gen *aidA* berdasarkan hasil PCR dengan ukuran 585 bp. Torres et al. (2005) melaporkan bahwa protein *aidA* berperan sebagai faktor adhesi *E.coli* pada permukaan sel HeLa manusia. Hal ini menunjukkan bahwa gen *aidA* bersifat virulen dan mengekspresikan protein yang terkait dengan pathogenesis *E.coli* penyebab diare baik pada manusia maupun hewan ternak.

Berdasarkan hasil PCR dalam penelitian ini, terdapat 5 sampel yang mengindikasikan adanya strain *E.coli* patogen penyebab diare wisatawan di wilayah Ubud. Sampel *E.coli* dengan hasil negatif dapat berasal dari strain *E.coli* patogen lainnya yang juga mampu menimbulkan diare pada wisatawan. Identifikasi lebih lanjut terhadap sampel-sampel tersebut perlu dilakukan dengan menggunakan primer yang secara spesifik mengenali strain-strain *E.coli* patogen penyebab diare wisatawan

SIMPULAN

Kesimpulan

Sebanyak 20 (59 %) dari 34 penderita diare wisatawan di wilayah Ubud disebabkan oleh bakteri *E.coli*. DNA *E.coli* penyebab diare wisatawan berhasil diisolasi dengan ukuran pita DNA 12000-13000 bp. Hasil pemeriksaan dengan PCR didapatkan 5 isolat *E.coli* memiliki gen *aidA* pengkode protein transport dengan ukuran DNA sekitar 585 bp.

Saran

Perlu diidentifikasi lebih lanjut strain *E.coli* penyebab diare wisatawan dengan menggunakan primer terhadap gen-gen pengkode protein transport lainnya. Gen *aidA* pengkode protein transport *E.coli* yang didapatkan perlu dikarakterisasi lebih lanjut sebelum dilakukan kloning menggunakan plasmid yang sesuai dalam rangka pengembangannya sebagai kandidat vaksin sub-unit terhadap *E.coli* penyebab diare wisatawan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada Poltekkes Kemenkes Denpasar yang mendanai penelitian ini dengan surat kontrak penelitian No. DP.02.02/PPK/5376/2019 dan atas izin menggunakan fasilitas penelitian di laboratorium Bakteriologi Jurusan Analis Kesehatan. Kami juga mengucapkan terimakasih kepada Ubud Care Clinic, Gianyar atas izin pengambilan sampel penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Ammazzalorso, A. D., Zolnik, C. P., & Daniels, T. J. 2015. To beat or not to beat a tick: comparison of DNA extraction methods for ticks (*Ixodes scapularis*). PeerJ, 1–14.
- Ani, L. S., & Suwiyoga, K. 2016. Traveler's diarrhea risk factors on foreign tourists in Denpasar Bali-Indonesia. 5(1), 152–156.
- Antony, A. C., Paul, M. K., Silvester, R., Aneesa, P. A., Suresh, K., Divya, P. S., Paul, S., Fathima, P. A., & Abdulla, M. H. 2016. Comparative Evaluation of EMB Agar and Hicrome *E. coli* Agar for Differentiation of Green Metallic Sheen Producing Non *E. coli* and Typical *E. coli* Colonies from Food and Environmental Samples. Journal of Pure and Applied Microbiology, 10(4).
- Bauch, J. de la C., & DuPon, H. L. 2011. New Developments in Traveler's Diarrhea. Gastroenterology & Hepatology, 7(2), 88–95.
- Connor, B. A. 2019. Travelers' Diarrhea. In Yellow Book. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Global Migration and Quarantine (DGMQ). <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/preparing-international-travelers/travelers-diarrhea>.
- Das, S., Jayaratne, R., & Barrett, K. E. 2018. The Role of Ion Transporters in the Pathophysiology of Infectious Diarrhea. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, 6(1).

- Ericsson, C. D., Ke, S. H. I., Huang, D. B., Dupont, M. W., Adachi, J. A., Cabada, F. J. D. E. L. A., Taylor, D. N., Jaini, S., & Sandoval, F. M. (2007). Treatment of Travelers' Diarrhea: Randomized Trial Comparing Rifaximin, Rifaximin Plus Loperamide, and Loperamide Alone. *CLINICAL GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY*, 5, 451–456.
- Gebisa, E. S., Gerasu, M. A., & Leggese, D. T. 2019. A Review on Virulence Factors of Escherichia Coli. *Animal and Veterinary Sciences*. 7(3). 83–93.
- Gitaswari, D. A. I., & Budayanti, S. 2019. Identifikasi Subtipe Enterotoxigenic Escherichia coli dan Enteroaggregative Escherichia coli dari Spesimen Usap Dubur Penjamah Makanan di Denpasar Menggunakan Polymerase Chain Reaction. *E-Jurnal Medika Udayana*. 8(1). 7–11.
- Gustavsson, M., Bäcklund, E., & Larsson, G. 2011. Optimisation of surface expression using the AIDA autotransporter. *Microbial Cell Factories*. 10(72). 1–10.
- Juhas, M., & Ajioka, J. W. (2016). Integrative bacterial artificial chromosomes for DNA integration into the Bacillus subtilis chromosome. *Journal of Microbiological Methods*. 125. 1–7.
- Kanengoni, A. T., Thomas, R., Gelaw, A. K., & Madoroba, E. 2017. Epidemiology and characterization of Escherichia coli outbreak on a pig farm in South Africa. *FEMS Microbiology Letters*. 364(3). 1–7.
- Lupindu, A. M. 2017. Isolation and Characterization of Escherichia coli from Animals, Humans, and Environment. Licensee InTech.
- Masyeni, S., Sukmawati, H., Paramasatiari, L., Aryastuti, S. A., Somia, K. A., Kambayana, G., Astika, N., Duarsa, R., & Merati, T. P. 2017. Diarrhea Among International Travelers in Bali Indonesia: Clinical and Microbiological Finding. *International Journal of Travel Medicine and Global Health*. 5(3). 84–88.
- Nesta, B., & Pizza, M. 2018. Vaccines Against Escherichia Coli. *Curr Top Microbiol Immunol*, 416, 213–242.
- Olson, S., Hall, A., Riddle, M. S., & Porter, C. K. 2019. Travelers' diarrhea: update on the incidence, etiology and risk in military and similar populations – 1990-2005 versus 2005 – 2015, does a decade make a difference? *Trop Dis Travel Med Vaccines*. 5(1). 1–15.
- Pitzurra, R., Steffen, R., Tschopp, A., & Mutsch, M. 2010. Diarrhoea in a large prospective cohort of European travellers to resource-limited destinations. *BMC Infect Dis*. 10(231). 1–9.
- Radji, M., Puspaningrum, A., & Sumiati, A. 2010. Deteksi Cepat Bakteri Escherichia coli dalam Sampel Air dengan Metode Polymerase Chain Reaction Menggunakan Primer 16E1 dan 16E2. *Makara Sains*. 14(1). 39–43.
- Ravi, M. B. 2006. Pathogenesis and clinical significance of AIDA-I-positive E. coli in diarrhea of pigs. University of Saskatchewan.
- Ravintheran, S. K., Sivaprakasam, S., Loke, S., Lee, S. Y., Manickam, R., Yahya, A., Croft, L., & Millard, A. 2019. Complete genome sequence of Sphingomonas paucimobilis AIMST S2, a xenobiotic-degrading bacterium. *Scientific Data*, 6(280), 1–6.
- Riddle, M. S., Connor, B. A., Beeching, N. J., Dupont, H. L., Hamer, D. H., Kozarsky, P., Libman, M., Steffen, R., Taylor, D., Tribble, D. R., Vila, J., Zanger, P., & Ericsson, C. D. 2017. Guidelines for the prevention and treatment of travelers' diarrhea: a graded expert panel report. *Journal of Travel Medicine*, 24(1), 63–68.
- Saussure, P. P. H. De. 2009. Management of the Returning Traveler with Diarrhea. *Therap Adv Gastroenterol*. 2(6). 367–375.
- Sherlock, O., Schembri, M. A., Reisner, A., & Klemm, P. 2004. Novel Roles for the AIDA Adhesin from Diarrheagenic Escherichia coli: Cell Aggregation and Biofilm Formation.

- Journal of Bacteriology*. 186(23). 8058–8065.
- Steffen, R. 2017. Epidemiology of Travellers' Diarrhea. *Journal of Travel Medicine*. 24(1). 2–5.
- Steffen, R. 2018. Emerging Options for the Management of Travelers' Diarrhea. *Gastroenterology & Hepatology*. 14(12).
- Steffen, R., Hill, D. R., & DuPont, R. L. 2015. Traveler's Diarrhea: A Clinical Review. *JAMA*. 313(1). 71–80.
- Tang, F., & Saier, M. H. 2014. Transport proteins promoting *Escherichia coli* pathogenesis. *Microb Pathog*. 41–55.
- Torres, A. G., Zhou, X., & Kaper, J. B. 2005. Adherence of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains to Epithelial Cells. *Infection And Immunity*. 73(1).18–29.
- Vila, J., Vargas, M., Ruiz, J., Espasa, M., & Pujol, M. 2001. Susceptibility patterns of enteroaggregative *Escherichia coli* associated with traveller ' s diarrhoea : emergence of quinolone resistance. *J Med Microbiol*. 50. 996–1000.
- Wahyuni, N. W. M. S., Wirawan, I. M. A., & Hendrayana, M. A. 2019. Risks factors for diarrhea among travellers visiting Bali. *Public Health and Preventive Medicine Archive (PHPMA)*, 7(2), 121–126.
- Zhang, R., Gu, D., Huang, Y., Chan, E. W., Chen, G., & Chen, S. 2016. Comparative genetic characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* strains recovered from clinical and non-clinical settings. *Nature Publishing Group*. 1–9.