

KK
KKA
T.E.D. 47/11
Har
d

TESIS

DETEKSI *CHOLERA TOXIN* *PRODUCING VIBRIO CHOLERA* ISOLAT PERAIRAN DI SUNGAI KALIMAS SURABAYA



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

NARWATI
090710239 M

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2009**

**DETEKSI *CHOLERA TOXIN*
PRODUCING VIBRIO CHOLERAE
ISOLAT PERAIRAN DI SUNGAI KALIMAS SURABAYA**

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Pada Program Pasca Sarjana
Universitas Airlangga**

Oleh :

**NARWATI
090710239 M**

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Tanggal 23 Juni 2009

Lembar pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 23 Juni 2009

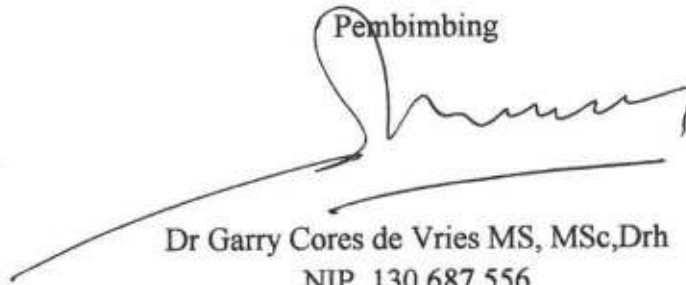
Oleh

Pembimbing Ketua



Dr H Eddy Bagus Wasito dr, MS, SpMK
NIP 130 676 011

Pembimbing



Dr Garry Cores de Vries MS, MSc, Drh
NIP 130 687 556

Mengetahui
Ketua Program Studi



Prof. Retno Handajani dr, MS, PhD
NIP 130 541 984

Telah diuji pada
Tanggal 23 Juni 2009
PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr Florentina Sustini, dr, MS
Anggota : 1. Dr H Eddy Bagus Wasito dr, MS, SpMK
2. Dr Garry Cores de Vries MS, MSc, Drh
3. Setio Harsono dr, MS, SpMK
4. Budiono dr, Mkes
5. Lindawati Alimsardjono dr, M.Kes, Sp.MK

UCAPAN TERIMA KASIH



Puji dan syukur yang tak terhingga saya panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah berkenan melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini dengan sebaik-baiknya. Tesis ini merupakan bagian akhir dari seluruh rangkaian kegiatan pendidikan Magister Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Kesempatan kali ini saya sampaikan dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati yang paling dalam ucapan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada :

H. Eddy Bagus Wasito dr, MS, SpMK, sebagai pembimbing ketua, yang telah penuh perhatian memberikan dorongan, arahan, masukan dan bimbingan sejak penulisan proposal hingga akhir penulisan tesis ini; beserta dosen dan staf.

Dr Garry Cores de Vries MS, MSc, Drh, juga sebagai pembimbing yang dengan penuh kesabaran telah banyak memberikan bimbingan, arahan, dan motivasi sehingga saya dapat menyelesaikan tesis dengan sebaik-baiknya.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia melalui Direktur Politeknik Kesehatan Departemen Kesehatan Surabaya, sebagai kepala Instansi tempat saya bekerja, yang telah memberikan dukungan moril berupa kesempatan dan materil untuk melanjutkan pendidikan Magister Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Pihak NAMRU-2 : Shannon D. Putnam, Ph. D selaku Director, Bacterial Disease Program, US NAMRU-2, Jakarta; Matthew R. Kasper, Ph.D selaku Co-Advisor I dan dra. Erlin Listiyaningsih, M.Kes selaku Co-Advisor II, yang telah memberikan kesempatan bagi saya untuk melakukan research di US NAMRU-2, Jakarta, Yanni Dirgantara beserta staf US NAMRU-2 yang telah banyak membantu pelaksanaan uji laboratorium selama saya di sana.

Prof Dr Fasichul Lisan Apt, selaku Rektor Universitas Airlangga Surabaya, yang telah memberikan kesempatan studi pendidikan Magister Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya serta membantu kelancaran administrasi (dana beasiswa) melalui pelaksanaan kerjasama dengan Politeknik Kesehatan Depkes Surabaya.

Prof Dr Muhammad Amin dr, SpP(K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya yang telah memberikan kesempatan studi pendidikan Magister di Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Prof Dr Harjanto JM dr, AIF, selaku Ketua Tim Koordinasi Program Studi Magister (TKPSM) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, yang telah banyak membantu memperlancar kegiatan yang berkenaan dengan pelaksanaan pendidikan. Beliau banyak memberikan arahan yang bermanfaat khususnya dalam memacu dan memotivasi dalam hal penyelesaian studi ini.

Prof Retno Handajani dr, MS, PhD, selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar (IKD) Fakultas Kedokteran Unair Surabaya, program Magister di Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya, yang telah memberikan arahan bagi kelancaran penyelesaian studi pada Setio Harsono dr, MS, SpMK, selaku Ketua Departemen Mikrobiologi FK Unair Surabaya dan Tim Penguji Tesis yang telah memberikan masukan bagi perbaikan tesis ini.

Teman-teman seangkatan ilmu kedokteran dasar, khususnya teman-teman minat studi mikrobiologi kedokteran dasar (Dra. Sulistiastutik, Kuswiyanto SSI; dr. Muh. Ali Shodikin, dr. Cherry Siregar, Ratna Wahyuni SSI dan Agrijanti SSI), yang telah banyak memberikan masukan dan dorongan pada penyelesaian tesis ini.

Teman-teman di Lab. Gastroenteritis TDC (Ibu Wahyu H dan Bp. Heri) yang telah memberikan semangat dan motivasi bagi penyelesaian tesis ini.

Ibunda tercinta, Ibu Painah, yang telah senantiasa dengan penuh kasih sayang dan kesabaran, membesarkan, mendidik, dan mendoakan tiada hentinya bagi kelancaran studi saya, walaupun saat penyusunan tesis ini beliau dalam keadaan sakit. Semoga Allah memberikan hidayah bagi kesembuhan beliau (amin). Doa saya kepada ayah tercinta, Dakir Singokromo (Alm) yang telah menanamkan sikap disiplin, memberi tauladan dan motivasi sehingga saya mampu menyelesaikan studi ini dengan baik, semoga Allah membalas amal baik beliau.

Suami tercinta, Joko Suprpto SST, dan anak-anakku tersayang, Adam Cahyo Putro dan Nadya Ramadhani, serta keluarga besar, yang telah memberikan dorongan semangat dan doa hingga saya dapat menyelesaikan pendidikan Magister ini.

Seluruh pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu, namun tanpa bantuan mereka, penelitian ini tidak akan berjalan dengan baik.

Akhirulkalimat, izinkan saya menyampaikan permohonan maaf yang sebesar-besarnya kepada semua pihak atas segala sesuatu yang kurang berkenan selama saya menempuh pendidikan Magister ini. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan karunia-Nya bagi kita semua. Amin

Surabaya, 23 Juni 2009

Penulis

SUMMARY

**DETECTION of CHOLERA TOXIN PRODUCING VIBRIO CHOLERAE
AQUATIC ISOLATES IN KALIMAS RIVER-SURABAYA**

Vibrio cholerae, a gram-negative bacteria belonging to the genus *Vibrio*, is the causative agent of the severe dehydrating diarrheal disease cholera. Cholera occurs endemically in many areas of the tropics, particularly in the part of South and South-East Asia and Africa. In 1999, cholera appeared in Latin America for the first time in the twentieth century. From 1817 to 1923 there were six pandemics of cholera and the seventh pandemic began in 1961 which the causative agent was believed originated from Sulawesi-Indonesia.

The purpose of this observational study is to detect *cholera toxin producing Vibrio cholerae* in aquatic environment of Kalimas River-Surabaya. Besides for calculate the bacterial density, abiotic factor, as temperature, power of Hydrogen, and salinity in the six points of collection were also examined.

The water samples were collected from six points along Kalimas River during rainy season (February to March 2009), and then put into an enrichment media (alkaline peptone water), filtered by 0,45 μ m pore size filter, and then streaked on to TCBS agar. Drop plate method was used to calculate the bacterial density in the water samples. As many as 1.5 ml of water samples were used for preparing template DNA for PCR method. After overnight incubation at 37°C, all yellow colonies were inoculated into polypeptone broth without NaCl and then these broth were incubated overnight at 37°C. Samples showing no growth in these broth estimated to be *Vibrio cholerae* and identified biochemically. DNA extraction were done to confirmed *ctxA* gene by PCR method. Other parameters namely temperature, pH, and salinity were measured according to standard procedures.

This study showed that *Vibrio cholerae* and *Vibrio alginolyticus* occur in six-point of water sample collection, point 4 of collection, contains *Vibrio alginolyticus*, only study none of the *V. cholerae* isolates harbours *ctxA* gene. The temperature ranged from 27.92 °C to 28.17°C, power of Hydrogen from 6.83-6.95 and salinity from 0.00395%-0.0047% and there are no statistically different (p -value > 0,05) in the abiotic parameters tested.

It is concluded that *Vibrio cholerae* isolated in this study are not belong to cholera toxin producing *Vibrio cholerae*. However, it is considered necessary to characterize determinant factor(s) in expression of virulence gene and to study dissemination of the CT gene-negative non-01 strains but harbour *toxR* gene regulating the enterotoxigenic factor(s) to assess the public health significance of the CT gene-negative non-01 strains distributed in the environment.

ABSTRACT

**DETECTION of CHOLERA TOXIN PRODUCING VIBRIO CHOLERAE
AQUATIC ISOLATES IN KALIMAS RIVER-SURABAYA**

The purpose of this observational study is to detect *cholera toxin producing Vibrio cholerae* in aquatic environment of Kalimas River-Surabaya. Besides for calculate the bacterial density, abiotic factor, as temperature, power of Hydrogen, and salinity in the six points of collection were also examined.

The water samples were collected from six points along Kalimas River during rainy season (February to March 2009), and then put into an enrichment media (alkaline peptone water), filtered by 0,45µm pore size filter, and then streaked on to TCBS agar. Drop plate method was used to calculate the bacterial density in the water samples. As many as 1.5 ml of water samples were used for preparing template DNA for PCR method. DNA extraction were done to confirmed *ctxA* gene by PCR method. Other parameters namely temperature, pH, and salinity were measured according.

This study showed that *Vibrio cholerae* and *Vibrio alginolyticus* occur in six-point of water sample collection, point 4 of collection, contains *Vibrio alginolyticus* only. These study, none of the *V. cholerae* isolates harbours *ctxA* gene. The temperature ranged from 27.92 °C to 28.17°C, power of Hydrogen from 6.83-6.95 and salinity from 0.00395%-0.0047% and there are no statistically different (p-value > 0,05) in the abiotic parameters tested.

It is concluded that *Vibrio cholerae* isolated in this study are not belong to cholera toxin producing *Vibrio cholerae*. However, it is considered necessary to characterize determinant factor(s) in expression of virulence gene and to study dissemination of the CT gene-negative non-01 strains but harbour *toxR* gene regulating the enterotoxin factor(s) to assess the public health significance of the CT gene-negative non-01 strains distributed in the environment.

Keyword : toxigenic Vibrio cholerae, temperature, pH, salinity, river water

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan Terima Kasih	vi
Summary	viii
Abstract	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 <i>Vibrio cholerae</i>	8
2.1.1 Fisiologi <i>Vibrio cholerae</i>	8
2.1.2 Struktur antigen dan klasifikasi biologi	9
2.1.3 Faktor-faktor virulensi	11
2.1.4 PCR untuk deteksi gen <i>ctxA</i>	16
2.2 Lingkungan	18
2.2.1 Lingkungan abiotik	18
2.2.2 Lingkungan biotik	22
2.3 <i>Vibrio cholerae</i> Toksigenik di Air	25
2.4 Distribusi Penyakit dan Pencemaran Air	25
2.5 Sungai Kalimas Surabaya	27
2.5.1 Struktur dan dimensi fisik Sungai Kalimas	28
2.5.2 Fungsi Sungai Kalimas	28
2.5.3 Kegiatan masyarakat di Sungai Kalimas	28
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	31
3.1 Kerangka Konseptual	31
3.2 Hipotesis	32

BAB 4	METODE PENELITIAN	33
4.1	Jenis Penelitian	33
4.2	Sampel Penelitian dan Besar Sampel	33
4.3	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	34
4.3.1	Variabel Penelitian	34
4.3.2	Definisi Operasional	34
4.4	Bahan Penelitian	36
4.5	Instrumen Penelitian	37
4.6	Lokasi dan Waktu Penelitian	38
4.7	Prosedur Pengumpulan Data	39
4.7.1	Cara pengumpulan data	39
4.7.2	Prosedur pengumpulan data	39
4.8	Pengolahan dan Analisis Data Penelitian	46
4.9	Kerangka Operasional Penelitian	47
BAB 5	HASIL PENELITIAN	48
5.1	Gambaran Pemanfaatan Air Sungai Kalimas Surabaya	48
5.2	Suhu Air Sungai Kalimas Surabaya	51
5.3	Asiditas Air Sungai Kalimas Surabaya	52
5.4	Salinitas Air Sungai Kalimas Surabaya	53
5.5	Identifikasi <i>Vibrio cholerae</i> di Sungai Kalimas Surabaya	55
BAB 6	PEMBAHASAN	58
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN	70
7.1	Kesimpulan	70
7.2	Saran	70

Daftar Pustaka

Lampiran

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 : Uji untuk Membedakan <i>Vibrio cholerae</i> Biotipe <i>El Tor</i> dan <i>Classical</i>	10
Tabel 2.2 : Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen <i>ctxA</i> <i>Vibrio cholerae</i>	18
Tabel 5.1 : Hasil Pengukuran Suhu Air di 6 Titik Sampling Air Sungai Kalimas Surabaya	51
Tabel 5.2 : Signifikasi Hasil Pengukuran Suhu Air di 6 Titik Sampling Sungai Kalimas Surabaya Bulan Pebruari - Maret 2009	52
Tabel 5.3 : Hasil Pengukuran Asiditas Air di 6 Titik Sampling Air Sungai Kalimas Surabaya Bulan Pebruari - Maret 2009	52
Tabel 5.4 : Signifikasi Hasil Pengukuran Asiditas Air di 6 Titik Sampling Sungai Kalimas Surabaya Bulan Pebruari-Maret 2009	53
Tabel 5.5 Hasil Pengukuran Salinitas Air di 6 Titik Sampling Air Sungai Kalimas Surabaya	54
Tabel 5.6 : Signifikasi Hasil Pengukuran Salinitas Air di 6 Titik Sampling Sungai Kalimas Surabaya Bulan Pebruari hingga Maret 2009	54
Tabel 5.7 : Hasil Identifikasi Isolat dalam Sampel Air Sungai Kalimas Surabaya	56

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 3.1 : Bagan kerangka konseptual deteksi <i>cholera toxin producing Vibrio cholerae</i>	31
Gambar 4.1 : Bagan desain penelitian <i>ecologic comparison study</i>	33
Gambar 5.1 : Lokasi sampling di titik 4 Sungai Kalimas Surabaya	49
Gambar 5.2 : Sungai sebagai tempat pembuangan tinja	50
Gambar 5.3 : Sungai sebagai tempat mandi dan cuci	50

DAFTAR SINGKATAN

AE buffer = "A" Elution buffer

AL buffer = "A" Lysis buffer

ATL buffer = "A" Tissue Lysis buffer

AW buffer = "A" Wash Buffer

bp = basepair

CFU = Colony Forming Unit

CTX Φ = filamen CTX bakteriofaga

dNTP = deoksiribonukleotida triphosphat

cAMP = cyclic Adenosin Monophosphat

kDa = kilo Dalton

L = liter

mL = mili Liter

PCR = Polymerase Chain Reaction

rpm = rotation per minutes = Rotasi mesin per menit

UV = Ultra Violet

WHO = World Health Organization

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1**PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang**

Vibrio cholerae merupakan agen penyebab penyakit kolera di beberapa bagian Asia, Afrika dan Amerika Latin (Khazaei *et al.*, 2005). Kolera yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae* toksigenik telah terjadi di Asia Tenggara (Chow *et al.*, 2001). Penyakit kolera merupakan penyakit bakteri yang diketahui menimbulkan pandemik. Laporan World Health Organization menyebutkan bahwa kolera epidemik telah terjadi pada lebih dari 75 negara di Amerika Selatan, Afrika dan Asia (WHO, 2000). Angka kematian tinggi penyakit kolera mencapai 60% jika tidak ditangani dan menurun hingga <1.0% jika segera ditangani (Mahalanabis *et al.*, 1992).

Kasus kolera yang dilaporkan ke WHO dalam kurun waktu 2006, sebanyak 236.896 kasus dari 52 negara dengan kematian sejumlah 6.311 (2,66%) (WHO, 2007). Sejak Agustus 2008 hingga 1 Desember 2008, di Zimbabwe terdapat 11.735 kasus kolera dengan 484 (4,12%) kematian yang dilaporkan ke WHO (WHO, 2008).

Di Indonesia, *surveillance* pada kasus kolera yang terjadi dari tahun 1993-1999 di 8 rumah sakit di Indonesia, yakni Jakarta, Padang, Medan, Batam, Pontianak, Makasar dan dua dari rumah sakit di Bali diperoleh 6.951 spesimen dari penderita diare akut. *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa ditemukan sejumlah 575 (8,3%) dan *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba ditemukan 14 (0,2%) (Simanjuntak *et al.*, 2001).

Di propinsi Papua-Indonesia, terdapat 105 kematian dari 718 (14,6%) kasus kolera dari bulan April hingga Agustus 2008. Kasus kolera ini terjadi di dua Kabupaten yakni Kabupaten Nabire sebanyak 666 kasus dengan 97 kematian (14,7%) serta Kabupaten Paniai dijumpai sejumlah 52 kasus kolera dengan 8 kematian (14,4%). Dari kasus tersebut diperoleh hasil uji laboratorium yang menunjukkan adanya infeksi bakteri *Vibrio cholera* serotype Ogawa dari *rectal swab* penderita dan keluarga yang kontak dengan penderita (Depkes, 2008).

Di Surabaya, hingga saat ini belum pernah dilaporkan terjadi *outbreak* kolera seperti yang terjadi di Papua. Hal ini menimbulkan suatu anggapan, apakah di Surabaya sudah terbebas dari *Vibrio cholerae* ataukah sistem pendataan kasus kolera di Surabaya yang kurang terjangkau pihak dinas kesehatan setempat. Kenyataan yang ada bahwa walau tidak dijumpai kasus kolera di Surabaya, namun penelitian yang dilakukan oleh Wasito *et al* pada 297 tinja diare dari pasien anak-anak dibawah usia 2 tahun dengan diagnosis klinis diare akut di Rumah Sakit dr. Soetomo Surabaya, 27 tinja diare (9%) mengandung *Vibrio cholerae* (Wasito *et al.*, 1995). Studi lain yang dilakukan Wasito *et al* (Wasito *et al.*, 2000) menemukan patogen usus *Vibrio cholerae* O1 sejumlah 8 (1,82%) dari 443 anak penderita diare yang dirawat inap di Rumah Sakit dr. Soetomo Surabaya. Hal ini juga diperkuat dengan adanya uji terhadap isolat klinis yang dikumpulkan selama 7 tahun sejak tahun 1993 yang dilakukan, sebanyak 110 isolat dinyatakan positif *Vibrio cholerae* dengan 107 serotype Ogawa (97,3%) dan 3 serotype Inaba (2,7%) (Wasito *et al.*, *In press*). Hal ini menunjukkan bahwa masih adanya risiko terjadinya transmisi penyakit kolera di Surabaya, utamanya melalui air yang terkontaminasi tinja penderita kolera.

Vibrio cholerae toksigenik dapat bertahan hidup dan mampu bermultiplikasi di lingkungan alam. Keberadaan *Vibrio cholerae* toksigenik pada saat tidak adanya kasus kolera memberikan dugaan bahwa *Vibrio cholerae* toksigenik berada di lingkungan, khususnya lingkungan perairan. Fakta keberadaan *Vibrio cholerae* toksigenik di lingkungan ditunjukkan dari studi yang telah dilakukan di Louisiana Gulf Coast United States, Hongkong, dan Australia. Isolat *Vibrio cholerae* dalam studi ini ditemukan di air, limbah, dan makanan serta isolat *Vibrio cholerae* ini mengandung gen *cholera toxin* (Minami *et al.*, 1991).

Vibrio cholerae toksigenik menghasilkan *cholera toxin* yang menjadi suatu *marker* yang penting untuk mengidentifikasi isolat yang berpotensi menimbulkan pandemik (Theron *et al.*, 2000). *Cholera toxin* merupakan faktor virulensi yang menimbulkan epidemik dan pandemik (Hung *et al.*, 2005; Withey & DiRita, 2006; Waldor, 2006). *Cholera toxin* termasuk *enterotoxin* yang terdiri dari dua polipeptida. Subunit A bertanggungjawab terhadap aktivasi *adenylate cyclase* di sel-sel epitel usus kecil; menginduksi sekresi air dan elektrolit, menyebabkan kehilangan banyak cairan. Subunit B terdiri dari 5 elemen identik bertanggungjawab untuk berikatan ke reseptor permukaan sel epitel, GM₁. Analisis molekuler mengungkapkan bahwa semua strain yang memiliki kapasitas menyebabkan kolera, mengandung gen-gen yang penting selama patogenesis penyakit pada manusia; termasuk gen yang menyandi *cholera toxin* (Faruque and Nair, 2001).

Negara-negara berkembang, berlokasi di wilayah tropis maupun subtropis, berpenduduk padat dan miskin, curah hujan tinggi serta sistem sanitasi kurang baik berpotensi menjadi sumber perjangkitan diare. Adanya pencemaran limbah

dalam suatu perairan mempunyai hubungan dengan jenis dan jumlah organisme dalam perairan tersebut (Feliatra, 1999). Tidak terkecuali perairan Kalimas Surabaya, yang mempunyai peranan penting dalam menunjang aktivitas masyarakat di sekitar Sungai Kalimas, termasuk sebagai salah satu sarana pembuangan tinja terutama bagi tunawisma, tukang becak dan pedagang asongan. Berdasarkan SK Gubernur Kepala Daerah Tingkat I Jawa Timur No. 93 tahun 1997 tentang Pola Pengelolaan Sungai Kalimas, salah satu alur Sungai Kalimas diarahkan sebagai tempat pembuangan air buangan dan pengambilan air untuk irigasi, air minum dan air industri bagi masyarakat Surabaya (Bappeko, 2005).

Sesuai peruntukannya, sungai Kalimas saat ini ditetapkan sebagai sungai kelas III (Dewi, 2003) yaitu perairan yang digunakan untuk budidaya ikan air tawar, peternakan dan pengairan pertamanan. Hasil pengujian oleh Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pemberantasan Penyakit Menular Surabaya tanggal 4 Desember 2008 menunjukkan bahwa air Sungai Kalimas yang diambil di belakang Grahadi Surabaya mempunyai nilai BOD (Biological Oxygen Demand) 8,8 mg/L; kriteria mutu menurut Perda Propinsi Jatim No.2 tahun 2008, nilai BOD yang masih diperkenankan untuk kriteria mutu air berdasarkan kelas III adalah 6 mg/L. Nilai DO (Dissolved Oxygen) diperoleh 0,3 mg/L dari yang dipersyaratkan 3 mg/L. Parameter ini merupakan sebagian dari indikator pencemaran air yang menunjukkan tingkat pencemaran air Sungai Kalimas ditinjau dari segi kimia anorganik. Indikator mikrobiologis yang terpantau antara lain adalah *total coliform* dan *fecal coliform*; diperoleh masing-masing $1,4 \times 10^5$ koloni/100 mL dan $2,6 \times 10^4$ koloni/100 mL. Angka ini melebihi baku mutu yang ditetapkan untuk air kelas III oleh pemerintah dalam Peraturan Daerah Propinsi

Jawa Timur No.2 tahun 2008 tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air yakni 1×10^6 koloni/100 mL untuk *total coliform* dan 2×10^5 koloni/100 mL untuk *fecal coliform*. Tingginya *total coliform* melebihi batas baku mutu air kelas III, menimbulkan asumsi adanya pencemaran mikrobiologis lainnya terutama kehadiran bakteri patogen, termasuk *Vibrio cholerae*. Asumsi ini diperkuat dengan adanya nilai asiditas 7 dan suhu air 30°C dalam pengujian oleh BBTKL & P2M tanggal 4 Desember 2008 yang memberikan kemungkinan bagi keberadaan bakteri *Vibrio cholerae* (BBTKL & P2M, 2008).

Pencemaran air sungai oleh limbah yang bersifat biologis yang berasal dari buangan domestik, industri pengolahan, sampah dan limbah peternakan, tidak hanya meningkatkan pertumbuhan bakteri *coliform* akan tetapi juga meningkatkan jumlah bakteri patogen seperti *Salmonella*, *Shigella* dan *Vibrio cholera* (Feliatra, 1999). Berdasarkan studi pendahuluan pada air Sungai Kalimas yang dilakukan pada 23 Desember 2008, air Sungai Kalimas digunakan untuk mandi, cuci, kakus (MCK) bagi para tunawisma/gelandangan. Kegiatan mandi yang dilakukan di perairan yang diduga mengandung *Vibrio cholerae* toksigenik merupakan faktor risiko ketika air sungai tertelan (misal : saat sikat gigi). Selain kegiatan tersebut, kegiatan mengkonsumsi ikan yang diambil dari perairan Sungai Kalimas sering dilakukan. Dikhawatirkan ikan yang dikonsumsi tersebut dimasak dengan tidak sempurna sehingga berpotensi memiliki risiko terjangkitnya kolera jika makanan tersebut mengandung *Vibrio cholerae*.

Keberadaan *Vibrio cholerae* toksigenik di Sungai Kalimas Surabaya berpotensi menimbulkan masalah kesehatan masyarakat. Masyarakat pengguna air Sungai Kalimas Surabaya berpotensi terkena kolera terutama jika tertelan dalam

melakukan kegiatan di Sungai Kalimas Surabaya. Sampai saat ini, belum adanya data tentang keberadaan *Vibrio cholerae* toksigenik di Sungai Kalimas Surabaya sehingga mendorong perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut.

1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Apakah terdapat perbedaan suhu, asiditas dan salinitas antar titik sampling Sungai Kalimas Surabaya?
- 1.2.2 Apakah terdapat perbedaan kepadatan *Vibrio cholerae* (CFU/mL) antar titik sampling Sungai Kalimas Surabaya?
- 1.2.3 Apakah *cholera toxin producing Vibrio cholerae* dapat diisolasi dari Sungai Kalimas Surabaya?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengetahui keberadaan *cholera toxin producing Vibrio cholerae* di Sungai Kalimas Surabaya

1.3.2 Tujuan khusus :

- 1.3.2.1 Mengukur suhu, asiditas, dan salinitas di 6 titik sampling Sungai Kalimas Surabaya.
- 1.3.2.2 Menghitung kepadatan *Vibrio cholerae* (CFU/mL) di 6 titik sampling Sungai Kalimas Surabaya.
- 1.3.2.3 Menganalisis perbedaan suhu, asiditas, salinitas, dan kepadatan *Vibrio cholerae* antar titik sampling Sungai Kalimas Surabaya.
- 1.3.2.4 Mengisolasi *cholera toxin producing Vibrio cholerae* isolat perairan di Sungai Kalimas Surabaya

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Keilmuan

- Memperkuat dugaan adanya peran faktor lingkungan dalam proses penularan penyakit kolera khususnya yang berasal dari lingkungan perairan Sungai Kalimas di Surabaya.
- Memperkuat dugaan bahwa lingkungan perairan (khususnya sungai Kalimas) merupakan habitat alami *Vibrio cholerae* toksigenik dengan ditemukannya kantung-kantung persembunyian *Vibrio cholerae* di lingkungan perairan.

1.4.2 Manfaat Terapan

Diharapkan dapat menjadi bahan pertimbangan bagi pengambil kebijakan di tingkat kabupaten, propinsi, nasional/internasional dalam menyusun strategi pengendalian penyakit kolera.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae tergolong famili *Vibrionaceae* yang merupakan bakteri batang pendek gram negatif, tidak membentuk spora, anaerobik fakultatif dan berukuran $0,5\mu\text{m} \times 1,5-3 \mu\text{m}$. Bakteri *Vibrio cholerae* ini bergerak sangat aktif dengan sebuah *polar flagella* yang halus (monotrik) (Joklik *et al.*, 1992; Staf Pengajar FK UI, 1993).

2.1.1 Fisiologi *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae bersifat anaerob fakultatif. Suhu pertumbuhan antara 18-37°C. *Vibrio cholerae* dapat melakukan proses metabolisme dalam kondisi aerob maupun anaerob melalui proses fermentasi. Tumbuh pada berbagai media termasuk media tertentu yang mengandung garam mineral dan asparagin sebagai sumber karbon dan nitrogen. Pertumbuhan sangat baik pada pH 7,0; namun juga mampu tumbuh pada pH hingga 9,0. *Vibrio* dapat tumbuh pada pH 8,5-9,5. *Vibrio cholerae* sangat sensitif terhadap pH kurang dari 6,0. *Vibrio cholerae* meragi sukrosa, manosa tanpa menghasilkan gas, serta mampu meragi nitrit namun tidak mampu meragi arabinosa. Ciri khas lain yang membedakan dari bakteri usus gram negatif lain yang tumbuh pada agar darah adalah menghasilkan oksidasi positif (Brooks *et al.*, 2001).

Biakan *Vibrio cholerae* pada air pepton alkalis akan tampak pertumbuhan setelah 6 jam pada suhu ruangan. Medium ini berfungsi sebagai medium transport untuk feses atau usapan dubur dari tersangka kasus kolera. Pada medium air pepton

alkalis (banyak mengandung triptofan dan nitrat) akan membentuk indol; penambahan asam sulfat akan membentuk warna merah (tes nitroso indol positif) (Staf Pengajar FK UI, 1993).

Vibrio cholerae mampu mengkatabolisme D-Glukosa dan karbohidrat lain dengan menghasilkan asam tetapi tidak menghasilkan gas; tumbuh pada medium selektif *Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose agar* (TCBS) dan *Tellurit Taurocholate Gelatin Agar* serta umumnya mempunyai oksidase positif (Thompson *et al.*, 2004). Di dalam media kultur, *Vibrio cholerae* menghasilkan bentuk koloni cembung, halus dan bulat keruh serta bergranul bila disinari (Joklik *et al.*, 1992).

Fermentasi sukrosa dan manosa tanpa adanya pemecahan arabinosa serta menghasilkan oksidase positif (dengan adanya perubahan warna menjadi merah muda) merupakan karakteristik pertumbuhan *Vibrio cholerae*. *Vibrio cholerae* O1 sangat sensitif terhadap senyawa O/129 (2,4-diamine-6,7-diisopropylpteridine phosphat) sedangkan isolat *Vibrio cholerae* O139 resisten terhadap O/129 (Albert *et al.*, 1993).

2.1.2 Struktur antigen dan klasifikasi biologi

Antigen yang penting dalam spesifikasi serologi *Vibrio cholerae* adalah antigen O atau somatik antigen. Antigen O *Vibrio cholerae* adalah termostabil polisakarida; merupakan bagian dari komponen lipopolisakarida (LPS) dari dinding sel.

Saat ini terdapat lebih dari 200 serogroup yang telah teridentifikasi, tetapi hanya serogroup O1 dan O139 yang dikaitkan dengan epidemik kolera (Sack *et al.*, 2004). Kunci konfirmasi untuk identifikasi *Vibrio cholerae* O1 adalah pengagglutinasian oleh *polyvalent* antisera antigen O1. Berdasarkan antibodi

monoklonal, uji agglutinasi digunakan untuk menguji koloni-koloni yang diisolasi dari sampel diare. Organisme yang mengagglutinati antisera O1 dapat dilaporkan sebagai *Vibrio cholerae* O1; *Vibrio cholerae* yang tidak bereaksi dengan antisera O1 dikenal sebagai *Vibrio cholerae Non-Agglutinable (V.cholerae -non O1)* (Kaper *et al.*, 1995).

Serogroup *Vibrio cholerae* O1 dibagi menjadi 3 serotype yakni Ogawa, Inaba dan Hikojima, yang merupakan serotype yang jarang diisolasi. Penggolongan ini didasarkan atas reaksi serologi yakni antigen O1 yang terdiri dari tiga jenis : AB (Ogawa), AC (Inaba) dan ABC (Hikojima), dengan antigen A dimiliki oleh semua galur *Vibrio cholerae* O1. Perubahan dari Inaba ke Ogawa adalah peristiwa yang jarang dibandingkan dengan frekuensi perubahan dari strain Ogawa ke Inaba yang dapat terjadi kira-kira 10^{-3} (Manning *et al.*, 1994).

Vibrio cholerae dibagi menjadi dua biotype yakni *Classical* dan *El Tor*; semua kombinasi antigen (A,B,C) dapat dijumpai. Untuk menentukan perbedaan biotype *El Tor* dan *Classical*, dilakukan uji sebagai berikut :

Tabel 2.1 Uji untuk Membedakan *Vibrio cholerae* Biotipe *El Tor* dan *Classical*

No	Jenis Uji	Biotipe <i>El Tor</i>	Biotipe <i>Classical</i>
1	<i>Voges-Proskauer</i>	+ (merah)	- (kuning)
2	<i>Chicken erythrocyte agglutination</i>	+ (agglutinasi)	- (non-agglutinasi)
3	<i>Polymyxin B sensitivity, 50 IU</i>	- (resisten)	+ (sensitif)
4	<i>Group IV Cholerae phage sensitivity</i>	- (tidak lisis)	+ (lisis)

Sumber : Bradford, *et al* (1994)

Biotype *El Tor* menghasilkan *acetylmethylcarbinol* (acetoin) dari hasil metabolisme glukosa ditunjukkan dengan perubahan warna merah pada uji *Voges-Proskauer*.

Vibrio cholerae O139 tidak menghasilkan lipopolisakarida. Seperti halnya strain *Vibrio cholerae* non-O1 yang lain, *Vibrio cholerae* O139 membuat sebuah polisakarida kapsul; sedangkan polisakarida tidak terdapat pada *Vibrio cholerae* O1. Semua anggota genus *Vibrio* mempunyai antigen-H yang sifatnya tidak tahan terhadap panas (*heat labile*). Antibodi terhadap antigen H mungkin tidak terlibat dalam melindungi inang yang sensitif (Brooks *et al.*, 2001).

2.1.3 Faktor-faktor virulensi

Vibrio cholerae masuk ke dalam saluran pencernaan dengan mengadakan perlekatan pada epitel sel usus halus. Kemampuan yang dimiliki tahap awal bakteri ini, selanjutnya akan menimbulkan kemampuan tahap yang kedua, yakni bakteri akan melakukan perbanyakan diri. Selama kejadian tahap yang kedua, *Vibrio cholerae* akan mampu memproduksi bahan sebagai hasil pada proses metabolisme; dimana beberapa bahan tersebut merupakan penyebab diare. Adapun bahan metabolit yang ikut berperan antara lain :

a. Neuraminidase

Vibrio cholerae menghasilkan *neuraminidase* yang dapat meningkatkan respon *cholera toxin*. Molekul G_{M1} (gangliomonosida) yang terdapat pada sel permukaan usus halus merupakan hasil katalisasi *ganglioside* oleh *neuraminidase*. Molekul G_{M1} ini akan berikatan dengan subunit B pentamer. Peningkatan efek *cholera toxin* ini disertai dengan peningkatan internalisasi *cholera toxin* pada sel (Haksar *et al.*, 1974).

b. Disulfide Isomerase

Merupakan enzim yang berfungsi sebagai katalisator pembentukan subunit A *cholerae toxin*. Terjadinya mutasi gen penyandi protein subunit A ini akan menimbulkan degradasi dari monomer subunit B pada periplasma, sehingga tidak menimbulkan terbentuknya molekul pentamer subunit B (Hardy *et al.*, 1988)

c. Protease

Enzim ini berfungsi memecah subunit A yang merupakan bagian *cholera toxin*, menjadi protein subunit A1 dan A2. Tahapan pemecahan ini penting untuk terjadinya aktivasi *cholera toxin*. Selain itu, enzim ini merupakan *metalloenzyme* Zn yang berfungsi memecah *fibronectin*, *mucine* dan *lactoferrin* (Finkelstein *et al.*, 1983).

2.1.3.1 Enterotoksin

Enterotoksin *Vibrio cholerae* atau kholeragen merupakan eksotoksin yang dikeluarkan bakteri *Vibrio cholerae* toksigenik yang masih hidup dengan susunan yang sangat kompleks. *Cholera toxin* dihasilkan oleh *Vibrio cholerae* toksigenik ketika bakteri ini berkolonisasi di usus kecil. Gen yang mengkode *cholera toxin* adalah *ctxAB*. (*small intestine*) (Faruque *et al.*, 1998). Produksi *cholera toxin* menjadi petanda penting (marker) untuk mengidentifikasi isolat yang berpotensi menimbulkan epidemik. Identifikasi tersebut bermanfaat dalam mendiagnosis kolera, karena hanya strain yang menghasilkan toksin yang dikaitkan dengan diare cair akut dan epidemik (Finkelstein, 1988).

Saat ini hanya serogroup *Vibrio cholerae* O1 dan O139 yang diyakini berpotensi menimbulkan epidemik kolera yang dikarakteristikan dengan diare cair akut; namun beberapa strain *Vibrio cholerae* O1 tidak menghasilkan *cholera toxin*

(Theron *et al.*, 2000). Selain O139, *Vibrio cholera* O1 menghasilkan *cholera toxin* yang merupakan salah satu faktor virulensi selama infeksi (Hung *et al.*, 2005; Withey and DiRita, 2006; Waldor, 2006).

Cholera toxin disandi oleh gen *ctx*. *Cholera toxin* merupakan protein oligometrik dengan berat molekul 84 kDa (Brooks *et al.*, 2001); terdiri atas 98% protein, 1% karbohidrat, 1% lipid; terbagi dalam dua subunit yaitu subunit A dan subunit B. Ratio antara subunit B dan subunit A adalah 5 : 1. Subunit A bertanggung jawab atas sifat-sifat biologis; enzimatis spesifik yang bertindak secara intraseluler dalam patogenesis penyakit. Subunit B bertanggung jawab terhadap terjadinya perlekatan untuk mengikat holotoksin ke reseptor sel usus inang (Wachsmuth *et al.*, 1994).

Subunit A matur mempunyai berat molekul 27,2 kDa. Pemecahan subunit A menggunakan enzim proteolitik; menghasilkan dua rantai peptida, 195-residue A_1 peptide dengan berat molekul 21,8 kDa dan 45-residue A_2 peptide dengan berat molekul 5,4 kDa. Peptida A_1 dan A_2 dihubungkan dengan sebuah ikatan disulfida sebelum proses internalisasi. Peptida A_1 bertanggung jawab terhadap aktivitas toksin, tidak mempunyai sifat imunogen dan tidak terjadi netralisasi oleh antisera anti *cholera toxin*. Peptida A_2 berfungsi sebagai penghubung antara subunit A dengan subunit B serta diperkirakan juga berperan dalam stabilisasi terhadap kompleks subunit A sebelum beraksi pada sel (Wachsmuth *et al.*, 1994).

Subunit B terdiri dari 5 elemen yang identik yang bertanggungjawab untuk mengikat ke reseptor permukaan sel epitel, G_{MI} . Subunit B matur berisi 103 asam amino dengan berat masing-masing subunit B 11,6 kDa. Formasi dari ikatan disulfida di dalam subunit A dan B dikatalisasi oleh enzim disulfida isomerase.

Protein subunit B berperan dalam pengikatan reseptor gangliosida G_{M1} monogangliosida membran sel usus halus, dengan kata lain terjadinya interaksi antara *cholera toxin* dengan reseptor sel epitel usus diperantarai oleh subunit B (Wachsmuth *et al.*, 1994).

Penambahan kholeragenoid subunit B atau G_{M1} pada usus kelinci sebelum penambahan *cholera toxin* akan menghambat sekresi cairan; sedangkan protein subunit A berperan di dalam pengaktifan *adenylate cyclase* dari sel mukosa usus guna meningkatkan kadar *cyclic adenosin monophosphate* (cAMP) dalam sel. Peningkatan kadar cAMP intraseluler ini menyebabkan terjadinya sekresi cairan sel beserta elektrolit (Na, K, Ca, Cl, Bicarbonat, Fosfat, dan lain-lain) secara berlebihan (Kaper *et al.*, 1995).

Gen-gen kromosom yang mengkode subunit A adalah *ctxA* dan gen *ctxB* untuk subunit B. Heterogenitas di dalam gen *ctxB* telah dilaporkan pada tahun 1900-an. Heterogenitas ini menunjukkan adanya substitusi asam amino residu pada posisi 39, 46 dan 68, yang menyebabkan terjadinya perubahan genotype strain O1 *Vibrio cholerae* menjadi 3 genotype. Perubahan genetik ini dapat menimbulkan perubahan di dalam manifestasi klinis dari kolera (Safa *et al.*, 2008). Walaupun dampak patogenitas toksin kolera klasikal pada strain *El Tor* belum jelas, namun kolera yang disebabkan biotype klasikal memiliki manifestasi penyakit yang lebih berat; biotype *El Tor* dianggap lebih mampu bertahan hidup di dalam lingkungan (Kaper *et al.*, 1995 dan Faruque *et al.*, 1998).

2.1.3.2 Pili

Selain enterotoksin, timbulnya penyakit didukung dengan adanya pili yang berfungsi untuk melekatkan diri pada sel usus hospes, yaitu pada mikrovili di daerah *brush border* dari sel epitel, selanjutnya mengadakan kolonisasi dan menghasilkan enterotoksin. Bagian yang merupakan protein adhesi terletak pada ujung pili dengan berat molekul 38 kDa. Protein adhesi lain dijumpai juga pada *outer membrane protein (OMP)* dengan berat molekul 76 kDa (Tim Mikrobiologi FK Unibraw, 2003).

2.1.3.3 Motilitas

Motilitas juga berperan dalam menentukan terjadinya perlekatan dan patogenitas. *Vibrio cholerae* yang tidak motil, tidak dapat menimbulkan penyakit kolera walaupun menghasilkan enterotoksin (Tim Mikrobiologi FK Unibraw, 2003).

Strain *Vibrio cholerae* O1 Ogawa dan Inaba yang motil, mampu membunuh hewan coba (*mice*) setelah menelan 10^8 *colony forming unit* (CFU) (sedikitnya 100-1000 *lethal doses* minimal) dibandingkan dengan strain *Vibrio cholerae* O1 Ogawa dan Inaba yang tidak motil. Mortalitas pada hewan coba mencapai 32% dalam waktu 36 jam disebabkan oleh strain nonmotil (10 dari 13 strain nonmotil yang diuji); sedangkan kematian yang disebabkan strain *Vibrio cholerae* O1 motil mencapai 100%. Penurunan sifat virulensi strain nonmotil dikaitkan dengan penurunan kemampuan menyerap segmen permukaan usus hewan coba (Guentzel and Berry, 1975).

2.1.3.4 Mucinase

Mucinase berperan dalam melakukan penetrasi ke dalam lapisan mukus dari usus halus dan hanya diproduksi oleh strain *Vibrio cholerae* O1 yang virulen (Tim Mikrobiologi FK Unibraw, 2003).

2.1.4. PCR untuk deteksi gen *ctxA*

Dalam buku “Teori dan Aplikasi *Polymerase Chain Reaction*” (Yuwono, 2006) reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction/PCR*) adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*. Keunggulan metode PCR antara lain : 1) hasil lebih spesifik dan sangat sensitif. Sensitivitas PCR tersebut dapat digunakan untuk melipatgandakan satu molekul DNA; 2) pelipatgandaan fragmen DNA dapat dilakukan dengan cepat; 3) komponen yang diperlukan dalam proses PCR jumlahnya sangat sedikit.

Dalam prinsip PCR, reaksi pelipatgandaan suatu fragmen DNA diawali dengan denaturasi DNA *template* (cetakan) sehingga rantai DNA yang berantai ganda (*double stranded*) akan terpisah menjadi rantai tunggal (*single stranded*). Denaturasi DNA dilakukan dengan menggunakan panas (95°C) selama 1-2 menit, kemudian suhu diturunkan menjadi 55°C, sehingga *primer* akan menempel (*annealing*) pada cetakan yang telah terpisah menjadi rantai tunggal. *Primer* akan membentuk jembatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen *primer*. *Primer* merupakan oligonukleotida yang mempunyai sekuen yang identik dengan rantai DNA cetakan pada ujung 5'fosfat serta pada ujung 3'-OH rantai DNA cetakan yang lain.

Setelah dilakukan annealing/perlekatan oligonukleotida primer dengan DNA cetakan, suhu inkubasi dinaikkan menjadi 72°C selama 1,5 menit, sehingga DNA polimerase akan melakukan polimerisasi rantai DNA yang baru berdasarkan informasi yang ada dalam cetakan. Kemudian rantai DNA yang baru akan membentuk jembatan hidrogen dengan DNA cetakan. DNA rantai ganda yang terbentuk dengan adanya ikatan hidrogen antara rantai cetakan dengan rantai DNA baru hasil polimerisasi selanjutnya akan didenaturasi lagi dengan menaikkan suhu inkubasi menjadi 95°C. Rantai DNA yang baru tersebut selanjutnya akan berfungsi sebagai cetakan bagi reaksi polimerisasi berikutnya.

Metode yang digunakan untuk mendeteksi toksin kolera di dalam laboratorium mikrobiologi klinis sejauh ini berdasarkan pada properti imunologi dari *cholera toxin* atau sebuah spesifik DNA sequen yang mengkode *cholera toxin* di dalam kromosom bakteri (Hoshino *et al.*, 1998).

Kedua metode kemudian dibatasi penggunaannya di dalam praktek ketika berhadapan dengan sejumlah besar isolat-isolat klinis atau lingkungan di dalam waktu yang singkat (Hoshino *et al.*, 1998). Rivera *et al* (Rivera *et al.*, 2003) melaporkan bahwa penggunaan teknik PCR terhadap sampel air memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan teknik mikrobiologi konvensional dalam mendiagnosis penyakit kolera. Metode PCR berdasarkan amplifikasi dari target sekuen telah dilaporkan oleh beberapa sukarelawan (Shangkuan *et al.*, 1995). Pendekatan dengan PCR assay konvensional sering membutuhkan banyak waktu dan kurang cocok untuk digunakan dalam diagnosis laboratorium umum serta screening dengan skala yang besar (Ge *et al.*, 2002)

Tabel 2.2 Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen *ctxA* *Vibrio cholerae*

Primers	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Nucleotide Position
<i>ctxA</i>	CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC	564	73-94 614-636

2.2 Lingkungan

Ekologi bagi kelangsungan hidup *Vibrio cholerae* di lingkungan akuatik didasarkan pada faktor-faktor sebagai berikut :

2.2.1 Lingkungan abiotik

2.2.1.1 Air

Vibrio cholerae adalah penghuni alami lingkungan akuatik; sering diisolasi dari lingkungan akuatik termasuk sungai (Ghosh *et al.*, 1994). Transmisi kolera terutama melalui konsumsi air yang tercemar dengan tinja atau muntahan pasien kolera dan sangat jarang dijumpai pada tinja *asymptomatic carriers* (Benenson, 1990).

Epidemik kolera di Afrika telah dikaitkan dengan mengkonsumsi makanan dan air yang berasal dari sumber yang tidak aman, seperti mandi dan meminum air danau (Birmingham *et al.*, 1997) serta meminum air sungai (Swerdlow *et al.*, 1997). Studi dari Shapiro *et al* (Shapiro *et al.*, 1999) menemukan bahwa sumber infeksi dari penyakit kolera pada penduduk di sekitar danau Victoria adalah berasal dari air danau yang digunakan sebagai sumber air minum.

2.2.1.2 Nutrisi

Vibrio cholerae O1 bersifat fakultatif anaerob, energi diperoleh dari oksigen selama respirasi dan melalui proses fermentasi jika oksigen tidak tersedia. *Vibrio cholerae* dapat tumbuh di media yang berisi karbohidrat, utamanya glukosa, seperti halnya nitrogen, sulfur, fosfat dan sodium. Na⁺ sangat penting bagi pertumbuhan

Vibrio cholerae. Strain toksigenik *Vibrio cholerae* O1 biotype *El Tor* membutuhkan Na^+ untuk *survive* jika nutrisi lain tidak terpenuhi; sebaliknya, dapat tumbuh dengan cepat dalam kondisi disertai nutrisi lainnya. Kebutuhan ion natrium (Na^+) tidak dapat digantikan dengan logam alkali ion lithium (Li^+) dan kalium (K^+); namun ketika Na^+ tersedia, penambahan Ca^+ dan Mg^+ membantu memperpanjang *survival* *Vibrio cholerae* (Borroto, 1997).

Strain *Vibrio cholerae* O1 yang berasal dari klinis (biotype *Classical* dan *El Tor*) dapat *survive* hingga 12 hari di dalam air bebas klorinasi yang mengandung ferri oksida (Fe_2O_3). Studi Patel *et al* menemukan bahwa kelangsungan hidup terlama *Vibrio cholerae* non O1 76 hari, *Vibrio cholerae* O1 biotype *El Tor* 52 hari dan *Vibrio cholerae* biotype *classical* 47 hari dalam lingkungan laboratorium (Patel *et al.*, 2004).

2.2.1.3 Salinitas

Salinitas yang sesuai bagi pertumbuhan *Vibrio cholerae* O1 toksigenik biotype *El Tor* adalah 25 gram tiap 1000 mL. Konsentrasi NaCl yang optimal bagi *Vibrio cholerae* untuk *survive* adalah 2%, meskipun konsentrasi antara 0,25%-3,0% juga mendukung. Pertumbuhan *Vibrio cholerae* bisa terhambat oleh kehadiran *magnesium sulfate* (Borroto, 1997).

Vibrio cholerae dapat tumbuh di lingkungan aquatik dengan kadar garam (*sodium chloride*) yang tinggi (45 gr per 1000 mL). Studi lain menemukan bahwa organisme ini lebih menyukai kadar garam NaCl sedang (15-25 gram per 1000 mL) dan dapat tumbuh dalam sistem dengan 1% *triptone* (dengan atau tanpa NaCl). Ini mengindikasikan bahwa *tryptone* mempunyai kecukupan Na^+ untuk mendukung pertumbuhan organisme (Borroto, 1997).

Vibrio cholerae O1 toksigenik biotype *El Tor* dapat bertahan tanpa didukung nutrisi di dalam air hangat dengan salinitas 2,5 -30 gram per 1000 mL tetapi salinitas yang optimal bagi kelangsungan hidupnya adalah 20 gram per 1000 mL. Strain toksigenik dan nontoksigenik *Vibrio cholerae* biotype *El Tor* telah diisolasi dari air payau lingkungan muara dan perairan pantai. *Vibrio cholerae* O1 mampu menghasilkan *cholera toxin* membutuhkan salinitas antara 20-25 gram per 1000 mL (Borroto, 1997).

Kehadiran *Vibrio cholerae* tidak terbatas pada lingkungan muara, karena kebutuhan salinitas dapat dipenuhi melalui suatu konsentrasi nutrisi yang cukup di lingkungan *freshwater*. Miller *et al* (Miller *et al.*, 1986) menemukan bahwa *Vibrio cholerae* mampu menghasilkan toksin setelah 64 hari pemaparan terhadap salinitas yang rendah (0,05%). *Vibrio cholerae* juga mampu bertahan di lingkungan *freshwater* untuk waktu yang lama.

Di Queensland, Australia, toksigenik *Vibrio cholerae* O1 biotype *El Tor* dideteksi selama 2 bulan di sungai yang tidak terkontaminasi tinja manusia. Studi ini menyimpulkan bahwa organisme tidak hanya mampu bertahan hidup, namun juga mampu bermultiplikasi di air sungai (Islam *et al.*, 1993).

2.2.1.4 Suhu

Suhu optimum merupakan rentang suhu bagi pertumbuhan terbaik organisme (Gupte, 1982). Suhu optimum bagi *Vibrio cholerae* O1 toksigenik bervariasi antara 30°C hingga 37°C. Studi Miller *et al* (Miller *et al.*, 1984) mengindikasikan beberapa hal dari toksigenik *Vibrio cholerae* O1, antara lain :

- mampu *survive* sedikitnya 70 hari pada suhu 25°C dalam larutan garam laut (*solution of sea salt*)
- *Vibrio cholerae* O1 tidak dapat *survive* lebih dari 45 hari pada suhu 4°C dengan salinitas optimum (2%), tanpa maupun dengan adanya nutrisi
- Mampu *survive* selama periode yang lama di dalam air hangat, tidak mengandung nutrisi yang mempunyai salinitas 0.25%-3.0%; pH 8.0
- Pertumbuhan *Vibrio cholerae* O1 yang cepat dapat diamati pada kondisi dalam air hangat dengan salinitas 0.25%-3.0%, pH 8.0 dengan penambahan nutrisi.

Studi Huq *et al*, 1984 menunjukkan bahwa suhu air yang meningkat secara signifikan akan berpengaruh pada penempelan dan multiplikasi sel-sel *Vibrio cholerae* pada copepoda. Penempelan sel-sel *Vibrio cholerae* pada copepoda yang terbesar dijumpai pada suhu 25°C dan 30°C (Huq *et al*, 1984).

2.2.1.5 Asiditas

Merupakan parameter kimia perairan yang menunjukkan jumlah ion H⁺ yang terurai dalam air. Toksigenik *Vibrio cholerae* O1 biotype *El Tor* toleran terhadap lingkungan alkalin (basa) dan sangat sensitif pada asiditas (Miller *et al.*, 1986).

Asiditas optimal bagi kelangsungan hidup *Vibrio cholerae* pada suhu air 25°C, salinitas sedang (2%) adalah asiditas 7-8,5; sedangkan asiditas 7,5-9 pada salinitas rendah (0,05%). Kelangsungan hidup semua strain *Vibrio cholerae* meningkat dengan adanya peningkatan asiditas (Patel *et al.*, 2004).

2.2.1.6 Sinar matahari

Asam nukleat *Vibrio cholerae* menyerap energi sinar UV, menyebabkan sel-sel *Vibrio cholerae* menjadi rusak. *Vibrio cholerae* O1 toksigenik menunjukkan sedikit resisten terhadap radiasi sinar UV (Borroto, 1997). Sebuah studi yang menggunakan sinar matahari untuk mendesinfeksi air minum telah dilakukan di Andes (Tauxe and Blake, 1992).

2.2.1.7 Curah hujan

Curah hujan yang tinggi bisa mengarah pada perubahan dalam aliran sistem air dan untuk sumber air permukaan, curah hujan yang tinggi dapat mengarah ke meluapnya badan air yang dimungkinkan bercampur dengan sistem limbah, diikuti pencemaran air oleh kotoran (tinja) ke dalam sungai (Hunter, 2003).

2.2.2 Lingkungan biotik

2.2.2.1 *Aquatik macrophytes*

Toksigenik *Vibrio cholerae* O1 biotype *El Tor* telah diisolasi dari tanaman air (*seawater* dan *fresh water*). Di Bangladesh telah diisolasi toksigenik *Vibrio cholerae* O1 biotype *El Tor* dari akar tanaman *Eichhornia crassipes*, sebuah tanaman makrophyta yang dikenal dengan bunga bakung air (*water hyacinth*). Perlekatan organisme di akar tanaman ini dimaksudkan untuk mendukung kelangsungan hidup *Vibrio cholerae* O1 (Borroto, 1997).

Studi laboratorium yang dilakukan Islam *et al* (Islam *et al.*, 1990) diperoleh bahwa dibawah kondisi laboratorium, strain toksigenik dari serogroup O1 biotype *El Tor* yang diuji bertahan hidup dalam waktu yang panjang dengan menempel pada tanaman makrophyta *Lemna minor*. *Vibrio cholerae* mengeluarkan enzim mucinase;

dianggap sebagai salah satu enzim yang berperan dalam faktor virulensi. Mucinase mendegradasi *mucilage* tanaman air, *Lemna minor*; digunakan untuk mendukung kelangsungan hidup *Vibrio cholerae* (Islam *et al.*, 1990)

2.2.2.2 *Phytoplankton dan zooplankton*

Kelangsungan hidup *Vibrio cholerae* di dalam air didukung dengan keberadaan copepoda. Penempelan *Vibrio cholerae* pada copepoda yang hidup dinyatakan merupakan faktor yang penting dari ekologi *Vibrio cholerae* di lingkungan aquatik. *Vibrio cholerae* mengeluarkan kitinase; sebuah enzim yang memungkinkan untuk mencerna kitin dan digunakan sebagai sumber nutrisi bagi *Vibrio cholerae*. Perlekatan (*adhesion*) pada permukaan kitin menyediakan resistensi yang lebih terhadap tingkat asiditas dan temperatur yang rendah. Terdapat hipotesis bahwa perkembangan (*culturable*) vibrio di lingkungan aquatik, melekat pada plankton. Hal ini bertujuan agar vibrio dapat bertahan terhadap perubahan temperatur, salinitas, asiditas dan konsentrasi nutrisi sehingga untuk beradaptasi terhadap perubahan tersebut, vibrio memasuki kondisi “viable but nonculturable” (VBNC) selama periode tertentu. Menurut hipotesis ini, sekali kondisi pertumbuhan kembali menguntungkan, *Vibrio cholerae* O1 dapat kembali ke kondisi *culturable* dan bisa mengancam terjadinya epidemik jika plankton memuncak yang berkontribusi terhadap reproduksi *Vibrio cholerae* (Borroto, 1997).

Vibrio cholerae O1 yang belum diketahui toksigeniknya telah dideteksi dalam kondisi VBNC di specimen phytoplankton dari spesies *Anabaena variabilis*, suatu cyanobacteria yang dikumpulkan dari sebuah kolam di Dacca, Bangladesh. Tidak ada kumpulan spesies yang telah diamati dari genus seperti *Euglena* dan *Phacus*.

Hipotesis bahwa *Vibrio cholerae* menggunakan produk ekstraseluler dilepaskan dari *A. Variabilis* selama tersedianya nutrisi dan garam diatas permukaan *mucilaginous* dari alga biru kehijauan yang memungkinkan *Vibrio cholerae* bertahan selama periode yang lama di lingkungan *freshwater*. Mereka juga mengajukan bahwa fotosintesis oleh *A. Variabilis* menyediakan oksigen untuk respirasi aerobik *Vibrio cholerae* O1 dan jasad renik lainnya, hasil respirasi pada gilirannya merupakan sumber CO₂ untuk *A. Variabilis*. Disimpulkan bahwa *Vibrio cholerae* O1 pada kondisi VBNC digabungkan dengan *A. Variabilis* dan mungkin dengan spesies lainnya dari alga biru kehijauan dengan suatu permukaan *mucilaginous*, yang mana menyiapkan tempat ekologi di ekosistem muara dan *freshwater* (Borroto, 1997).

2.2.2.3 Ikan, *molusca* dan *crustacea*

Strain-strain *Vibrio cholerae* nontoksigenik serogroup O1 biotype *El Tor* telah diisolasi dari tiram (*Crassostrea virginica*) yang ditemukan di air muara Florida. Pada tahun 1991, *Vibrio cholerae* O1 (yang tidak diteliti sifat toksigeniknya) telah ditemukan pada ikan dan *molusca* di air pantai Lima-Peru (Borroto, 1997).

Permukaan kitin dari ikan, *Molusca* dan *Crustacea* merupakan substrat bagi reproduksi organisme patogen termasuk *Vibrio cholerae*. Studi epidemiologi mengungkapkan adanya suatu hubungan antara insiden kolera dengan mengkonsumsi makanan laut yang dimasak kurang sempurna (Borroto, 1997).

2.2.2.4 Burung-burung air

Di Amerika Serikat, *Vibrio cholerae* serogroup O1 biotype *El Tor* telah diisolasi pada tahun 1986 dan 1987 dari feces burung bangau (*Ardea herodias*) di Colorado dan Utah tetapi tidak dari sampel air yang dikumpulkan dari habitat

burung-burung tersebut. Hal ini disimpulkan bahwa burung-burung aquatik bisa jadi pembawa agent patogenik dan berkontribusi terhadap penyebaran *Vibrio cholerae* (Borroto, 1997).

2.3 *Vibrio cholerae* Toksigenik di Air

Ketika *Vibrio cholerae* menginfeksi saluran usus manusia, bakteri ini dapat menimbulkan penyakit kolera. Pembuangan kotoran manusia/limbah yang tidak memadai, memungkinkan diikuti pencemaran air. Epidemik kolera terjadi di wilayah yang memiliki kebiasaan sanitasi yang kurang baik. Ketika air terkontaminasi strain *Vibrio cholerae* yang toksigenik dan digunakan oleh individu lain untuk minum dan pengolahan makanan, menghasilkan peredaran mikroorganisme yang lebih luas (Kaysner and Hill, 1994)

Di negara berkembang, ancaman epidemik kolera secara esensial telah dieliminasi dengan pengumpulan dan pengelolaan limbah yang cukup memadai. Klorinasi pada pengelolaan air minum dilakukan guna mengeliminasi mikroorganisme patogen termasuk *Vibrio cholerae*. *Personal hygiene* merupakan cara yang dapat dilakukan untuk mengurangi masalah peredaran penyakit yang lebih luas (Kaysner and Hill, 1994).

2.4 Distribusi Penyakit dan Pencemaran Air

Dr. Snow mengakumulasikan informasi dari berbagai kasus pengamatan. Kasus yang diamati berupa saluran pencernaan dari pasien yang sedang menjalani pengobatan dan yang meninggal karena kolera. Kolera mempengaruhi saluran pencernaan dari tubuh. Pengamatan tersebut membantunya dalam mengembangkan

hipotesisnya bahwa kolera merupakan suatu penyakit yang beredar melalui air (Coleman, 2003).

Tinjauan dari perjangkitan kolera yang dilaporkan dari tahun 1995-2005 oleh Griffith *et al* tahun 2006, kasus terbanyak dijumpai di Afrika (Republik Demokratik Kongo, Mozambique dan Afrika Selatan) dengan 423.904 (87,6%) dari 484.246 keseluruhan kasus yang terjadi di Afrika, Amerika, Eropa, Mediterania dan Asia Tenggara. Urutan kedua adalah Asia tenggara dengan jumlah kasus 15.188 (3,1%).

Epidemik kolera telah didokumentasikan di beberapa negara berkembang yang beredar melalui air yang terkontaminasi limbah (Feldman, 1992), dimana terjadi dalam komunitas yang belum memiliki akses sistem pengelolaan limbah dan air yang tepat, yang kemudian disebut dengan “penyakit dari kemiskinan” (Bonilla-Castro *et al.*, 2000). Di Afrika Tengah pada peninjauan yang dilaporkan oleh Griffith *et al* (Griffith *et al.*, 2006), 30% dari faktor-faktor yang dilaporkan (curah hujan dan banjir, jumlah pengungsi) adalah kontaminasi sumber air; merupakan hal yang paling sering terjadi. Faktor risiko yang paling sering bagi perjangkitan kolera adalah transmisi melalui makanan (32%) di Amerika Selatan dan 71% di Asia Timur. Namun secara keseluruhan, faktor risiko terbesar yang teridentifikasi untuk perjangkitan kolera adalah disebabkan oleh sumber air yang terkontaminasi kotoran manusia yang mengandung *Vibrio cholerae*. Di daerah yang lebih maju, faktor risiko lebih cenderung berkaitan dengan makanan laut atau sayuran yang tidak dicuci atau dimasak dengan baik.

Penyakit yang bersumber dari air (*waterborn diseases*), beredar melalui air yang terkontaminasi kotoran manusia dan hewan atau urin yang mengandung bakteri patogen atau virus. Terjadinya penyakit diperoleh dari air yang terkontaminasi

bakteri atau virus ketika berenang atau aktifitas lainnya, mengkonsumsi makanan yang terkontaminasi air yang kurang baik kualitasnya (Sedas, 2007). Kolera merupakan penyakit yang bersumber dari air yang mengandung bakteri *Vibrio cholerae* (Rose *et al.*, 2001).

2.5 Sungai Kalimas Surabaya

Kalimas yang mengalir melalui Kota Surabaya dan bermuara di pantai utara merupakan anak sungai dari Kali Surabaya yang juga merupakan anak sungai dari sungai besar Kali Brantas. Adapun Kali Brantas yang bermata air di wilayah pegunungan Kabupaten Malang merupakan sungai yang banyak mendatangkan manfaat bagi wilayah yang dilaluinya, baik sebagai sumber air untuk irigasi, tetapi juga sebagai sumber air untuk pembangkit listrik.

Kali Brantas bercabang dua menjadi Kali Surabaya dan Kali Porong di Mlirip Mojokerto, sedangkan Kali Surabaya bercabang menjadi Kalimas dan Kali Wonokromo di Pintu Air Jagir Wonokromo. Secara administratif, terdapat 8 wilayah Kecamatan yang dilalui oleh Sungai Kalimas, meliputi Kecamatan Wonokromo, Kecamatan Tegalsari, Kecamatan Gubeng, Kecamatan Genteng, Kecamatan Bubutan, Kecamatan Pabean Cantian, Kecamatan Krembangan dan Kecamatan Semampir. Wilayah Kelurahan yang dilalui oleh Sungai Kalimas sebanyak 15 Kelurahan, yang meliputi : Kelurahan Ngagel, Darmo, Keputran, Gubeng, Pacarkeling, Genteng, Embong Kaliasin, Ketabang, Alon-alon Contong, Bongkaran, Krembangan Utara, Nyamplungan, Perak Utara, Krembangan Selatan dan Kelurahan Ujung (Bappeko, 2005).

2.5.1 Struktur dan dimensi fisik Sungai Kalimas

Sungai Kalimas yang mengalir ke arah utara kota Surabaya dari Pintu Air Ngagel sampai kawasan Tanjung Perak memiliki bentuk sungai yang meliuk dan sebagian melurus khususnya di bagian utara. Lebar penampang permukaan sungai bervariasi antara 20 m – 35 m (Bappeko, 2005).

Bagian terlebar terdapat di Kelurahan Ngagel dengan lebar sungai sekitar 35 meter yaitu di dekat pintu air. Di daerah ini kondisi air termasuk paling bersih sehingga di sini air sungai banyak dimanfaatkan oleh warga sekitar sungai untuk mandi dan cuci (aktivitas MCK). Untuk lebar sungai tersempit terdapat di Kelurahan Bongkaran yaitu di dekat Jl. Karet dan Jl. Coklat dengan lebar sekitar 20 meter. Kedalaman Sungai Kalimas menurut data di Perum Jasa Tirta adalah antara 1 sampai 3 meter. Kedalaman sungai yang paling dalam berada pada kawasan 'Monkasel' sampai kawasan Genteng (Bappeko, 2005).

2.5.2 Fungsi Sungai Kalimas

Fungsi utama sungai Kalimas pada saat ini adalah sebagai tempat pembuangan air dari saluran drainase yang ada di wilayah kota Surabaya, terutama yang berada di bagian tengah kota. Penggunaan air sungai untuk sumber air baku relatif tidak besar, yaitu oleh kegiatan industri di kawasan Ngagel (IGLAS) dan untuk kegiatan di Kawasan Perak (Pelindo) (Bappeko, 2005).

2.5.3 Kegiatan masyarakat di Sungai Kalimas

Kegiatan masyarakat yang dilakukan di Sungai Kalimas, diantaranya adalah sebagai berikut :

2.5.3.1 Penyeberangan sungai (*Tambangan*)

Penyeberangan sungai dapat ditunjukkan seperti yang dilakukan di kawasan Ngagel, Peneleh dan Nyamplungan.

2.5.3.2 Pencarian ikan

Pencarian ikan sebagian besar dilakukan di kawasan antara Ngagel hingga Peneleh.

2.5.3.3 Mandi Cuci Kakus (MCK)

Kegiatan tersebut banyak dilakukan di kawasan sungai yang berdekatan dengan area perumahan kampung dan area perumahan liar. Bentuk kegiatan tersebut ada yang dilakukan secara tertutup (dengan 'bangunan' Kakus) dan ada yang dilakukan secara terbuka (langsung mencebur ke Sungai).

2.5.3.4 Wisata

Kegiatan wisata umumnya berupa wisata perahu yang disediakan secara reguler di kawasan Ngagel (dengan jalur antara pintu air Ngagel sampai Jembatan BAT) ; di jalur antara kawasan Monkasel sampai Taman Prestasi.

2.5.3.5 Olahraga air

Untuk kegiatan olahraga air, tempat yang sering digunakan adalah di kawasan Ngagel dan di kawasan Kayon (disamping Pasar Bunga Kayon)

2.5.3.6 Pembuangan sampah

Kegiatan tersebut banyak dilakukan oleh sebagian masyarakat disepanjang Sungai Kalimas dan terutama di area sungai yang berdekatan dengan Pasar (Pasar Keputran, Peneleh). Area yang relatif jarang dilakukan pembuangan sampah adalah di kawasan wisata Taman Prestasi sampai Monkasel.

2.5.3.7 Pelabuhan perahu

Pelabuhan perahu terdapat di kawasan Pelabuhan Kalimas yaitu di bagian utara yang berbatasan dengan laut (Selat Madura).

2.5.3.8 Pengerukan lumpur

Kegiatan pengerukan lumpur dilakukan oleh Perum Jasa Tirta pada beberapa lokasi sesuai dengan kondisi endapan lumpur.

BAB 3

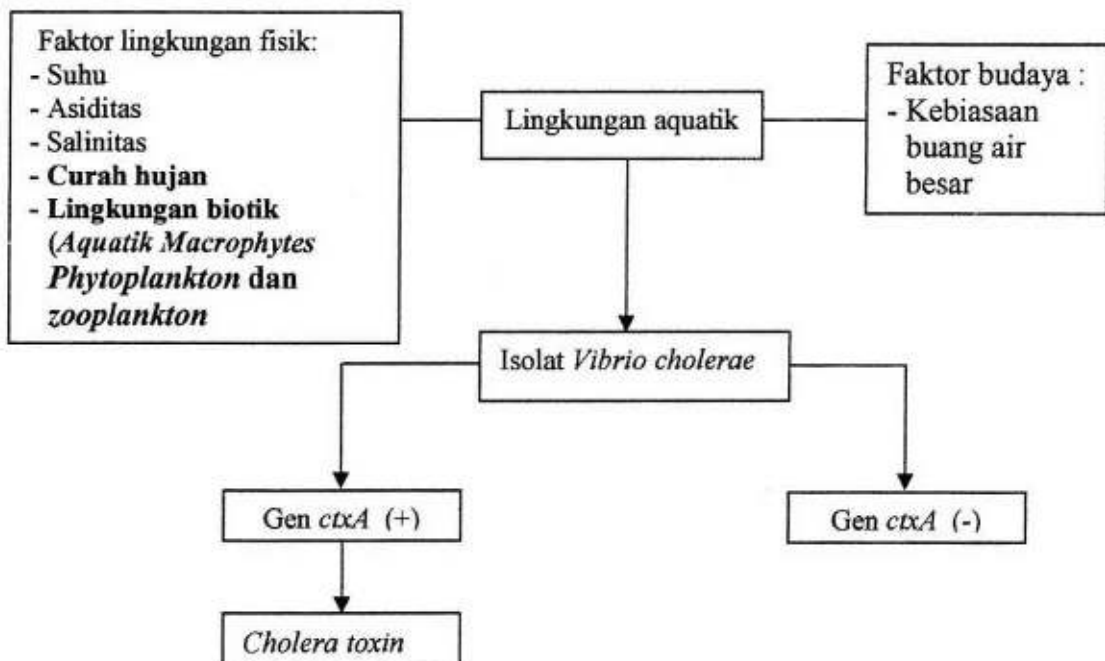
KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual

Lingkungan aquatik diyakini merupakan habitat alami *Vibrio cholerae*. Keberadaan *Vibrio cholerae* ini dipengaruhi oleh suhu, asiditas, salinitas air, curah hujan, serta faktor lingkungan biotik lainnya. Selain itu, faktor kebiasaan buang air besar di lingkungan perairan diduga memiliki peran keberadaan *Vibrio cholerae* terutama bagi individu yang menderita kolera. Kehadiran isolat *Vibrio cholerae* toksigenik yang mengandung gen *ctxA*, berpotensi menghasilkan *cholera toxin* yang dapat menimbulkan penyakit kolera. Secara singkat kerangka konseptual penelitian dapat dilihat pada gambar 3.1 berikut ini :



Gambar 3.1 Bagan kerangka konseptual deteksi *cholera toxin producing Vibrio cholerae*

Keterangan :

Karena keterbatasan waktu dan biaya, maka tidak seluruh faktor yang diduga memberi pengaruh keberadaan *Vibrio cholerae* di lingkungan perairan diteliti.

Huruf bercetak tebal : tidak diteliti (Curah hujan, Lingkungan biotik)

3.2. Hipotesis

3.2.1. Terdapat perbedaan kepadatan *Vibrio cholerae* (CFU/ml) antar titik sampling Sungai Kalimas Surabaya

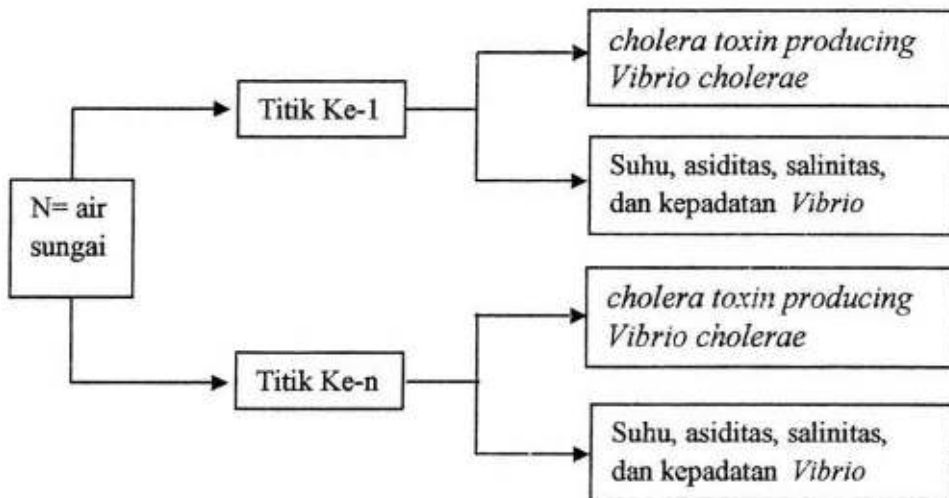
BAB 4
METODE PENELITIAN

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Berdasarkan tujuan, jenis penelitian ini termasuk penelitian *observational studies* yakni *analytical studies* dengan pendekatan *ecologic comparison study* (Kleinbaum *et al.*, 1982) yakni membandingkan keberadaan *cholera toxin producing Vibrio cholerae* terhadap suhu, asiditas, salinitas, dan kepadatan *Vibrio cholerae* antar titik sampling pada waktu yang sama. Secara singkat bagan desain penelitian dapat dilihat pada gambar 4.1 berikut ini :



Gambar 4.1 Bagan desain penelitian *ecologic comparison study*

4.2 Sampel Penelitian dan Besar Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah air sungai yang diambil dari Sungai Kalimas di 6 stasiun pengambilan dengan menggunakan rumus : (Sudjana, 2005)

$$n > \frac{Z^2_{1-\alpha/2} P(1-P)}{d^2} \quad \alpha = 0,05$$

dimana :

n = besar sampel

$Z^2_{1-\alpha/2}$ = nilai distribusi normal baku (tabel Z) pada α tertentu

P = harga proporsi di populasi

d = kesalahan absolut yang dapat ditolelir

P (harga proporsi) dalam penelitian ini berdasarkan penelitian yang dilakukan Rivera *et al.*, 2001 sebesar 10%, sehingga setelah dilakukan penghitungan, maka besar sampel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

$$n > \frac{Z^2_{1-\alpha/2} P(1-P)}{d^2}$$

$$n > \frac{1,96^2 \cdot 0,1(1-0,1)}{0,1^2}$$

$$n > \frac{3,8416 \cdot 0,09}{0,01}$$

$$n > 34,5 \text{ ----- } n= 36$$

4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.3.1 Variabel penelitian

Variabel tergantung yang diamati dalam penelitian ini adalah *cholera toxin producing Vibrio cholerae*. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah suhu, asiditas, salinitas dan kepadatan *Vibrio cholerae*.

4.3.2 Definisi operasional

1. Gen *cholera toxin* : rangkaian nukleotida yang menyandi gen *cholera toxin* dengan berat molekul 84 kDa; dideteksi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), menggunakan primer *ctxA V.cholerae* (suatu rantai pendek

dari basa nukleotida dengan susunan yang teratur dan spesifik untuk gen *cholera toxin*) seperti yang telah digunakan oleh Fields *et al.*, 1992; Rivera *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2003; Lipp *et al.*, 2003; Binsztein *et al.*, 2004 yakni : CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G (*forward*) di urutan basa nukleotida 73-94 dan CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC (*reverse*) di urutan basa nukleotida 614-636; amplifikasi 564 bp.

2. *Cholera toxin* : protein oligometrik; terdiri atas 98% protein, 1% karbohidrat, 1% lipid; terbagi dalam dua subunit yaitu subunit A dan subunit B. Rasio antara subunit B dan subunit A adalah 5 : 1. Subunit A bertanggung jawab atas sifat-sifat biologis; enzimatis spesifik yang bertindak secara intraseluler dalam patogenesis penyakit. Subunit B bertanggung jawab terhadap terjadinya perlekatan untuk mengikat holotoksin ke reseptor sel usus inang.
3. *Cholera toxin producing Vibrio cholerae* : *V.cholerae* yang mengandung gen *cholera toxin* yang dideteksi dengan menggunakan metode PCR.
4. Lingkungan perairan : 6 lokasi pengambilan sampel air di sungai Kalimas Surabaya yang ditentukan berdasarkan pemanfaatan air sungai, hasil uji kualitas mikrobiologi pada air Sungai Kalimas Surabaya yang telah dilakukan oleh BBTCL & PPM bulan Desember 2008 (Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pemberantasan Penyakit Menular), juga mempertimbangkan sarana yang tersedia (jembatan), sumber pencemaran yang berasal pemukiman sekitar sungai, salinitas serta pemanfaatan air sungai yang berpotensi menimbulkan masalah kesehatan. Adapun jumlah 6 stasiun sampling Sungai Kalimas yakni stasiun : I (Pintu Air Kalimas Darmokali), II (Jembatan BAT

Ngagel), III (Jl. Kayun), IV (Jl. Genteng- Depan Perhutani Unit II Jatim), V (Jembatan Merah) dan VI (Jembatan Petekan).

Sungai Kalimas dan sekitarnya merupakan pertemuan antara air sungai (tawar) dengan air laut (asin) di Sungai Kalimas berada di Kawasan Kayon; dimana lokasi tersebut terdapat pintu air. Kondisi kawasan Sungai Kalimas adalah seperti berikut: air Sungai Kalimas yang tawar mulai ujung selatan (kawasan Ngagel) sampai kawasan Monumen Kapal Selam (Delta Plasa). Air asin berada di alur antara Monkasel sampai Peneleh. Air Payau terdapat di kawasan mulai dari Peneleh sampai kawasan Jembatan Merah atau Jembatan Petekan; dijumpai air asin lagi dimulai dari kawasan Jembatan Petekan hingga ke laut (Bappeko, 2005).

5. Kepadatan *Vibrio cholerae* : Jumlah koloni yang diduga *Vibrio cholerae* yang tumbuh pada media TCBS dari 50 μ L sampel dengan menggunakan metode drop plate (metode tetes), diinkubasi pada suhu 37°C, 24 jam dan dihitung dalam satuan CFU/mL.

4.4 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini :

- Bahan untuk pengukuran asiditas : pH strip
- Bahan untuk isolasi dan identifikasi *Vibrio cholerae* : air pepton alkalis (Oxoid, CM 0509) , membran filter whatman 0,45 μ m, *Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose* (Eiken Chemical Ltd, EM 003), *polypeptone*, disodium hydrogen phosphat 12 hydrogen dioksida (Na₂HPO₄.12H₂O) *Heart Infusion* agar, *Kligler Iron Agar*, *Sucrose Semi Solid* (SSS), *Motility Indole Ornithine* (MIO), aquadest, alpha naphthol, alkohol 96%, *Kovac's Reagent*, Polyvalent antiserum

Vibrio O1 (Denka Seiken co Ltd 689021), *Puritan Cotton Swab*, API 20 NE (bioMerieux®SA)

- Bahan untuk PCR : bufer fosfat, larutan proteinase-K 20 µl, absolute ethanol (Merck™), TBE (Sigma®), Etidium Bromide solution (Sigma®), Taq DNA polymerase (Applied Biosystem), Oligonukleotida primer, MgCl₂ solution (Applied Biosystem, LotH10836), 10x PCR Bufer II (Applied Biosystem), *Nuclease Free Water* (Promega), dNTPs mix (Applied Biosystem), *Phosphat Buffer Saline* pH 7.4 (Sigma®), *V.cholerae* (164408, 164636), *Gel loading solution* (Sigma®), 100 bp DNA step Ladder (Promega).

4.5 Instrumen Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

- Pengukuran di lapangan: termometer alkohol 100°C.
- Peralatan dalam isolasi dan deteksi gen *cholera toxin* : *autoclave* (America model no. 75X), inkubator 37°C (Fisher ekonotemp, Model 55D), neraca analitik (Merck Adventure Ohaus), *vaccum pump*, ose, pinset, *glassware* : *erlenmeyer* (pyrex), *petridish*, botol sampel 1 liter, *screw cap tube*, bunsen, pipet volume (mililiter dan mikronliter), QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN), *needle*, *Biosafety cabinet* (BioGARD Hood, the Baker Co), *Clonezone with Hepa filters* (USA/Scientific, Inc), *dry bath* (Thermolyne type 16500-dri bath), termometer, *centrifuge* (Eppendorf 5424, Eppendorf 5415C), vortex (DAIGGER, Vortex Genie®), *micropipette* (Pipetman P1000, P200, P20), *thermal cycler* (Applied Biosystem), *analytical scales* (Mettier Toledo AG104), spatula, microwave, gel elektroforesis (Biorad Wide Mini-Sub Cell GT), refrigerator 4°C, freezer -20°C, freezer -70°C (REVCO), *Cotton swab*

(Puritan®), *Regular Pipette Tips* (Bio Rad BR-37), 1.5 ml tabung sentrifus, *microAmp PCR tubes* (Applied Biosystem SG 20AG-2A), parafilm (Pechiney Parafilm "M").

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di 6 titik sampling air Sungai Kalimas Surabaya guna mengukur suhu, asiditas dan salinitas serta tahap penelitian laboratorium guna mengisolasi, mengidentifikasi dan mendeteksi *Vibrio cholerae* yang mengandung gen *ctxA*. Penelitian laboratorium dilakukan di empat tempat dengan mempertimbangkan kemudahan dalam pelaksanaan penelitian, selain sensitivitas dan efektifitas sarana penunjang laboratorium. Tahap isolasi *Vibrio cholerae* dilakukan di Laboratorium Kesehatan Lingkungan Politeknik Kesehatan Departemen Kesehatan Surabaya; sedangkan tahap identifikasi dan pendeteksian *cholera toxin producing Vibrio cholerae* menggunakan metode API 20 NE dan teknik PCR secara berurutan, dilakukan di laboratorium : Lembaga Penyakit Tropis (LPT) Universitas Airlangga Surabaya dan *Bacterial Diseases Program*, US NAMRU-2 (Naval Medical Research Unit) Jakarta. Penentuan salinitas air Sungai Kalimas Surabaya dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya. Penelitian dilakukan bulan Pebruari – April 2009.

4.7 Prosedur Pengumpulan Data

4.7.1 Cara pengumpulan data

4.7.1.1 Observasi

Data melalui observasi yang dilakukan meliputi pengukuran suhu, asiditas, salinitas, kepadatan *Vibrio cholerae* dan isolasi *Vibrio cholerae* di Sungai Kalimas Surabaya.

Pengambilan contoh air pada tiap titik sampling diulang sebanyak 6 kali dalam waktu yang berbeda, dengan interval waktu 1 minggu. Hal ini dilakukan dengan pertimbangan penyebaran limbah dalam sungai mungkin telah homogen, sehingga dianggap *Vibrio cholerae* dapat diisolasi dari perairan Sungai Kalimas Surabaya.

4.7.1.2 Wawancara

Wawancara dilakukan dengan menggunakan metode wawancara mendalam (*in depth interview*) kepada informan untuk memperoleh informasi pemanfaatan air Sungai Kalimas Surabaya. Pelaksanaan wawancara menggunakan pedoman wawancara (lampiran V).

4.7.2 Prosedur pengumpulan data

Adapun prosedur pengambilan sampel air sungai berdasarkan buku pedoman Bapedal Propinsi Jatim 2007 “Pemantauan Terpadu Kualitas Air Sungai di Jawa Timur” adalah sebagai berikut :

- Disiapkan botol untuk pemeriksaan mikrobiologi; harus bersih dan steril, sterilisasi dilakukan dalam *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

- Botol contoh dipegang di dekat dasarnya dan lehernya diarahkan ke bawah permukaan air.
- Botol selanjutnya diputar sampai ujung leher sedikit ke atas dan mulut botol mengarah pada aliran. Bila tidak terdapat aliran, perlu dibuat dengan mendorong maju horizontal dengan arah menjauh dari tangan.

Catatan :

- Contoh air sungai sebaiknya diambil dari bagian yang mengalir dan dekat dengan permukaan.
- Bagian sungai yang diam sebaiknya dihindari (karena dianggap tidak homogen)
- Untuk sungai yang lebar dan lurus, contoh diambil dari tepi, tetapi pada jarak paling sedikit 1 meter dari tepi sungai.
- Pengambilan contoh air sungai yang tidak terjangkau tangan, contoh air dapat diambil dengan botol pemberat.

4.7.2.1 Suhu air sungai

Alat yang digunakan untuk mengukur suhu air adalah termometer.

Cara pengukuran :

Termometer ditenggelamkan dalam air di pinggir aliran sungai dengan kedalaman 15 cm dan didiamkan selama 5 menit. Suhu dibaca dengan cara mengamati batas maksimum gerakan alkohol (kondisi stabil) dalam kolom termometer tersebut.

4.7.2.2 Asiditas air sungai

Kertas indikator pengukuran asiditas dicelupkan ke dalam air. Amati perubahan warna pada kertas asiditas indikator, sesuaikan perubahan warna tersebut dengan asiditas standar yang tercantum pada alat asiditas indikator.

4.7.2.3 Salinitas air sungai

Pengukuran salinitas sampel air sungai dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya.

4.7.2.4 Isolasi *Vibrio cholerae*, penghitungan kepadatan *Vibrio cholerae* dan mendeteksi *cholera toxin producing Vibrio cholerae*

Sebelum penelitian dilakukan, siapkan semua alat dan bahan yang dibutuhkan dalam penelitian. Alat harus dalam kondisi steril untuk mencegah terjadi kontaminasi. Air sungai diambil sebanyak $\frac{3}{4}$ volume botol sampel bervolume 1 liter. Masukkan 450 mililiter sampel air ke dalam erlenmeyer yang berisi 50 mililiter air pepton alkalis dengan konsentrasi 10 kali, asiditas 8,4; campur rata. Endapkan selama 25 menit guna memisahkan pasir atau bahan padat lainnya. Ambil 400 mililiter contoh air tersebut, saring dengan membran filter (millipore filter porositas 0,45 mikron meter). Kertas filter dimasukkan ke dalam 15 mililiter air pepton alkalis (dalam erlenmeyer), aduk, dan diinkubasi selama 3 jam, 37°C. Sampel air hasil *stirer* diperlakukan sebagai berikut :

- 1) Sebanyak 5 μ L digoreskan pada media *Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose* menggunakan *ose*, diinkubasi selama 1 x 24 jam, suhu 37°C.
- 2) Setelah inkubasi, koloni tunggal berwarna kuning tipis/pipih yang tumbuh di TCBS agar diinokulasi di "Zero NaCl broth" yang mengandung 5 gram

polypepton dan 0,1 gram disodium hydrogenphosphate 12-hydrogen dioksida ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) dalam 100 mL aquadest, inkubasi selama 24 jam, 37°C .

- 3) Setelah inkubasi, amati pertumbuhan pada broth dengan ditunjukkan adanya kekeruhan pada broth.
- 4) Ambil dengan loopful broth kultur yang menunjukkan kekeruhan dan diinokulasikan ke dalam tabung *screw-cap* berisi *Heart Infusion Agar* yang telah dilabel. Inkubasi selama 24 jam, 37°C .
- 5) Setelah inkubasi, kencangkan tutup tabung, simpan sebagai stok kultur untuk uji selanjutnya.
- 6) Koloni yang diduga *Vibrio cholera*, dilanjutkan uji biokimia lainnya (media : KIA, Voges Proskauer semi solid, Citrat dan MIO) dan dilanjutkan uji menggunakan API 20 NE. Isolat yang diduga *Vibrio cholerae* diuji dengan metode PCR untuk mengetahui apakah isolat mengandung gen *ctxA* yang menunjukkan isolat tersebut toksigenik atau tidak. Hal ini juga dilakukan terhadap sampel air dengan menggunakan metode langsung menggunakan teknik PCR, sesuai dengan penelitian yang dilakukan Chomvarin *et al* (2007) pada sampel air di Thailand.
- 7) Koloni kuning yang tidak tumbuh pada ZNB, ditentukan spesiesnya dengan uji biokimia seperti langkah-langkah pada no.6.

4.7.2.5 Penghitungan kepadatan *Vibrio cholerae* menggunakan metode tetes (*drop method*).

- 1) Sampel hasil *stirer* ditetaskan pada *plate* yang berisi medium TCBS dengan menggunakan mikropipet sebanyak $50\mu\text{L}$.

- 2) Tinggi ujung mikropipet antara 2-5 cm, sehingga diperoleh diameter zona selebar 1,5 – 2 cm. Hal ini dimaksudkan agar koloni yang terbentuk akan mudah terpisah.
- 3) Dieramkan selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C.
- 4) Koloni yang tumbuh pada media dihitung dalam satuan CFU/mL.

4.7.2.6 Ekstraksi DNA

- Sampel Air

- 1) 1 mililiter sampel air dari tabung eppendorf (hasil filtrasi pada membran filter untuk persiapan template DNA) dimasukkan ke dalam larutan fosfat bufer saline (PBS) dan divortex.
- 2) Larutan tersebut disentrifus dengan kecepatan 7500 rpm selama 2 menit pada suhu ruang.
- 3) Prosedur 1) dan 2) diulangi.
- 4) Supernatan dibuang dan ditambahkan 180 µL ATL buffer pada pellet
- 5) 20 µl Proteinase-K ditambahkan ke dalam larutan dan divortex.
- 6) Larutan diinkubasikan pada drybath suhu 56°C selama 1,5 jam dan divortex setiap 30 menit.
- 7) 200 µL AL buffer ditambahkan ke dalam larutan dan divortex.
- 8) Larutan diinkubasi pada *drybath*, suhu 70°C selama 10 menit dan divortex sebentar.
- 9) 200 µL absolute ethanol ditambahkan ke dalam larutan, divortex.
- 10) Larutan sebanyak 600 µL dipindahkan ke dalam *spin column* dan disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang.

- 11) *Spin column* ditempatkan ke dalam *collection tube* yang baru, ditambah 500 μ L AW1 buffer ke dalam *spin column* dan disentrifus pada kecepatan 8000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang.
- 12) *Spin column* ditempatkan ke dalam *collection tube* yang baru, ditambah 500 μ L AW2 buffer ke dalam *spin column* dan disentrifus pada kecepatan 14000 rpm selama 3 menit pada suhu ruang.
- 13) *Spin column* ditempatkan ke dalam *collection tube* yang baru dan disentrifus dengan kecepatan 14000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang.
- 14) *Spin column* ditempatkan ke dalam tabung *micro sentrifuge* dan ditambah 100 μ L AE buffer ke dalam *spin column*.
- 15) Larutan diinkubasikan pada suhu ruang selama 5 menit dan disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang.
- 16) Larutan disimpan pada freezer -70°C (REVCO).

• Sampel dari *stock culture*

1) Refreshing *the stock culture*

- a) Isolat dari *Heart infusion* diinokulasi ke dalam medium TCBS menggunakan *ose*, diinkubasi selama 24 jam, 37°C secara *aerobic*.
- b) Ambil koloni tunggal, berwarna kuning dan tipis/pipih yang tumbuh pada TCBS agar dan ditusukkan ke dalam medium KIA lalu diinkubasi pada suhu, 37°C selama 24 jam secara *aerobic*.
- c) Bakteri yang tumbuh di medium KIA (K/A) digunakan untuk ekstraksi DNA kromosom.

2) Ekstraksi DNA kromosom

- a) Bakteri pada medium KIA diambil dengan menggunakan *ose* dan disuspensikan dalam 1 mL PBS (phosphate buffer saline), campur dengan menggunakan vortex.
- b) Prosedur ekstraksi selanjutnya seperti perlakuan terhadap sampel air (no.2 sampai dengan no.16)

4.7.2.6 PCR assays

- 1) Disiapkan master mix PCR, tiap 1 sampel (24 μ L) mengandung :
10 x buffer II (2.5), MgCl₂ (2.5), dNTP's mix (10), *toxR* (F & R) (2), *ctxA* (F & R) (2), Tag DNA polymerase (0.25) dan NFW (Nuclease Free Water = 4.75)
- 2) PCR mix tersebut sebanyak 24 μ L dimasukkan ke masing-masing tabung PCR sejumlah banyaknya sampel.
- 3) Hasil ekstraksi DNA kromosom yang tersimpan dalam freezer -70°C dicairkan. 1 μ L larutan ekstraksi DNA kromosom (DNA templete) tersebut dimasukkan ke dalam tabung PCR yang telah berisi PCR mix.
- 4) Disiapkan tabung PCR yang berisi *free water* sebagai kontrol negatif.
- 5) PCR mix dijalankan pada *thermal cycler* (9700 FAST) dengan mengikuti kondisi : *Initial Denaturation* 94° C, 2 menit; *Denaturation* 94° C, 1 menit; *Annealing* 55° C, 1 menit; *Extention* 72° C, 1 menit; *Final Extention* 72° C, 10 menit. Siklus diulangi sebanyak 25 kali.

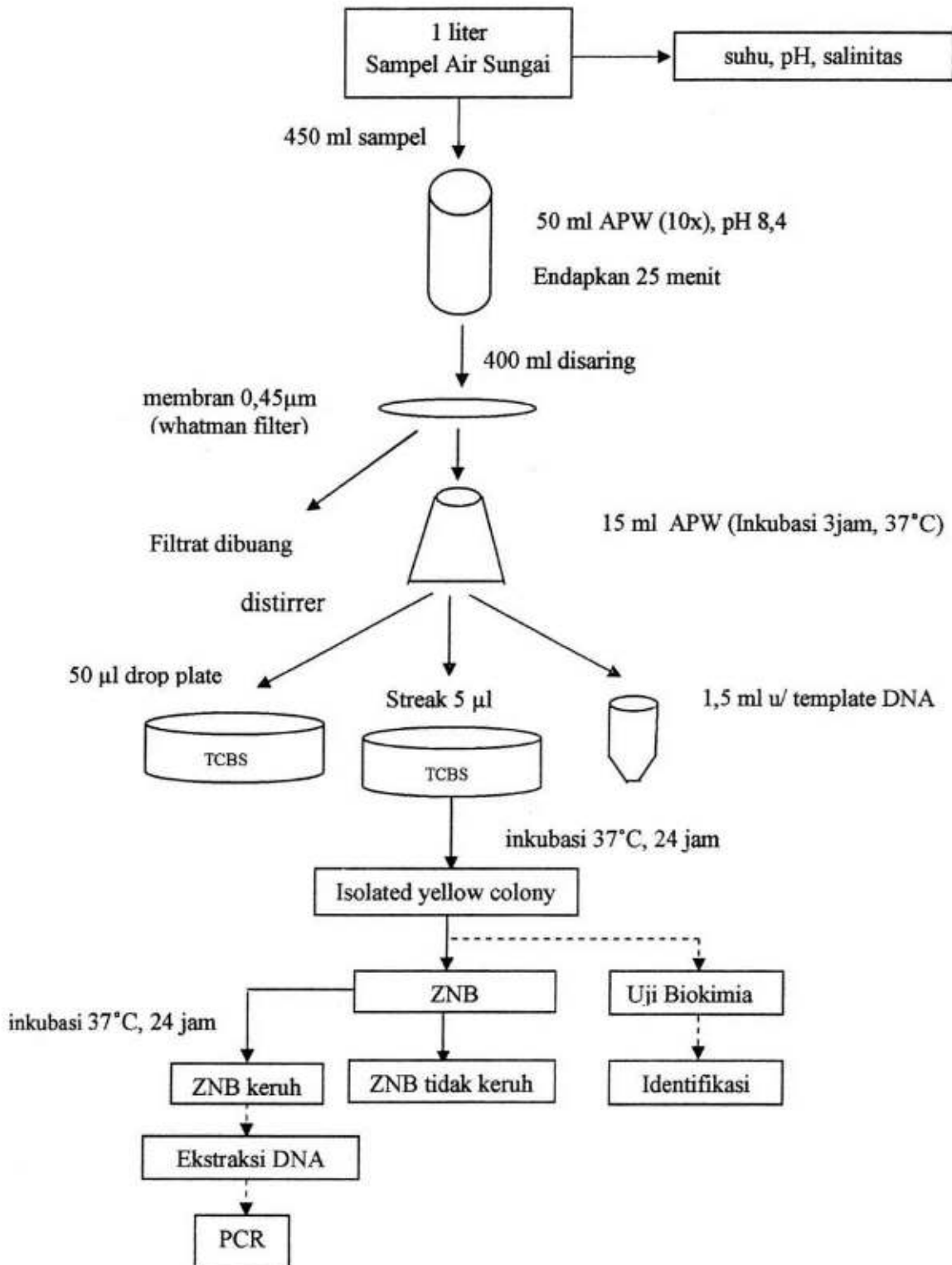
DNA hasil amplifikasi diperlakukan dengan 2% agarose gel elektroforesis dan divisualisasikan dibawah UV transilluminator (BioRad) setelah dicat dengan *ethidium bromide*.

Untuk reliabilitas dan validitas keberadaan *cholera toxin producing Vibrio cholerae*, digunakan kontrol positif *Vibrio cholerae* penghasil *cholera toxin* yang telah tersedia di Laboratorium US-NAMRU-2 Jakarta.

4.8 Pengolahan dan Analisis Data Penelitian

Data hasil penelitian tentang suhu, asiditas, salinitas, dan kepadatan *Vibrio cholerae* masing-masing titik sampling yang sudah terkumpul diolah dan dianalisis menggunakan uji Anova One Way. Uji Anova One Way digunakan untuk mengetahui perbedaan suhu, asiditas, salinitas dan kepadatan *Vibrio cholerae* pada masing-masing titik sampling di Sungai Kalimas Surabaya. Uji analisis statistik ini menggunakan bantuan komputerisasi program SPSS 13.

4.9 Kerangka Operasional Penelitian



Keterangan : Uji Biokimia dilakukan setelah pembacaan dari inokulasi pada media ZNB

BAB 5
HASIL PENELITIAN

BAB 5

HASIL PENELITIAN

Telah dilakukan pengukuran pada suhu, asiditas, salinitas, penghitungan kepadatan *Vibrio cholerae* serta pemanfaatan air sungai yang diambil di 6 titik pengambilan sepanjang Sungai Kalimas Surabaya. Pengambilan sampel dilakukan mulai bulan Pebruari 2009 hingga Maret 2009.

5.1 Gambaran Pemanfaatan Air Sungai Kalimas Surabaya

Sungai Kalimas mengalir ke arah utara kota Surabaya dari Pintu Air Ngagel sampai kawasan Tanjung Perak, memiliki bentuk sungai yang meliuk dan sebagian melurus khususnya di bagian utara. Lebar penampang permukaan sungai bervariasi antara 20 m – 35 m (Bappeko, 2005).

Informasi pemanfaatan air sungai diperoleh melalui informan yakni masing-masing titik sampling diwakili 3 orang informan yang berdomisili di dekat lokasi pengambilan sampel air sungai. Dari informasi yang diperoleh, kegiatan yang dilakukan masyarakat di sepanjang Sungai Kalimas dalam penelitian ini selain kegiatan bengkel, diantaranya adalah mencari ikan dan cacing, mencuci pakaian, menyiram tanaman, mandi serta buang air besar. Umumnya kegiatan tersebut dilakukan orang dewasa, baik pria maupun wanita, walaupun terkadang kegiatan tersebut dilakukan oleh anak-anak.

Informasi yang diperoleh selama penelitian berkenaan dengan alasan para pengguna Sungai Kalimas tetap melakukan kegiatan mencuci pakaian, mandi serta buang air besar adalah sungai merupakan tempat yang strategis bagi pelaksanaan mencuci pakaian, mandi serta buang air besar, khususnya bagi para

tunawisma. Faktor kemudahan seperti jarak sungai yang dekat lokasi rumah atau tempat kerja merupakan alasan utama bagi mereka, karena saat penelitian ini dilakukan, belum tersedia adanya jamban umum disekitar pinggiran aliran Sungai Kalimas Surabaya.

Kegiatan mandi dan buang air besar sebagian besar dilakukan pagi hari dan sering dilakukan di titik 1,2,3,5,dan 6. Titik 4 jarang digunakan sebagai tempat pembuangan tinja, hal ini dimungkinkan karena di sekitar pinggiran aliran sungai di titik 4 jarang ditemukan pemukiman penduduk ataupun pasar yang memiliki kontribusi terjadinya pencemaran air di titik 4 selama penelitian . Hal ini dapat ditunjukkan pada gambar berikut ini :



Gambar 5.1: Lokasi sampling di titik 4 Sungai Kalimas Surabaya

Pengguna sungai ada yang berasal dari orang singgah yang sebagian tidak mempunyai tempat tinggal tetap. Ini terlihat dari sebagian besar pengguna sungai yang bekerja sebagai tukang becak, loper koran, anak jalanan, dan tunawisma lainnya.

Pengamatan yang dilakukan pada tempat mandi, cuci dan kakus sekitar titik pengambilan sampel air, diketahui bahwa tempat yang berupa bangunan tembok tanpa atap hanya berfungsi untuk kegiatan mandi dan cuci, namun tidak disertai jamban bagi masyarakat umum. Berikut ini contoh perilaku masyarakat dalam memanfaatkan sungai :



Gambar 5.2: Sungai sebagai tempat pembuangan tinja (Buang Air Besar=BAB)



Gambar 5.3: Sungai sebagai tempat mandi dan mencuci

5.2 Suhu Air Sungai Kalimas Surabaya

Suhu air sungai diukur dengan menggunakan termometer 100°C. Pengukuran dalam penelitian ini dilakukan pada tepi sungai tiap-tiap titik pengambilan sampel air, dengan mempertimbangkan kemudahan dalam pengambilan air dan kemudahan dalam pengukuran asiditas.

Berdasarkan pengukuran suhu yang dilakukan di 6 titik sampling, diperoleh hasil sebagai berikut :

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Suhu Air di 6 Titik Sampling Air Sungai Kalimas Surabaya Bulan Pebruari - Maret 2009

Titik sampel ke-n	Suhu pada replikasi ke-n (°C)						Suhu rata-rata titik ke-n (°C)
	1	2	3	4	5	6	
1	28	29	28	28	28	28	28,17 ± 0,408
2	28	29	27,5	27,5	27,5	28	27,92 ± 0,585
3	28,5	29	27,5	28	27	28	28 ± 0,707
4	28,5	28,5	28	28	27	28,5	28,08 ± 0,585
5	28,5	28,5	28	28	27	29	28,17 ± 0,683
6	28,5	28	28	28	28	28	28,08 ± 0,204

Keterangan Titik Sampel:

1: Pintu Air Kalimas Darmokali, 2: Jembatan BAT Ngagel, 3: Jl. Kayun, 4: Jl. Genteng- Depan Perhutani Unit II Jatim, 5: Jembatan Merah dan 6: Jembatan Petekan.

Dari tabel tersebut, suhu air rata-rata tertinggi terdapat di titik 1 dan titik 5 sedangkan suhu terendah di titik 2. Suhu rata-rata air Sungai Kalimas di 6 titik pengambilan sampel air adalah 28,1°C.

Setelah dilakukan uji statistik *One Way Anova* terhadap perbedaan suhu air Sungai Kalimas di tiap-tiap titik sampling , diperoleh hasil $p\text{-value} = 0,967 > \alpha$ (0,05). $p\text{-value} > \alpha$, maka dapat disimpulkan bahwa H_0 diterima, yang berarti

tidak ada perbedaan suhu air rata-rata antar titik sampling di Sungai Kalimas Surabaya. Analisis varians ini dapat dilihat pada tabel 5.2 berikut ini :

Tabel 5.2 : Signifikasi Hasil Pengukuran Suhu Air di 6 Titik Sampling Sungai Kalimas Bulan Pebruari – Maret 2009

Suhu	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,285	5	,057	,184	,967
Within Groups	9,292	30	,310		
Total	9,576	35			

5.3 Asiditas Air Sungai Kalimas Surabaya

Pengukuran asiditas air Sungai Kalimas Surabaya di 6 titik pengambilan air diperoleh sebagai berikut : asiditas rata-rata air sungai yang tertinggi dijumpai pada titik 6 yakni 6,95. Asiditas terendah dijumpai pada titik 3 yaitu 6,83. Asiditas rata-rata di 6 titik Sungai Kalimas Surabaya yaitu 6,89.

Hasil pengukuran asiditas pada tiap-tiap titik di Sungai Kalimas Surabaya dapat dilihat pada tabel 5.3 dibawah ini :

Tabel 5.3 Hasil Pengukuran Asiditas Air di 6 Titik Sampling Air Sungai Kalimas Surabaya Bulan Pebruari – Maret 2009

Titik sampel ke-n	Nilai keasaman pada replikasi ke-n						Asiditas rata-rata titik ke-n
	1	2	3	4	5	6	
1	6,8	7,0	6,9	6,9	6,9	6,8	6,88 ± 0,075
2	6,9	7,0	6,7	6,9	6,9	6,7	6,85 ± 0,122
3	6,8	6,8	6,8	6,9	6,8	6,9	6,83 ± 0,052
4	6,9	7,0	7,0	6,9	6,9	6,9	6,93 ± 0,052
5	7,0	6,7	6,8	6,9	6,9	6,9	6,87 ± 0,103
6	7,0	6,9	6,9	7,0	6,9	7,0	6,95 ± 0,055

Keterangan Titik Sampel:

1: Pintu Air Kalimas Darmokali, 2: Jembatan BAT Ngagel, 3: Jl. Kayun, 4: Jl. Genteng- Depan Perhutani Unit II Jatim, 5: Jembatan Merah dan 6: Jembatan Petekan.

Setelah dilakukan uji statistik *One Way Anova* terhadap perbedaan asiditas air Sungai Kalimas di tiap-tiap titik sampling, diperoleh hasil $p\text{-value} = 0,114 > \alpha (0,05)$. $p\text{-value} > \alpha$, maka disimpulkan H_0 diterima, yang berarti tidak ada perbedaan asiditas air rata-rata antar titik sampling di Sungai Kalimas Surabaya. Analisis varians ini dapat ditunjukkan pada tabel berikut ini :

Tabel 5.4 : Signifikansi Hasil Pengukuran Asiditas Air di 6 Titik Sampling Sungai Kalimas Surabaya Bulan Pebruari – Maret 2009

Asiditas	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,065	5	,013	1,958	,114
Within Groups	0,198	30	,007		
Total	0,263	35			

5.4 Salinitas Air Sungai Kalimas Surabaya

Pengukuran kadar salinitas air sungai dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya. Kadar salinitas tertinggi di 6 titik sampel air Sungai Kalimas diperoleh di titik 4 yakni 0,0047% dan terendah di titik 3 yakni 0,00395%. Kadar salinitas secara keseluruhan air Sungai Kalimas Surabaya rata-rata diperoleh 0,0040%. Kadar salinitas pada masing-masing titik sampling lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 5.5 berikut ini :

Tabel 5.5 Hasil Pengukuran Salinitas Air di 6 Titik Sampling Air Sungai Kalimas Surabaya Bulan Pebruari – Maret 2009

Titik sampel ke-n	Salinitas pada replikasi ke-n (%)						Salinitas rata-rata titik ke-n (%)
	1	2	3	4	5	6	
1	0,0042	0,0039	0,0042	0,0043	0,0035	0,0040	0,0040 ± 0,0003
2	0,0050	0,0042	0,0033	0,0043	0,0039	0,0040	0,0041 ± 0,0006
3	0,0041	0,0044	0,0034	0,0042	0,0036	0,0040	0,00395 ± 0,0004
4	0,0040	0,0054	0,0035	0,0047	0,0046	0,0058	0,0047 ± 0,0008
5	0,0052	0,0045	0,0045	0,0044	0,0038	0,0050	0,0046 ± 0,0005
6	0,0039	0,0034	0,0041	0,0041	0,0040	0,0050	0,0041 ± 0,0005

Keterangan Titik Sampel:

1: Pintu Air Kalimas Darmokali, 2: Jembatan BAT Ngagel, 3: Jl. Kayun, 4: Jl. Genteng- Depan Perhutani Unit II Jatim, 5: Jembatan Merah dan 6: Jembatan Petekan

Setelah dilakukan uji statistik One Way Anova terhadap perbedaan salinitas air Sungai Kalimas di tiap-tiap titik pengambilan sampel, diperoleh hasil $p\text{-value} = 0,129 > \alpha (0,05)$. $p\text{-value} > \alpha$, maka disimpulkan H_0 diterima, yang berarti tidak ada perbedaan salinitas air rata-rata antar titik sampling di Sungai Kalimas Surabaya. Analisis varians ini dapat ditunjukkan pada tabel 5.6 berikut ini:

Tabel 5.6 : Signifikasi Hasil Pengukuran Salinitas Air di 6 Titik Sampling Sungai Kalimas Bulan Pebruari – Maret 2009

Salinitas	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,000	5	,000	1,872	,129
Within Groups	,000	30	,000		
Total	,000	35			

5.5 Identifikasi *Vibrio cholerae* di Sungai Kalimas Surabaya

Sebanyak 450 mL sampel masing-masing titik sampling dicampur dengan 50 mL media air pepton alkalis dengan konsentrasi 10 kali, kemudian disaring melalui membran filter 0,45 μm guna mengisolasi bakteri *Vibrio cholerae*. Membran filter dimasukkan ke dalam air pepton alkalis; sebagai media *enrichment*. Koloni *Vibrio cholerae* diperoleh dengan meneteskan 50 μL sampel menggunakan mikropipet diatas media selektif, TCBS, sehingga diperoleh koloni yang terpisah dengan baik. Koloni kuning, pipih, mengindikasikan kemampuan dalam memfermentasi sukrosa, diambil untuk dilakukan uji biokimia. Hasil isolasi koloni bakteri berwarna kuning (koloni yang memiliki kemampuan memfermentasi sukrosa) pipih yang tumbuh di media TCBS diinokulasi pada media "Zero NaCl broth" dan dilanjutkan uji biokimia lainnya. Isolat yang tidak memberikan hasil positif (*slant* merah dan *butt* kuning) tidak dilanjutkan ke uji biokimia lainnya karena dianggap tidak mewakili karakteristik isolate *Vibrio cholerae*. Hasil diperoleh 14 isolat memberikan hasil adanya pertumbuhan pada media "Zero NaCl broth" ditunjukkan dengan adanya kekeruhan pada media. Setelah dilanjutkan uji biokimia, diperoleh 14 isolat yang diduga sebagai *Vibrio cholerae*.

Adapun hasil identifikasi isolat dari sampel air Sungai Kalimas Surabaya dapat dilihat pada tabel 5.7 berikut ini :

Tabel 5.7 : Hasil Identifikasi Isolat dalam Sampel Air Sungai Kalimas Surabaya

No	Kode	Hasil
1	1.2.a	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
2	1.1.c	<i>Aeromonas salmonicida</i> ssp
3	1.3.a	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
4	1.3.b	<i>Vibrio alginolyticus</i>
5	1.3.c	<i>Vibrio cholerae</i> Non-O1
6	1.4.a	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
7	2.4.b	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
8	2.5.b	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
9	2.5.c	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
10	3.2.b	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
11	3.4.b	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
12	3.5.b	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
13	3.7.c	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
14	4.2.b	<i>Vibrio alginolyticus</i>
15	4.2.c	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
16	4.3.a	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
17	4.3.b	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
18	4.3.c	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
19	4.4.a	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
20	4.5.a	<i>Aeromonas salmonicida</i> ssp
21	4.5.c	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
22	4.6.b	<i>Vibrio alginolyticus</i>
23	4.6.c	<i>Vibrio alginolyticus</i>
24	5.3.b	<i>Aeromonas salmonicida</i> ssp
25	5.3.c	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
26	5.5.a	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
27	5.5.c	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
28	5.6.b	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
29	5.6.c	<i>Vibrio alginolyticus</i>
30	6.2.a	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
31	6.3.c	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
32	6.3.a	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
33	6.4.a	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
34	6.4.b	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
35	6.5.a	<i>Vibrio alginolyticus</i>
36	6.6b	<i>Aeromonas salmonicida</i> ssp

Keterangan Kode Titik Sampel:

Angka pada digit pertama : Lokasi titik pengambilan sampel air sungai

Angka pada digit kedua : Pengambilan ke-n

Huruf pada digit ketiga : Isolat

Uji statistik tidak dapat dilakukan pada kepadatan *Vibrio cholerae* karena isolat yang tumbuh pada media TCBS tidak menunjukkan jenis bakteri yang sama setelah dilakukan uji biokimia untuk menetapkan bahwa isolat yang tumbuh merupakan *Vibrio cholera*. Uji serologi pada 14 isolat yang diduga *Vibrio cholerae* tidak menghasilkan adanya reaksi agglutinasi dengan polivalent *Vibrio cholera* O1. Uji biokimia menggunakan API 20 NE System terhadap 6 isolat yang tidak tumbuh pada media "Zero NaCl broth" diperoleh hasil teridentifikasinya spesies bakteri vibrio lain yaitu *Vibrio alginolyticus*.

Metode PCR digunakan untuk menguji keempat belas isolat yang diduga *Vibrio cholerae*. Uji keberadaan gen *ctxA* pada 14 isolat yang diduga *Vibrio cholerae* menggunakan metode PCR diperoleh hasil tidak ada isolat yang mengandung gen *ctxA*. Deteksi gen *ctxA* pada sampel air Sungai Kalimas secara langsung menggunakan metode PCR juga diperoleh hasil kandungan *ctxA* tidak ditemukan pada sampel. Adapun deteksi keberadaan gen *ctxA* dengan metode PCR dapat dilihat pada lampiran VII.

BAB 6
PEMBAHASAN

BAB 6

PEMBAHASAN

Vibrio cholerae merupakan bakteri yang menimbulkan penyakit kolera, suatu penyakit diare epidemik, yang menjadi masalah kesehatan khususnya di negara berkembang yang memiliki kondisi sosial ekonomi, sistem sanitasi, sistem pengawasan keamanan air minum dan kesehatan masyarakat yang kurang baik (Preez *et al.*, 2003). Indonesia, termasuk negara berkembang yang tidak lepas dari kemungkinan terkenanya penyakit kolera di kalangan masyarakat, khususnya bagi mereka yang memanfaatkan air yang terkontaminasi *Vibrio cholerae*.

Keberadaan *Vibrio* yang bersifat halopilik di lingkungan *freshwater* dilaporkan dari India dan Jerman barat. Sejumlah besar *Vibrio cholera* dapat diisolasi di lingkungan *estuarine* dan hanya sebagian kecil yang dapat diisolasi dari lingkungan *freshwater* (Kasthuri Venkateswaran *et al.*, 1989). Ekologi *Vibrio cholerae*, faktor abiotik dan biotik mempunyai kaitan dengan kelangsungan hidup bakteri di lingkungan akuatik. Dari studi laboratorium diperoleh data bahwa *Vibrio cholerae* mendapat kondisi yang menguntungkan di lingkungan air yang memiliki karakteristik : suhu hangat (30-37°C), keasaman netral atau sedikit alkali (7-8,5 jika salinitas sedang; 7,5-9 jika salinitas rendah), salinitas sedang (1,5%-2,5%), mengandung nutrisi yang tinggi, dan adanya makrofit akuatik, phytoplankton, zooplankton, ikan, moluska dan crustacea (Borroto, 1997). Penelitian ini meninjau faktor abiotik dari ekologi *Vibrio cholerae* yang terdiri dari suhu, keasaman dan salinitas air Sungai Kalimas Surabaya serta faktor kepadatan *Vibrio cholerae*.

Suhu merupakan salah satu variabel utama (selain salinitas) yang mempengaruhi ekologi *Vibrio cholerae*. Suhu berperan pada keberadaan *Vibrio cholerae* di lingkungan aquatik. Suhu air yang hangat dapat berpotensi meningkatkan pertumbuhan *Vibrio cholerae* yang lebih cepat di lingkungan aquatik (Sedas, 2007).

Suhu maksimum mempercepat kematian bakteri, karena kerusakan pada protoplasma. Suhu yang tidak sesuai yakni lebih rendah dari suhu minimum menyebabkan kematian bakteri dan berkurangnya metabolisme. Pembekuan dapat menyebabkan kematian bakteri. Penyebab kematian bakteri akibat pembekuan belum diketahui dengan jelas. Kecepatan pembekuan kemungkinan menyebabkan laju *survival* bakteri menjadi tidak ada. Suhu yang dekat dengan suhu minimum atau maksimum menyebabkan perubahan morfologi pada berbagai macam bakteri. Dalam kondisi kultur/biakan murni, pengaruh suhu pada reaksi-reaksi biologis bakteri secara *in vitro* senantiasa berubah-ubah. Di alam, kondisi lingkungan bakteri sangat sulit diobservasi bahkan tidak dapat. Fluktuasi perubahan musim menyebabkan suatu perubahan populasi bakteri (Waluyo, 2005).

Keberadaan *Vibrio cholerae* dalam penelitian ini dijumpai di 5 titik sampling kecuali titik keempat. Keberadaan *Vibrio cholerae* ini didukung dengan kondisi suhu rata-rata air Sungai Kalimas 28,1°C, dimana kisaran suhu tersebut memungkinkan bagi *Vibrio cholerae* untuk tumbuh. Diketahui suhu optimal bagi pertumbuhan *Vibrio cholerae* yakni 16°C- 42°C (Sedas, 2007). Terdeteksinya *Vibrio cholerae* perairan pada musim penghujan dalam penelitian ini tidak sesuai dengan fakta yang dikemukakan oleh Heidelberg *et al*, 2002 bahwa adanya suatu peningkatan *Vibrio cholerae* pada sampel air yang dikumpulkan dari Sungai

Choptank di Chesapeake Bay selama musim panas (Heidelberg *et al.*, 2002). Studi Castaneda *et al.*, 2005 juga menunjukkan keberadaan *Vibrio cholerae* dikaitkan dengan suhu $> 30^{\circ}\text{C}$. Ini mengindikasikan bahwa variabilitas suhu hangat ($>30^{\circ}\text{C}$) mempengaruhi keberadaan *Vibrio cholerae* (Castaneda *et al.*, 2005).

Kondisi asiditas juga mendukung bagi keberadaan *Vibrio cholerae* di lingkungan perairan. *Vibrio cholerae* sangat sensitif terhadap asiditas kurang dari 6.0. (Brooks *et al.*, 2001). Diketahui asiditas rata-rata air Sungai Kalimas dalam penelitian ini adalah 6,89. Nilai asiditas rata-rata air Sungai Kalimas kurang memberi dukungan yang optimal pada kemampuan *Vibrio cholerae* dalam bermultiplikasi dan melekat pada *copepoda*. Hal ini dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan oleh Huq *et al.*, bahwa asiditas 8,5 memberikan kondisi yang optimal bagi *Vibrio cholerae* dalam bermultiplikasi dan menempel pada *copepoda* dibandingkan dengan asiditas 6,5 dan asiditas 7,5 (Huq *et al.*, 1984).

Selain suhu dan asiditas, salinitas merupakan variabel utama yang mempengaruhi ekologi *Vibrio cholerae*. Salinitas juga berperan pada keberadaan *Vibrio cholerae* di lingkungan akuatik (Sedas, 2007). Bagaimanapun *Vibrio spp* yang berkaitan dengan penyakit manusia (termasuk kolera), merupakan bakteri halofilik yang membutuhkan Na^+ 0,5-3% untuk pertumbuhan yang optimal (Colwell and Chun, 2009).

Dengan menggunakan metode kultur dalam penelitian ini diperoleh hasil adanya *Vibrio cholerae* pada titik-titik pengambilan sampel air kecuali pada titik keempat. Inokulasi isolat pada media "Zero NaCl broth" dimaksudkan untuk memperkuat dugaan bahwa isolat yang diamati adalah *Vibrio cholerae*. Hal ini sesuai dengan ciri-ciri *Vibrio cholerae* seperti yang tertulis dalam buku Bailey &

Scott's, yakni mampu tumbuh pada media kultur yang tidak mengandung NaCl (NaCl 0%). Walaupun ciri ini dimiliki *Vibrio mimicus*, namun ciri lain yang membedakan keduanya adalah dalam kemampuannya memfermentasi sukrosa. *Vibrio mimicus* tidak memiliki kemampuan memfermentasi sukrosa sedangkan *Vibrio cholerae* memiliki kemampuan memfermentasi sukrosa (Forbes *et al.*, 2002).

Kadar salinitas air sungai dalam penelitian ini 0,0040%, dimana konsentrasi NaCl yang optimal bagi *Vibrio cholerae* untuk *survive* adalah 2%, meskipun konsentrasi antara 0,25%-3,0% juga mendukung (Borroto, 1997). Walaupun salinitas, yang merupakan faktor pendukung bagi keberadaan *Vibrio cholerae* dalam penelitian ini rendah (0,0040%) dan tidak mendukung secara optimal keberadaan *Vibrio cholerae* untuk *survive*, namun *Vibrio cholerae* di Sungai Kalimas dapat ditemukan. Studi ini menunjukkan bahwa *Vibrio cholerae* mampu *survive* di lingkungan *freshwater*, air sungai. Studi ini didukung oleh penelitian terdahulu yang menggunakan sampel air danau, mengindikasikan bahwa *Vibrio cholerae* tidak hanya mampu *survive* tetapi juga mampu tumbuh di lingkungan *freshwater* (Vital *et al.*, 2007).

Tidak ditemukan isolat *Vibrio cholerae* toksigenik dalam Sungai Kalimas Surabaya karena salinitas Sungai Kalimas tidak mendukung bagi isolat *Vibrio cholerae* dalam mengekspresikan gen yang menyandi *cholera toxin*. Hal ini diperkuat dengan pernyataan bahwa ekspresi *cholera toxin* akan optimal dalam perairan yang memiliki salinitas 2% sampai 2,5 %. Studi pendukung pernyataan ini telah terjadi di Alvarado yang menemukan *Vibrio cholerae* O1 Inaba di lingkungan perairan yang memiliki salinitas 6,27% (Sedas, 2007).

Ditemukan *Vibrio cholerae* ini jika dikaitkan antara suhu, asiditas, dan salinitas yang diperoleh dalam penelitian ini kontras dengan penelitian yang dilakukan oleh Miller *et al*, bahwa walaupun *Vibrio cholerae* toksigenik toleran terhadap lingkungan alkali (basa) namun sangat sensitif pada lingkungan yang bersifat asiditas (Miller *et al.*, 1986). Diketahui asiditas optimal bagi kelangsungan hidup *Vibrio cholerae* pada suhu air 25°C, salinitas sedang (2%) adalah asiditas 7-8,5; sedangkan asiditas 7,5-9 pada salinitas rendah (0,05%) (Borroto, 1997). Hal ini menunjukkan asumsi bahwa semakin rendah kadar salinitas air, makin tinggi asiditas yang dibutuhkan bagi keberadaan *Vibrio cholerae*. Kondisi tersebut tidak dijumpai dalam penelitian ini, yakni salinitas yang rendah (0,004%) tidak didukung oleh asiditas (pH=6,889) lingkungan perairan. Kenyataan ini kontras dengan fakta yang terjadi di Austria pada Danau Neusiedler See, dimana danau tersebut memiliki kadar salinitas sedang antara 0,1% hingga 0,35% didukung dengan asiditas antara 7,8 dan 9,1. Pada kondisi ini dijumpai *cholerae* non toksigenik yang menyebabkan kasus otitis dan septicemia di wilayah tersebut (Kirschner *et al.*, 2008).

Uji statistik kepadatan *Vibrio cholerae* pada penelitian ini tidak dapat dilakukan karena hasil isolasi, identifikasi serta uji biokimia diperoleh keragaman jenis isolat. Studi ini menunjukkan bahwa penggunaan media TCBS tidak mendukung bagi perolehan jumlah kepadatan *Vibrio cholera* karena masih dijumpai pertumbuhan bakteri lain, yakni *Aeromonas salmonicida ssp*, *Brevundimonas vesicularis* dan *Pasteurella pneumotropica*.

Keberadaan *Vibrio cholera* di titik 1, 2, 3, 5 dan 6 ini dimungkinkan didukung oleh faktor abiotik yakni suhu, asiditas, dan salinitas; dimana masing-masing memiliki nilai rata-rata yang sama di 6 titik Sungai Kalimas Surabaya. Selain itu, kebiasaan membuang tinja di lokasi ini diduga merupakan faktor yang memiliki kontribusi pada kepadatan *Vibrio cholerae*. Salah satu kadungan tinja adalah bahan organik, yang dapat membentuk karbohidrat, serta mengandung nutrien, umumnya mengandung senyawa nitrogen. (Zainuddin, 2008). Karbohidat dan nitrogen merupakan senyawa yang dibutuhkan untuk mendukung pertumbuhan *Vibrio cholerae* (Fobes *et al.*, 2002).

Tidak ditemukannya *Vibrio cholerae* pada titik keempat dimungkinkan adanya faktor lain yang mempengaruhi keberadaan *Vibrio cholerae* di lokasi tersebut, sehingga distribusi *Vibrio cholerae* terutama *Vibrio cholerae* non-O1 tidak merata seperti kemampuan bakteri memperoleh *Assimilable Organic Carbon* (AOC). *Assimilable Organic Carbon* merupakan faktor penting dalam menentukan komunitas bakteri di dalam ekosistem air. *Assimilable Organic Carbon* merupakan bagian dari *dissolved organic carbon* yang tersedia untuk dikonsumsi oleh bakteri untuk menghasilkan proliferasi sel. *Assimilable Organic Carbon* terdiri dari komponen kecil dari massa molekul asam amino, gula atau asam organik yang dihasilkan dari proses fotosintesis, hidrolisis biologis dan kimia dari bahan-bahan organik alami, yang selanjutnya dikonsumsi bakteri. Bakteri berkompetisi untuk mendapatkan unsur-unsur *Assimilable Organic Carbon* (AOC) sebagai sumber energi/ karbon (Vital *et al.*, 2007).

Metode yang digunakan dalam dalam memproses sampel air sungai Kalimas Surabaya berdasarkan penelitian yang dilakukan Chomvarin *et al* (2007)

di Thailand. Hal ini dilakukan dengan harapan mendapatkan isolat *Vibrio cholerae* di lingkungan perairan. Hal ini berdasarkan pertimbangan bahwa Thailand termasuk wilayah Asia Tenggara, terletak di wilayah tropis sebagaimana Indonesia. Keberhasilan mengisolasi *Vibrio cholerae* dalam studi Chomvarin *et al* diasumsikan dapat diterapkan di Indonesia, khususnya di perairan Surabaya. Asumsi ini juga dilatarbelakangi oleh pernyataan bahwa *Vibrio cholerae toksigenik* merupakan agen penyebab kolera epidemik di beberapa negara berkembang (Chomvarin *et al.*, 2007); dimana dinyatakan bahwa umumnya kolera terbatas pada negara-negara berkembang yang memiliki sistem hygiene dan sanitasi yang kurang baik (Kirschner *et al.*, 2008).

Adanya *Vibrio cholerae* di lingkungan perairan dalam penelitian ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Chomvarin *et al* yang menggunakan metode kultur. Hasil penelitian Chomvarin *et al* terhadap sampel air sungai diperoleh hasil positif adanya *Vibrio cholerae*. Hal ini diperkuat dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Vital *et al* bahwa *Vibrio cholerae* selain memiliki kemampuan untuk *survive* di *freshwater* namun juga mampu tumbuh pada *freshwater* (Vital *et al.*, 2007).

Uji laboratorium kualitas mikrobiologis yang dilakukan Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pemberantasan Penyakit Menular (BBTKL & P2M) Surabaya tanggal 4 Desember 2008, menunjukkan nilai *total coliform* dan *fecal coliform* yang melebihi baku mutu kualitas air kelas III (Peraturan Daerah Propinsi Jawa Timur No.2 tahun 2008). Dalam penelitian ini menunjukkan adanya potensi keberadaan *Vibrio cholerae* pada lingkungan perairan yang memiliki nilai

total coliform dan *fecal coliform* yang melebihi baku mutu kualitas air sesuai peruntukannya.

Observasi dan hasil wawancara diketahui bahwa Sungai Kalimas Surabaya di masing-masing titik pengambilan sampel sering digunakan sebagai tempat buang air besar. Ketidakhadiran *Vibrio cholerae* di titik keempat, memberikan dugaan bahwa tidak ada hubungan antara jumlah *fecal coliform* (yang digunakan sebagai indikator pencemaran tinja manusia oleh BBTCL & P2M), dengan strain toksigenik dan nontoksigenik *Vibrio cholerae* di lingkungan akuatik. Hal ini didukung dengan studi sebelumnya bahwa *Vibrio cholerae* dapat *survive* di air yang secara relatif, bebas dari kontaminasi tinja manusia (Borroto, 1997).

Analisis dengan menggunakan metode PCR dalam penelitian ini diperoleh hasil tidak dijumpai isolat *Vibrio cholerae* yang mengandung gen *ctxA*. Tidak dijumpainya isolat yang mengandung gen *ctxA* pada isolat *Vibrio cholerae* mengindikasikan bahwa isolat tersebut tidak berpotensi menghasilkan *cholera toxin*. Hal ini sesuai dengan pernyataan bahwa pada umumnya *cholera toxin* dihasilkan oleh *Vibrio cholerae* O1 dan O139 (Nair *et al.*, 2006) serta kebanyakan dari strain *Vibrio cholerae* lingkungan tidak menghasilkan *cholera toxin* (Jiang *et al.*, 2003). Hal ini disebabkan karena kebanyakan strain *Vibrio cholerae* yang berasal dari lingkungan kekurangan gen virulensi lain yang diperlukan untuk menghasilkan *cholera toxin* (Sedas, 2007).

Penggunaan metode PCR dalam penelitian ini dimaksudkan untuk mendeteksi keberadaan gen *ctxA* pada isolat yang diduga *Vibrio cholerae* dengan alasan bahwa metode PCR sangat bermanfaat, khususnya terhadap sampel lingkungan. Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) selain cepat memberikan

hasil analisis, memiliki sensitivitas yang lebih baik (Lipp *et al.*, 2003). Hal ini diperkuat oleh Chomvarin *et al* bahwa *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan teknik molekuler yang cepat dan reliabel untuk mendeteksi *V.cholerae* toksigenik yang terdapat di lingkungan aquatik (Chomvarin *et al.*, 2007). Penelitian ini menggunakan spesifik primers *ctxA Vibrio cholerae* untuk mendeteksi keberadaan gen *cholera toxin Vibrio cholerae* dalam sampel air sungai, sesuai dengan primers yang digunakan dalam penelitian Binsztein *et al* (2004).

Penemuan *Vibrio cholerae* non toksigenik dalam penelitian ini kontras dengan kehadiran gen *ctxA* diantara isolat *Vibrio cholerae* lingkungan yang diisolasi dari air danau dan kolam di bagian timur Calcutta, India. Karena sejak wilayah India merupakan sebuah area endemik kolera, kemungkinan keberadaan gen *ctxA* ini didukung oleh pembuangan limbah manusia dari sebuah populasi yang menderita penyakit kolera. Bukan berarti bahwa pada daerah nonepidemik tidak dapat dijumpai *Vibrio cholerae* non-O1 yang mengandung gen *ctxA*, hal ini seperti ditunjukkan penelitian yang dilakukan di Newport Bay, California. Hasil penelitian tersebut menemukan 18 (17%) *Vibrio cholerae* non-O1 mengandung gen *ctxA* dari 104 *Vibrio cholerae* non-O1 yang diisolasi. Namun beredarnya gen-gen *ctxA* di lingkungan perairan pada suatu daerah nonepidemik adalah belum jelas (Jiang *et al.*, 2003).

Keberadaan *Vibrio cholerae* non-O1 perlu diwaspadai, hal ini dikarenakan bahwa transfer gen-gen *cholera toxin* di lingkungan dapat difasilitasi oleh filamen phage CTX Φ . Suatu survey yang dilakukan di sebelah barat Bengal, India, mengungkapkan suatu distribusi yang luas dari gen *cholera toxin* diantara *Vibrio*

cholerae di air permukaan. Studi menunjukkan bahwa proses pemindahan/transduksi di lingkungan alami dapat menghasilkan strain lingkungan nontoksigenik menjadi strain yang membawa gen *cholera toxin*. (Gun-Zo *et al.*, 2002). Transfer *filamentous bacteriophage* CTX Φ diantara strain klinis membutuhkan *toxin-coregulated pilus* (TCP) sebagai reseptor untuk CTX Φ , yang dapat menginfeksi *Vibrio cholerae* non toksigenik, mengawali keberadaan strain toksigenik yang baru (Chakraborty *et al.*, 2000). Hipotesis bahwa diperolehnya CTX Φ dalam tubuh manusia sejak diketahui ekspresi TCP optimal terjadi di saluran gastrointestinal. Adanya ketidakjelasan mengenai beredarnya gen-gen *ctxA* di lingkungan aquatik di area non epidemik menimbulkan anggapan bahwa kemungkinan beredarnya gen-gen *ctxA* *Vibrio cholerae* melalui mekanisme transfer gen yang berbeda di lingkungan aquatik. Hal ini diperkuat dengan penelitian sebelumnya bahwa isolat *Vibrio cholerae* negatif TCP dan strain *Vibrio mimicus* negatif TCP peka terhadap infeksi oleh *filamentous phage* CTX Φ dan membentuk lysogenik yang stabil (Jiang *et al.*, 2003).

Tidak ditemukan *Vibrio cholerae* toksigenik pada tiap titik sampling Sungai Kalimas Surabaya mengindikasikan bahwa tidak ada hubungan antara kebiasaan buang air besar khususnya penderita kolera yang menunjukkan *symtomatic* ataupun *asymtomatic*, di Sungai Kalimas Surabaya. Dugaan ini diperkuat oleh pernyataan bahwa individu yang tidak menunjukkan gejala kolera (*asymtomatic*) dapat mengeluarkan 10^2 - 10^5 *Vibrio cholerae*/gram tinja sedangkan penderita kolera dengan *rice water stool* mengeluarkan 10^6 - 10^9 *Vibrio cholerae*/mL tinja (Percival *et al.*, 2004).

Selain ditemukannya bakteri *Vibrio cholerae*, terdapat spesies *Vibrio* lain yang teridentifikasi menggunakan API 20 NE yaitu *Vibrio alginolyticus*, merupakan spesies bakteri patogen pada hewan laut dan manusia (Balebona *et al.*, 1998). *Vibrio alginolyticus* merupakan bakteri halofilik, pertama kali dikenal sebagai patogen pada manusia tahun 1973. Infeksi telinga dapat ditimbulkan oleh bakteri ini sedangkan gastroenteritis jarang ditimbulkan oleh *Vibrio alginolyticus*. (Daniels and Shafaie, 2000). Penyakit klinis lain yang disebabkan *Vibrio alginolyticus* adalah infeksi luka dan otitis eksternal (Murray *et al.*, 2005).

Walaupun isolat *Vibrio cholerae* Sungai Kalimas tidak mengandung gen *ctxA*, namun isolat tersebut mengandung gen *toxR*. Primers untuk mendeteksi keberadaan gen *toxR* dalam penelitian ini menggunakan primers *toxR* untuk *Vibrio cholerae* dengan ukuran 779 bp (Singh *et al.*, 2002). Ini menunjukkan bahwa walaupun *V. cholerae* yang ditemukan tidak mengandung *ctxA*, namun spesies ini mengandung gen *toxR*, yang berpotensi mengekspresikan gen-gen virulensi lainnya. Hal ini menimbulkan dugaan apakah strain *Vibrio cholerae* O1 merupakan konversi dari *Vibrio cholerae* non-O1 melalui transfer *filamentous bacteriophage* CTX Φ . Dugaan ini diperkuat dengan hasil penelitian Maiti *et al* yakni strain *Vibrio cholerae* non-O1 dan *Vibrio cholerae* non-O139 dapat secara simultan diinfeksi oleh berbagai CTX Φ yang berperan dalam timbulnya *clones* epidemik baru (Maiti *et al.*, 2006).

Gen *toxR* menyandi suatu protein regulator transmembran yang mengendalikan ekspresi gen virulensi pada *Vibrio cholerae* (Dziejman *et al.*, 1999). Ini menegaskan bahwa ekspresi dari gen yang mengkode *cholera toxin* dikendalikan oleh sistem regulator *toxR*. Protein ini mengaktifkan peningkatan

transkripsi *ctxAB*, mengakibatkan produksi *cholera toxin* pada tingkat yang tertinggi (Ottemann and Mekalanos, 1994). Adapun spesies *Vibrio* lain yang memiliki gen *toxR* selain *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, adalah *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio parahaemolyticus* (Provenzano *et al.*, 2000) dan *Vibrio anguillarum* (Wang *et al.*, 2002). Dalam penelitian Provenzano *et al.*, peran ToxR pada *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio parahaemolyticus* adalah memodulasi/ mengatur ekspresi *outer membrane protein* bakteri ini. Analisis genetik yang dilakukan oleh Miller dan Mekalanos pada *regulatory gen toxR* terhadap *cholera toxin* menghasilkan adanya perbedaan kemampuan gen-gen *toxR* untuk mengaktivasi *ctx* dari strain yang berbeda (Miller dan Mekalanos, 1985); sedangkan protein ToxR merupakan sebuah protein dengan berat molekul 32 kDa yang memiliki 3 komponen, yaitu: DNA *binding domain* (terminal amino, *cytoplasmic*), *transmembrane domain* (tunggal dan hidrofobik), dan *carboxy-terminal domain* yang berada pada periplasma (Chaudhuri and Chatterjee, 2009).

BAB 7
KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diperoleh dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- 7.1.1 Kondisi suhu, asiditas, dan salinitas Sungai Kalimas mendukung keberadaan *Vibrio cholerae* non-O1.
- 7.1.2 Uji kepadatan *Vibrio cholerae* tidak dapat dilakukan karena hasil isolasi di media TCBS tidak menunjukkan kehomogenan isolat *Vibrio cholerae*.
- 7.1.3 *Vibrio cholerae* non-O1 yang diisolasi dalam penelitian ini mengandung gen pengatur gen-gen virulensi yang lain, *toxR*, sehingga dianggap berpotensi menjadi strain toksigenik dan berpotensi menimbulkan masalah kesehatan masyarakat.
- 7.1.4 Adanya dugaan strain *Vibrio cholerae* O1 merupakan konversi dari *Vibrio cholerae* non-O1 melalui transfer *filamentous bacteriophage* CTX Φ .

7.2 Saran

- 7.2.1 Perlu penelitian lanjutan eksistensi *Vibrio cholerae* isolat perairan di musim kemarau.
- 7.2.2 Perlu penelitian lanjutan untuk menemukan *Vibrio cholerae* isolat perairan yang mengandung gen *ctxA*.
- 7.2.3 Perlu penelitian lanjutan untuk membuktikan apakah strain *Vibrio cholerae* O1 merupakan konversi dari *Vibrio cholerae* non-O1 melalui transfer

filamentous bacteriophage CTX Φ agar peredaran gen *ctxA* diantara *Vibrio cholerae* isolat perairan lebih jelas.

7.2.4 Diperlukan rencana program perbaikan kualitas lingkungan di sepanjang Kalimas Surabaya, seperti : mendesain jamban umum yang memenuhi syarat kesehatan lingkungan di lokasi padat penduduk.

7.2.5 Diperlukan *Health Education* kepada masyarakat bahwa Sungai Kalimas Surabaya mengandung *Vibrio cholerae* yang berpotensi menimbulkan kolera.

DAFTAR PUSTAKA

Daftar Pustaka

- Albert MJ., Siddique AK., Islam MS *et al*, 1993. Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. *Lancet* 341:704.
- Balebona MC., Andreu MJ., Bordas MA *et al*. 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for Cultured Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata* L.). *Appl and Microbiol.* 64 : 11, 4269-75.
- Bapedal Jatim, 2007. Pedoman Pemantauan Terpadu Kualitas Air Sungai di Jawa Timur. Surabaya : 1-50.
- Bappeko, 2005. Keadaan Kawasan Sungai Kalimas dan sekitarnya: Rencana Penataan dan Revitalisasi Sungai Kalimas-Surabaya. <Http://bappeko.surabaya.go.id/bappeko.pdf>, 1-104. Download: 14 Januari 2009.
- BBTKL & P2M, 2008. Laporan Hasil Pengujian Air Badan Air Sungai Kalimas. Surabaya
- Benenson A, 1990. Control of communicable diseases in man. 15th ed. Washington DC, American Public Health.
- Binsztein N., Costagliola MC., Pichel M *et al*, 2004. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Applied and Environ.Microbiol*, 70: 12, 7481-86
- Birmingham ME., Lee LA., Nda Yimirije *et al*, 1997. Epidemic cholera in Burundi : patterns of transmission in the Great Rift Valley Lake region. *Lancet*, 349: 981-85
- Bonilla-Castro E, Rodriguez P and Carrasquilla G. 2000. La Enfermedad de la Pobreza, El Cólera en los Tiempos Modernos. Santafé de Bogotá: Ediciones Uniandes. *In Review Article* : Influence of environmental factors on the presence of *Vibrio cholerae* in the marine environment: a climate link (Violeta T.P.S. 2007)
- Borroto RJ, 1997. Ecology of *Vibrio cholerae* serogroup O1 in aquatic environments. *Rev. Panam Salud Publica/ Pan Am J Public Health*, 2: 5, 328-33
- Bradford AK., Cheryl AB and Joy GW, 1994. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 from Fecal Specimen. 1th edition. *In* : *Vibrio cholerae* and cholera. Washington D.C, ASM Press: 3-26.

- Brooks GF., Butel JS and Morse SA, 2001. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 22 eds. USA : McGraw-Hill Companies, Inc. 235-37.
- Castañeda Chávez MR, Pardío V, Orrantia E and Lango F, 2005. Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, México. Mar Poll Bull 50:1641-1648.
- Chakraborty S., Mukhopadhyay AK., Bhadra RK *et al*, 2000. Virulence Genes in Environmental Strains of *Vibrio cholerae*. Appl and Environ Microbiol, 66 : 9, 4022-28.
- Chaudhuri K and Chatterjee. 2009. Cholera Toxins. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 147-64.
- Chomvarin C., Namwat W., Wongwajana S., *et al*, 2007. Application of duplex-PCR in rapid and reliable detection of toxigenic *Vibrio cholerae* in water samples in Thailand. J.Gen.Appl. Microbiol, 53: 229-37.
- Chow KH., Ng TK., Yuan KY *et al*, 2001. Detection of RTX Toxin Gene in *Vibrio cholerae* by PCR. J Clin Microbiol, 39: 2594-7
- Coleman L, 2003. Cholera. NewYork. Chelsea house, 28-35.
- Colwell RR and Chun J. 2009. The Genus *Vibrio* and Related Genera. In : Practical Handbook of Microbiology, eds 2. United State, CRC Press. 267-73.
- Colwell, R.R., J.B.Kaper and S.W. Joseph. 1977. *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. Science, 198: 394-396.
- Daniels NA and Shafaie A. 2000. A Riview of Pathogenic *Vibrio* Infections for Clinicians. Infect Med. 17 : 10, 665-85
- Depkes, 2008. Pemerintah Serius Tangani Diare-Kolera Di Papua, <http://www.depkes.go.id>, 1-3. Download: 3 Desember 2008
- Dewi KR, 2003. Pendugaan Kualitas Perairan Sungai Kalimas dengan Menggunakan Indeks Diversitas Hewan Bentos Makro. Skripsi, Universitas Airlangga Surabaya, Indonesia.
- Dirgantara Y, 2008. Use of Multiplex PCR Method for Detection of *ctxA* and *toxR* gene of *V. cholerae* O1 and Non-O1 from Clinical Samples. Thesis, University of Biotechnology Atma Jaya Catholic University, Jakarta-Indonesia.

- Dziejman M., Kolmar H., Fritz *et al*, 1999. ToxR co-operative interactions are not modulated by environmental condition or periplasmic domain conformation. *Molecular Microbiol*, 31 : 1, 305-17.
- Faruque SM and Nair GB, 2001. Molecular Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Immunol*, 46: 2, 59-66.
- Faruque SM., Albert MJ, and Mekalanos JJ, 1998. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*62:1301-1314.
- Feldman RA, 1992. Transmission of cholera: modes of spread and vehicles. *Microbiol. Dig.* 9:37-41.
- Feliatra, 1999. Identifikasi Bakteri Patogen (*Vibrio* sp) di Perairan Nongsa Batam Propinsi Riau. *Jurnal Natur Indonesia II* (1), 28-33.
- Fields PI., Popovic T., Wachsmuth K *et al*, 1992. Use of polymerase chain reaction for of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 8, 2118-21.
- Finkelstein RA and Hanne FF, 1983. Haemagglutinins (Colonization Factors?) Produced by *Vibrio cholerae*. *Ad. In Res. Chol. and Rel. Dis.* 5^{ed}. Kuwahara and N.F. Pierce, 121-5.
- Finkelstein, 1988. Cholera, the cholera enterotoxins, and the cholera enterotoxin-related enterotoxin family. In (Owen and T.J. Foster, Immunological and molecular genetic analysis of bacterial pathogens, eds). Amsterdam: Elsevier Science Publiser, 85-102.
- Forbes BA., Sahn DF and Weissfeld, 2002. *Diagnostic Microbiology*. United States of America, Mosby Inc. 423-34.
- Ge B., Zhao S., Hall R *et al*, 2002. A PCR-ELISA for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbes Infect.* 4: 285-290.
- Ghosh AR *et al*, 1994. Incidence and toxigenicity of *Vibrio cholerae* in freshwater lake during the epidemic of cholera caused by serogroup O139 Bengal in Calcutta, India. *FEMS Microbiol Ecol*, 14: 285-91.
- Griffith DC., Hope AKH and Miller MA, 2006. Reported Cholera Outbreaks Worldwide, 1995-2005. Review, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75: 5, 973-977
- Guentzel MN and Berry LJ, 1975. Motility as a Virulence Factor for *Vibrio cholerae*. USA: *Infection And Immunity*, 11: 5, 890-97.

- Gun Zo Y., Rivera ING., Cohen ER., *et al.* 2002. Genomic profiles of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* O1 in cholera-endemic areas of Bangladesh. PNAS, 99: 19, 12409-14.
- Gupte S, 1982. Mikrobiologi Dasar. Jakarta: Binarupa Aksara, 38-49.
- Haksar A., Maudsley DV and Peron EG, 1974. Neuraminidase treatment of adrenal cells increase their response to cholera enterotoxin. London: Nature, 251: 514-15.
- Hardy SJ., Holmgren J., Johansson S *et al*, 1988. Coordinated assembly of multisubunit protein: oligomerization of bacterial enterotoxin in vivo and in vitro. USA : Proc. Natl. Acad. Sci, 85: 7109-13.
- Heidelberg JF, Heidelberg KB and Colwell RR, 2002. Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. Appl Environm Microbiol 68:5488-5497.
- Hoshino K., Yamasaki S., Mukhopadhyay AK *et al*, 1998. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 20: 201-7
- Hung DT., Shakhnovich EA., Pierson E *et al*, 2005. Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. Science, 310: 670-74.
- Hunter PR, 2003. Climate change and waterborne and vector-borne disease. J Appl Microbiol 94:37S-46S.
- Huq A., West PA., Small EB *et al*, 1984. Influence of water temperatur, salinity and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar O1 associated with live copepods in laboratory microcosms. Appl and Envir Microbiol, 48: 2, 420-24.
- Islam MS., Drasar BS and Bradley DJ, 1990. Survival of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 with a common duckweed, *Lemna minor*, in artificial aquatic ecosystems. Trans R Soc Trop Med Hyg, 84: 422-24.
- Islam MS., Drasar BS and Sack RB, 1993. The aquatic environment as a reservoir of *Vibrio cholerae*. Review, J Diarrhoeal Dis Res, 11: 197-206.
- Islam MS., Drasar BS and Sack RB, 1994. The aquatic flora and fauna as a reservoir of *Vibrio cholerae*. Review, J. Diarrhoel. Dis. Res, 12: 87-96
- Jiang S., Chu W and Fu W, 2003. Prevalence of cholera toxin genes (*ctxA* and *zot*) among non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strains from Newport Bay, California. Applied and Environ.Microbiol, 69: 12, 7541-4.
- Joklik WK., Willet HP., Amos DB *et al*, 1992. Microbiology. 20th Ed. USA, Appleton & Lange, 566-75.

- Kaper JB., Morris JG JR and Levine MM, 1995. Cholera. In : Clinical Microbiology. Reviews, 8: 1, 48-86.
- Kay BA., Bopp CA., and Wells JG. 1994. Isolation and identification of *V.cholerae* O1 from fecal specimens. In *Vibrio cholerae* and cholera: Molecular to global perspectives (Wachsmuth IK., Blake PA., and Olsvik Ø). Washington DC, American Society for Microbiology, p. 3-25
- Kaysner CA and Hill WE, 1994. Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in food and water. In (I Kaye Wachsmuth *et al*). *Vibrio cholerae* and cholera: Molecular to global perspectives, 27-39.
- Khazaei HA., Rezaei N., Bagheri GR *et al*, 2005. The Epidemiology of *Vibrio cholerae* In Zabol City, Southeast of Iran. Arch Iranian Med, 8 : 3, 197-201.
- Kirschner AKT., Schlesinger J., Farnleitner A., *et al*, 2008. Rapid Growth of Planktonic *Vibrio cholerae* Non-O1/Non-O139 Strains in a Large Alkaline Lake in Austria: Dependence on Temperature and Dissolved Organic Carbon Quality. Appl and Environ Microbiol, 74: 7, 2004-15.
- Kleinbaum DG., Kupper LL and Morgenstern H. 1982. Epidemiologic Research. Wadsworth, Inc. New York : 62-93
- Kohlerschmidt DJ., Musser KA and Dumas NB, 2009. Identification of Aerobic Gram-Negative Bacteria. In: Goldman E and Green LH: Practical Handbook of Microbiology. 2th ed. CRC Press-United States of America. 67-79.
- Lipp EK., Huq A and Colwell RR, 2002. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. Clin. Microbiol. Rev. 15:757-70.
- Lipp EK., Rivera ING., Gil AI *et al*, 2003. Direct detection of *Vibrio cholerae* and *ctxA* in Peruvian coastal water and plankton by PCR. Applied and Environ. Microbiol, 69: 6, 3676-80.
- Mahalanabis D., Molla A and Sack D, 1992. Clinical Management of Cholera. In (D. Barua and W. Greenough, III eds). Cholera, New York: Plenum Medical Book Company, 253-83.
- Maiti D., Das B., Saha A., *et al*, 2006. Genetic organization of pre-CTX and CTX prophages in the genome of an environmental *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain. Microbiology, 152 : 3633-41.
- Manning PA., Strocher UH and Morona R, 1994. Molecular basis for O-antigen biosynthesis in *Vibrio cholerae* O1: Ogawa-Inaba switching. In (Wachsmuth IK., Blake P and Olsvik Ø, eds.). *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. Washington, D.C: American Society for Microbiology Press, 77-94.

- McMichael A., Woodruff RE and Hales S, 2006. Climate change and human health: present and future risks. *Lancet*, 367: 859-69.
- Miller C., Feachem R and Drasar BS, 1984. Response of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 to physicochemical stress in aquatic environments. *London: J Hyg*, 93: 475-95.
- Miller C., Feachem R., Drasar BS., *et al.* 1986. The impact of physico-chemical stress on the toxigenicity of *Vibrio cholerae*. *London: J Hyg*, 96: 49-57.
- Miller VL and Mekalanos JJ, 1985. Genetic Analysis of the Cholera Toxin-Positive Regulatory Gene *toxR*. *Journal of Bacteriology*, 163: 2, 580-85
- Minami A., Hashimoto S., Abe H *et al*, 1991. Cholera enterotoxin production in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from the environment and from human in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2152-2157.
- Murray PR., Rosenthal KS and Pfaller MA. 2005. *Vibrio* and *Aeromonas*. In *Medical Microbiology*. Fifth Edition, Elsevier Mosby. 339-45.
- Nair GB., Qadri F., Holmgren *et al*, 2006. Cholera Due to Altered El Tor Strains of *Vibrio cholerae* O1. *Journal Of Clinical Microbiology*, 44: 11, 4211-13
- Ottemann KM, and Mekalanos JJ. 1994. Regulation of Cholera Toxin Expression. In (Wachsmuth IK, Blake PA, and Olsvik Ø, eds). *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. Washington: D.C. ASM Press. 177-84
- Patel M., Isaacson M and Koornhof HJ, 2004. Survival of *Vibrio cholerae* in industrially polluted water, with particular reference to iron concentrations. *B.ISSN.0378-4738, water SA*, 30: 65-9.
- Peraturan Daerah Propinsi Jawa Timur No.2 tahun 2008 tentang Pengelolaan Kualitas Air Dan Pengendalian Pencemaran Air di Propinsi Jawa Timur.
- Percival SI., Chalmers RM., Embrey M., *et al*, 2004. *Vibrio cholerae*, In : *Microbiology of Waterborne Diseases*. California, Elsevier Academic Press. 197-205.
- Pierce NF, 1973. Differential inhibitory effects of cholera toxoids and ganglioside on the enterotoxin of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.* 137:1009-23.
- Popovic T., Fields PI and Olsvik Ø. 1994. Detection of Cholera Toxin Genes. In (Wachsmuth IK., Blake PA and Olsvik Ø). *Vibrio cholerae* and cholera: Molecular to global perspective, ASM Press. Washington DC. p.41-52.

- Pratiknya AW, 2007. Tipologi Penelitian Kedokteran. In Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan. Jakarta, PT Raja Grafindo Persada, 10-8.
- Preez Md., Venter SN and Theron J. 2003. Detection of viable toxigenic *Vibrio cholerae* and virulent *Shigella* spp. in environmental waters by pit-stop seminested polymerase chain reaction assays. ISSN 0378-4738 Water SA. 29: 2, 177-82.
- Provenzano D., Schuhmacher DA, Barker JL, *et al*, 2000. The Virulence regulatory Protein ToxR Mediates Enhanced Bile Resistance in *Vibrio cholerae* and Other Pathogenic *Vibrio* Species. Infection and Immunity, 68 : 3, 1491-97
- Rivera ING., Chun J., Huq A., Sack RB *et al*, 2001. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol, 67: 6, 2421-29.
- Rivera ING., Lipp EK., Gill A *et al*, 2003. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. Environ. Microbiol, 5: 599-606.
- Rose JB., Epstein PR., Lipp EK *et al*, 2001. Climate variability and change in the United States : potential impacts on water and foodborne diseases caused by microbiological agents. Environ Health Perspect 109 (suppl.2): 211-22.
- Sack DA., Sack RB., Nair GB *et al*, 2004. Cholera. Lancet 363: 223-32.
- Safa A., Sultana J., Cam PD *et al*, 2008. *Vibrio cholerae* O1 Hybrid El Tor Strains, Asia and Africa. Emerging Infectious Diseases, 14: 6, 987-8.
- Sedas VTP, 2007. Influence of environmental factors on the presence of *Vibrio cholerae* in the marine environment: a climate link. Review Article, J Infect Developing Countries, 1(3):224-41.
- Shangkuan YH., Show YS and Wang TM, 1995. Multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* and to biotype *Vibrio cholerae* O1. J.Appl. Bacteriol, 793: 264-273
- Shapiro RL., Otieno MR., Adcock PM, 1999. Transmission of epidemic *V.cholerae* O1 in Rural Western Kenya Associated with drinking water from lake victoria: An environmental reservoir for cholera? Am. J. Trop. Med. Hyg, 60 : 2, 271-76.
- Simanjuntak CH., Larasati W., Arjoso S *et al.*, 2001. Cholera in Indonesia in 1993-1999. Am. J. Trop. Med. Hyg, 65 : 6, 788-97.

- Singh DV, Isac SR, and Colwell RR, 2002. Development of a hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4321-4324.
- Singh DV., Matte MH., Matte GR *et al*, 2001. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 Strains: Clonal Relationship between clinical and environmental isolates. *Applied and Env.Microbiol*, 67: 2, 910-21.
- Staf Pengajar FK UI, 1993. Mikrobiologi Kedokteran. Jakarta: Binarupa Aksara, 174-5.
- Sudjana, 2005. Menentukan Ukuran Sampel : Metoda Statistik. Bandung: PT Tarsito, 212-4.
- Surat Keputusan Gubernur Kepala Daerah Tingkat I Jawa Timur No. 93 Tahun 1997 tentang Pola Pengelolaan Sungai Kalimas.
- Swerdlow DL., Malenga G., Begkoyian G *et al*, 1997. Epidemic cholera among refugees in Malawi, Africa: treatment and transmission. *Epidemiol Infect*, 118: 207-14.
- Tauxe R and Blake P, 1992. Epidemic cholera in Latin America. *JAMA*, 267: 1388-90.
- Theron J., Cilliers J., Preez MD *et al*, 2000. Detection toxigenic *Vibrio cholerae* from environmental water samples by enrichment broth cultivation-pit-stop semi-nested PCR procedure. *J of Appl Microbiol*, 89: 539-46.
- Thompson FL., T.lida., J.Swings, 2004. Biodiversity of Vibrios. *Reviews, Microbiology and Molecular Biology*, 68: 3,403-31.
- Tim Mikrobiologi FK Unibraw, 2003. Bakteriologi Medik. Malang: Bayumedia Publishing, 239-46.
- Venkateswaran K., Kiiyukia C., Takaki M *et al*, 1989. Characterization of Toxigenic Vibrios Isolated from the Freshwater Environment of Hiroshima, Japan. *O of Appl & Environ Microbiol*, 55: 10, 2613-2618.
- Vital M., Fuchslin HP., Hammes F *et al*, 2007. Growth of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa Eltor in freshwater. *Microbiol*, 153 : 1993-2001.
- Wachsmuth IK., Olsvik Ø., Evins GM *et al*, 1994. *Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular to Global Perspective. Wahington DC, USA : ASM Press, 357-70.
- Waldor MK, 2006. Disarming pathogens a new approach for antibiotic development. *N Engl J Med*, 354: 296-7.

- Waluyo L, 2005. Mikrobiologi Lingkungan. Universitas Muhammadiyah Malang. p. 12-107.
- Wang S-Y., Lauritz., Jass *et al*, 2002. A ToxR Homolog from *Vibrio anguillarum* Serotype O1 Regulates Its Own Production, Bile Resistance, and Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, 184 : 6, 1630-39.
- Wasito EB., Ichinose Y., Kataoka N., *et al*, 1995. Isolation Of Non-O1 *Vibrio cholerae* In Surabaya, Indonesia. In *Majalah Kedokteran Tropis Indonesia*, 2002, 13:1, 7-12.
- Wasito EB., Rahardjo D and Alimsardjono L, 2000. Patogen Usus Yang Diisolasi Dari Tinja Diare Pada Anak Rawat Inap Di Bawah Umur Dua. Surabaya, Indonesia , Airlangga University, 1-23.
- Wasito EB., Rahardjo D and De Vries GC, *In Press*. *Vibrio Cholerae* Profile. Surabaya, Indonesia , Airlangga University.
- Withey JH., DiRita VJ, 2006. The toxbox: specific DNA sequence requirements for activation of *Vibrio cholerae* virulence genes by ToxT. *Mol Microbiol*, 59: 1779-89.
- World Health Organization, 2000. Report on global surveillance of epidemic prone infectious diseases, communicable diseases and surveillance response. World Health Organization, Geneva, Switzerland. www.who.int/WER. download : 19 September 2008.
- World Health Organization, 2007. Cholera. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/index.html>, download: 19 September 2008
- World Health Organization, 2008. Weekly epidemiological record, 83: 50, 449–60 . <http://www.who.int/wer>. Download : 12 oktober 2008
- Yu J., Webb H and Hirst TR, 1992. A homologue of the *Escherichia coli* DsbA protein involved in disulphide bond formation is required for enterotoxin biogenesis in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 6: 1949-58
- Yuwono T, 2006. Teori dan Aplikasi : Polymerase Chain Reaction. Yogyakarta : CV Andi Offset.
- Zainuddin H, 2008. Kontaminasi Tinja, Sebuah Ancaman Kesehatan Sungai Banjarmasin. [Http://hasanzainuddin.wordpress.com/2008](http://hasanzainuddin.wordpress.com/2008). Download : 28 Juni 2009.

LAMPIRAN

**PENGELOLAAN KUALITAS AIR DAN PENGENDALIAN PENCEMARAN AIR
DI PROPINSI JAWA TIMUR
PERDA PROPINSI JAWA TIMUR NOMOR 2 TAHUN 2008
TENTANG PENGELOLAAN KUALITAS AIR DAN PENGENDALIAN
PENCEMARAN AIR DI PROPINSI JAWA TIMUR
KRITERIA MUTU AIR BERDASARKAN KELAS**

Parameter	Satuan	Kelas				Keterangan
		I	II	III	IV	
1	2	3	4	5	6	7
Fisika						
Temperatur	°C	Deviasi	Deviasi	Deviasi	Deviasi	Deviasi temperatur dari keadaan alamiah
		3	3	3	3	
Residu Terlarut	mg/L	1000	1000	1000	1000	
Residu Tersuspensi	mg/L	50	50	400	400	Bagi pengolahan air minum secara konvensional, residu tersuspensi ≤ 5000 mg/L
Kimia Anorganik						
pH		6-9	6-9	6-9	5-9	Apabila secara alamiah diluar rentang tersebut, maka ditentukan berdasarkan kondisi alamiah
BOD	mg/L	2	3	6	12	
COD	mg/L	10	25	50	100	
DO	mg/L	6	4	3	0	Angka batas maksimum
Total fosfat sbg P	mg/L	0.2	0.2	1	5	
NO ₃ sbgi N	mg/L	10	10	20	20	
NH ₃ -N	mg/L	0.5	(-)	(-)	(-)	Bagi perikanan, kandungan amonia bebas untuk ikan yang pela $\leq 0,02$ mg/L sebagai NH ₃ .
Arsen	mg/L	0.05	1	1	1	
Kobalt	mg/L	0,2	0,2	0,2	0,2	

1	2	3	4	5	6	7
Barium	mg/L	1	(-)	(-)	(-)	
Boron	mg/L	1	1	1	1	
Selenium	mg/L	0.01	0.05	0.05	0.05	
Kadmium	mg/L	0.01	0.01	0.01	0.01	
Khrom (VI)	mg/L	0.05	0.05	0.05	1	
Tembaga	mg/L	0.02	0.02	0.02	0.02	Bagi pengolahan air minum secara konvensional, $Cu \leq 1$ mg/L
Besi	mg/L	0,3	(-)	(-)	(-)	Bagi pengolahan air minum secara konvensional, $Fe \leq 5$ mg/L
Timbal	mg/L	0.3	0.03	0.03	1	Bagi pengolahan air minum secara konvensional, $Pb \leq 0,1$ mg/L
Mangan	mg/L		(-)	(-)	(-)	
Air raksa	mg/L	0.001	0.002	0.002	0.005	
Seng	mg/L	0.05	0.05	0.05	2	Bagi pengolahan air minum secara konvensional, $Zn \leq 5$ mg/L
Khlorida	mg/L	600	(-)	(-)	(-)	
Sianida	mg/L	0.02	0.02	0.02	(-)	
Fluorida	mg/L	0.5	1.5	1.5	(-)	
Nitrit sbg N	mg/L	0.06	0.06	0.06	(-)	Bagi pengolahan air minum secara konvensional, $NO_2_N \leq 1$ mg/L
Sulfat	mg/L	400	(-)	(-)	(-)	
Khlorin bebas	mg/L	0.03	0.03	0.03	(-)	Bagi ABAM tidak dipersyaratkan
Belerang sbg H ₂ S	mg/L	0.002	0.002	0.002	(-)	Bagi pengolahan air minum secara konvensional, S sbg H ₂ S < 0.1 mg/L

1	2	3	4	5	6	7
Mikrobiologi						
Fecal coliform	Jml/100 ml	100	1000	2000	2000	Bagi pengolahan air minum secara konvensional, fecal coliform ≤ 2000 jml/ 100 ml dan total coliform ≤ 10000 jml/100ml
Total coliform	Jml/100 ml	1000	5000	10000	10000	
Radioaktivitas						
Gross A	Bq/L	0.1	0.1	0.1	0.1	
Gross B	Bq/L	1	1	1	1	
Kimia Organik						
Minyak & Lemak	$\mu\text{g/L}$	1000	1000	1000	(-)	
Detergen sbg MBAS	$\mu\text{g/L}$	200	200	200	(-)	
Senyawa Fenol sbg fenol	$\mu\text{g/L}$	1	1	1	(-)	
BHC	$\mu\text{g/L}$	210	210	210	(-)	
Aldrin/ Dieldrin	$\mu\text{g/L}$	17	(-)	(-)	(-)	
Chlordane	$\mu\text{g/L}$	3	(-)	(-)	(-)	
DDT		2	2	2	2	
Heptachlor & heptachlor epoxide	$\mu\text{g/L}$	18	(-)	(-)	(-)	
Lindane	$\mu\text{g/L}$	56	(-)	(-)	(-)	
Methoxychl or	$\mu\text{g/L}$	35	(-)	(-)	(-)	
Endrin	$\mu\text{g/L}$	1	4	4	(-)	
Toxaphan	$\mu\text{g/L}$	5	(-)	(-)	(-)	

Keterangan :

Mg = miligram

μg = mikrogram

ml = mililiter

L = liter

Bq = Bequerel

MBAS = Methylene Blue Active Substance

ABAM = Air Baku untuk Air Minum

Logam Berat = merupakan logam terlarut

Nilai diatas merupakan batas maksimum kecuali untuk pH dan DO

Bagi pH merupakan nilai rentang yang tidak boleh kurang atau lebih dari nilai yang tercantum

Nilai DO merupakan batas minimum.

Arti (-) diatas menyatakan bahwa untuk kelas termaksud, parameter tersebut tidak dipersyaratkan.

Tanda \leq adalah lebih kecil atau sama dengan

Tanda $<$ adalah lebih kecil

GUBERNUR JAWA TIMUR

H. IMAM UTOMO S

PENGAMBILAN CONTOH UJI AIR

(Pedoman Pemantauan Terpadu Kualitas Air Sungai di Jatim, Bapedal, 2007)

Persyaratan Pengambilan Contoh Uji Air

1. Peralatan

Alat pengambilan contoh harus memenuhi persyaratan sebagai berikut :

- a. Terbuat dari bahan yang tidak mempengaruhi sifat contoh
- b. Mudah dicuci dari bekas contoh sebelumnya
- c. Contoh mudah dipindahkan ke dalam botol penampung tanpa adanya sisa bahan tersuspensi di dalamnya.
- d. Kapasitas alat 1-5 liter tergantung dari maksud pemeriksaan
- e. Mudah dan aman dibawa

2. Bahan

- a. Terbuat dari bahan gelas atau plastik
- b. Dapat ditutup dengan kuat dan rapat
- c. Mudah dicuci
- d. Tidak mudah pecah
- e. Wadah contoh untuk mikrobiologi harus dapat disterilkan
- f. Tidak menyerap zat-zat kimia dari contoh
- g. Tidak melarutkan zat-zat kimiade dalam contoh
- h. Tidak menimbulkan reaksi antara wadah dengan contoh

3. Sarana pengambilan contoh

- a. Sedapat mungkin menggunakan jembatan atau lintasan gantung sebagai tempat pengmabilan contoh
 - b. Bila sarana a) tersebut tidak ada, dapat menggunakan perahu
 - c. Untuk sumber air yang dangkal, dapat dilakukan dengan merawas
4. Volume contoh
 5. Pola kerja
 6. Waktu
 7. Pengawetan contoh

Teknik Pengambilan Contoh :

Teknik pengambilan contoh harus disesuaikan dengan tujuan :

1) Pengambilan contoh sesaat (*Grab sample*)

Adalah contoh yang menunjukkan sifat contoh pada saat contoh diambil

2) Pengambilan contoh gabungan waktu (*Composite time samples*)

Adalah campuran beberapa contoh yang diambil pada titik yang sama pada waktu yang berbeda.

3) Pengambilan contoh gabungan tempat (*Composite place samples*)

Adalah campuran beberapa contoh yang diambil dari beberapa titik tertentu dengan volume dan waktu yang sama.

4) Pengambilan contoh terpadu (*Integrated samples*)

Adalah campuran beberapa contoh gabungan waktu dan tempat

Pengukuran pH air sungai

Celupkan kertas pH indikator ke dalam air. Amati perubahan warna pada kertas pH indikator, sesuaikan perubahan warna tersebut dengan pH standard yang tercantum pada alat pH indikator.

Pengukuran suhu air sungai

Alat yang digunakan untuk mengukur temperatur air adalah termometer alkohol.

Cara pengukuran :

- Termometer ditenggelamkan dalam air dan didiamkan selama 5 menit. Temperatur ditera dengan cara mengamati batas maksimum gerakan alkohol dalam kolom alat tersebut.

UJI BIOKIMIA

Uji Indol

Prinsip : Bakteri yang menghasilkan enzim tryptophanase mampu untuk mendegradasi asam amino tryptophan ke dalam asam pyruvat, ammonia dan indol. Adanya indol dideteksi oleh kombinasi dengan sebuah indikator aldehyde (p-dimethyl amino benzaldehyde) yang menghasilkan suatu warna merah.

Reaksi Indol :

Tryptophan \longrightarrow Indol + Asam pyruvat + Ammonia

Indol + p-dimethyl amino benzaldehyde \longrightarrow cincin warna merah

Reagensia :

1. *Kovac's Reagent*, terdiri dari :

5 gram para dimethylaminobenzaldehyde

75 ml amyl alcohol atau iso amyl alcohol

25 ml asam chlorida p.a

2. Kultur bakteri yang akan diperiksa

3. Media air pepton, SIM (kaya tryptophan tetapi tidak mengandung hidrat arang)

Cara Kerja :

Dengan ose steril, ambillah sedikit biakan kuman pada KIA (Kliger Iron Agar) dan tanam pada media MIO semi solid. Eramkan pada suhu 37°C selama 24 jam. Tetesi reagensia Kovac's 3-5 tetes pelan-pelan melalui dinding tabung yang mengandung biakan kuman yang berumur 24 jam; sehingga terjadi garis pemisah antara media dan reagensia.

Pembacaan :

Indol positif : terjadi warna merah pada garis pemisah

Indol negatif : tidak terjadi warna merah pada garis pemisah

Uji Motility

Prosedur :

Ambil biakan kuman pada KIA dengan needle steril, kemudian tusukkan tegak lurus ke dalam medium MIO.

Apabila kuman enterik yang diperiksa tersebut dapat aktif bergerak (motil), maka setelah 24 jam pengeraman pada suhu 37°C akan terlihat adanya penyebaran pertumbuhan kuman ke sekitar tempat tusukan, yang berarti uji pergerakan kuman positif. Sebaliknya, apabila pertumbuhan kuman yang terjadi hanya terbatas pada tempat tusukan, maka uji motilitas adalah negatif.

Uji Activity ornithine decarboxylase

Prosedur :

Ambil biakan kuman pada KIA dengan needle steril, kemudian tusukkan tegak lurus ke dalam medium MIO.

Apabila kuman enterik yang diperiksa tersebut dapat menghasilkan enzim ornithine decarboxylase, maka setelah 24 jam pengeraman pada suhu 37°C akan terlihat adanya perubahan warna media dari purple menjadi kuning purple pudar. Reaksi negatif diindikasikan dengan warna kuning.

API 20 NE

Prinsip : API 20 NE terdiri dari 20 *microtubes* yang mengandung *dehydrated substrates*. Uji konvensional diinokulasikan pada larutan saline bacterial. Selama inkubasi, metabolisme menghasilkan perubahan warna yang spontan ataupun dengan penambahan reagen. Uji assimilation diinokulasikan dengan media minimal dan bakteri tumbuh jika bakteri memiliki kemampuan menggunakan substrat yang sesuai. Reaksi dibaca mengikuti tabel pembacaan dan identifikasi diamati dengan merujuk pada Analytical Profile Index atau menggunakan *Identification Software*.

Prosedur :

- Siapkan normal saline solution 0,9% sebanyak 2 ml dalam tabung
- Masukkan biakan kuman dari media KIA ke dalam normal saline solution, sesuaikan tingkat kekeruhan (0.5 McFarland).

- Stirer
- Siapkan API 20 NE kit. Tiap well diisi air untuk menjaga kelembaban.
- Tempatkan microtube diatas well yang berisi air.
- Teteskan larutan yang berisi biakan kuman pada masing-masing microtube, sesuaikan dengan tanda yang berada di bawah *microtube*.
- Microtubes no. 3, 4, dan 5, dilapisi dengan mineral oil, karena membutuhkan kondisi inkubasi secara anaerob.
- Inkubasi selama 24 jam hingga 48 jam pada suhu 37°C.

Uji Voges Proskauer

Prinsip : Bakteri mempunyai kemampuan membentuk asetil metil karbinol dalam media glukosa fosfat.

Reagensia :

VP-MR medium

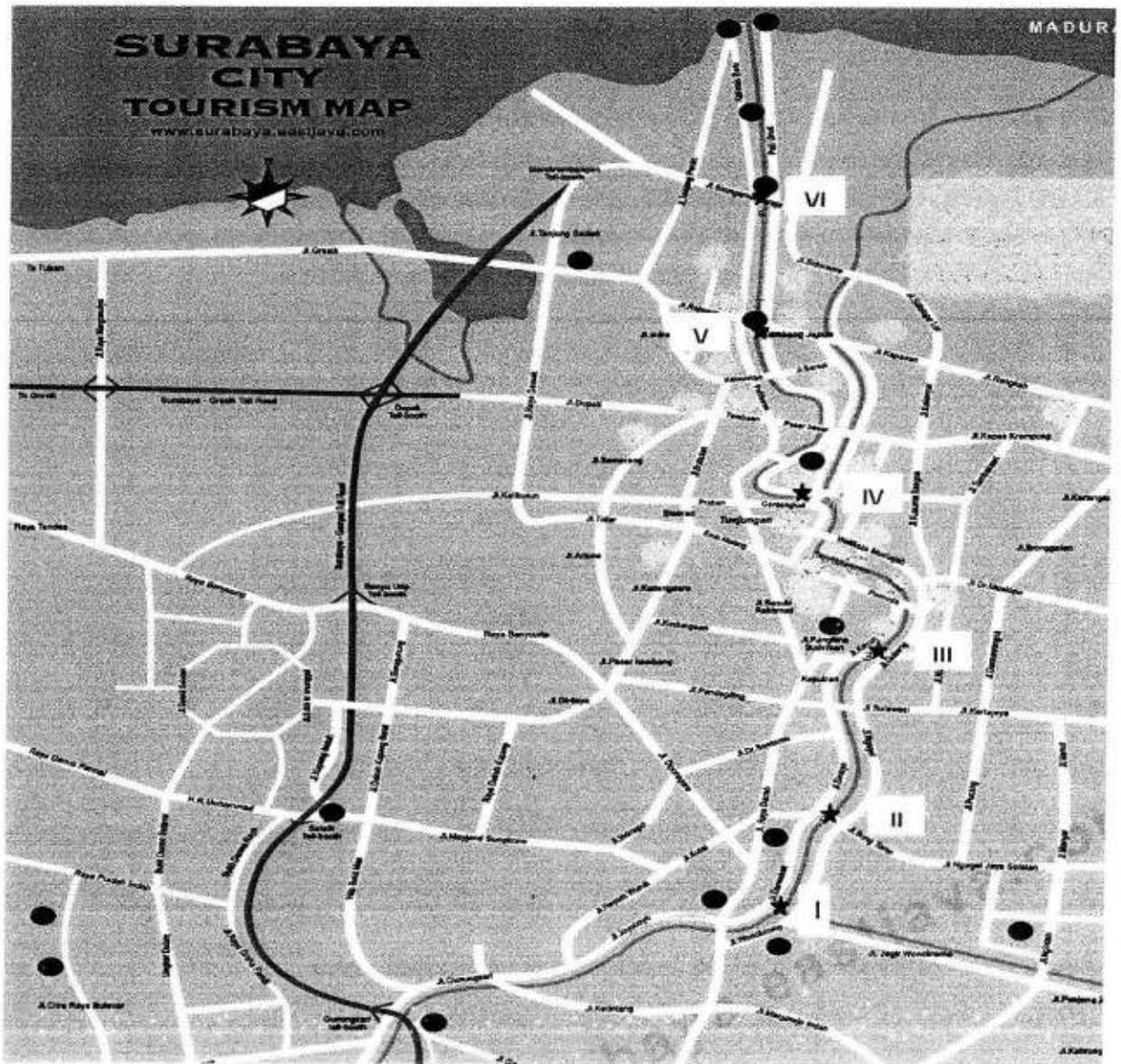
VP 1 : 40 gram Kalium hydroxyda; 100 ml aquadest

VP 2 : 6 gram alpha naphthol; 100 ml alkohol 96%

Kultur bakteri yang akan diperiksa

Prosedur :

Gunakan ose steril, ambil sedikit biakan kuman pada TSI kemudian tanam dalam 5 ml medium glukosa fosfat. Eramkan pada suhu 37°C, selama 3-5 hari. Kemudian biakan ditambahkan 0,6 ml larutan alfa naftol 6% dan 0,2 ml KOH 40%. Kocoklah tabung dan diamkan. Reaksi positif ditandai terbentuknya warna merah coklat dalam waktu 15 menit. VP test negatif ditunjukkan dengan adanya warna kuning.



Keterangan :

★ = lokasi sampling di aliran Sungai Kalimas

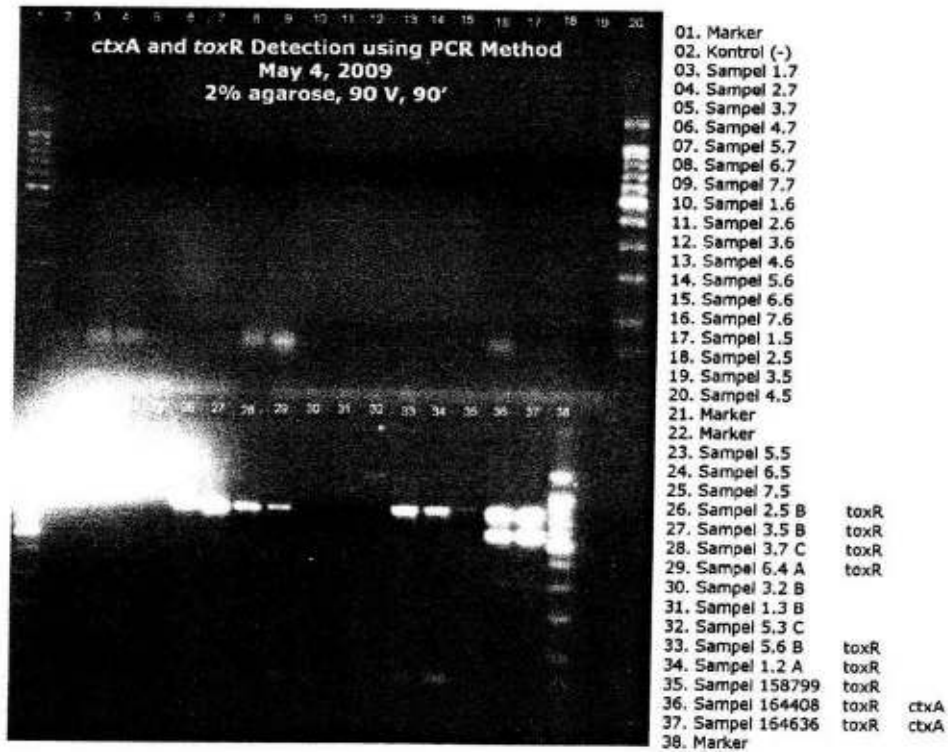
Pedoman Wawancara Mendalam (*In Depth Interview*)

Lokasi Pengamatan :
Tanggal Pengamatan :
Nama Informan :
Jenis Kelamin :
Umur :
Pekerjaan :
Alamat Tempat Tinggal :

1. Berapa lama tinggal/bekerja di lokasi tersebut?
2. Pernahkah melihat kegiatan yang memanfaatkan air sungai di lokasi tersebut?
Jika pernah, kegiatan apa saja?
 - a. Buang air besar
 - b. Mencuci
 - c. Mandi
 - d. Menyiram tanaman
 - e. Mencari ikan/cacing
 - f. dll (sebutkan!)
3. Kapan kegiatan tersebut dilakukan? (pagi/ siang/ sore/ malam)
(Buatkan perincian kegiatan tersebut berdasarkan waktunya)
4. Siapa saja yang memanfaatkan air sungai tersebut?
Jenis kelamin :
Usia :
5. Seberapa sering kegiatan tersebut dilakukan?
6. Alasan apa yang membuat mereka memanfaatkan air sungai tersebut?
7. Apa pendapat Saudara dengan melihat kondisi seperti diatas?
8. Apa saran yang dapat Saudara berikan agar masyarakat tetap memperhatikan peruntukan sungai tersebut.

Tabel : Hasil uji biokimia isolat perairan di 6 titik pengambilan sampel

No	Kode	Colony TCBS	KIA		VP	Cit	Ind	Mot	Oxid	Suhu 30°C	NaCl 0%	Hasil
			Dex	H ₂ S								
1	1.2.a	Kuning	a	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
2	1.1.c	Kuning	a	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Aeromonas salmonicida</i> ssp
3	1.3.a	Kuning	a	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
4	1.3.b	Kuning	a	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>Vibrio alginolyticus</i>
5	1.3.c	Kuning	a	-	+	-	+	+	+	+	+	<i>Vibrio cholerae</i> Non-O1
6	1.4.a	Kuning	a	-	+	-	-	+	+	+	+	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
7	2.4.b	Kuning	a	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
8	2.5.b	Kuning	a	-	+	-	-	+	+	+	+	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
9	2.5.c	Kuning	a	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
10	3.2.b	Kuning	a	-	+	-	-	+	+	+	+	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
11	3.4.b	Kuning	a	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
12	3.5.b	Kuning	a	-	+	-	-	+	+	+	+	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
13	3.7.c	Kuning	a	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
14	4.2.b	Kuning	a	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>Vibrio alginolyticus</i>
15	4.2.c	Kuning	a	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
16	4.3.a	Kuning	a	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
17	4.3.b	Kuning	a	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
18	4.3.c	Kuning	a	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
19	4.4.a	Kuning	a	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
20	4.5.a	Kuning	a	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Aeromonas salmonicida</i> ssp
21	4.5.c	Kuning	a	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
22	4.6.b	Kuning	a	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
23	4.6.c	Kuning	a	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
24	5.3.b	Kuning	a	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Aeromonas salmonicida</i> ssp
25	5.3.c	Kuning	a	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
26	5.5.a	Kuning	a	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
27	5.5.c	Kuning	a	-	+	-	-	+	+	+	+	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
28	5.6.b	Kuning	a	-	+	-	-	+	+	+	+	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
29	5.6.c	Kuning	a	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>Vibrio alginolyticus</i>
30	6.2.a	Kuning	a	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
31	6.3.c	Kuning	a	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
32	6.3.a	Kuning	a	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
33	6.4.a	Kuning	a	-	+	-	-	+	+	+	+	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1
34	6.4.b	Kuning	a	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
35	6.5.a	Kuning	a	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>Vibrio alginolyticus</i>
36	6.6b	Kuning	a	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Aeromonas salmonicida</i> ssp

Hasil amplifikasi gen *ctxA* dan *toxR* dengan metode PCR

Oneway

Descriptives

suhu

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	28,1667	,40825	,16667	27,7382	28,5951	28,00	29,00
2	6	27,9167	,58452	,23863	27,3032	28,5301	27,50	29,00
3	6	28,0000	,70711	,28868	27,2579	28,7421	27,00	29,00
4	6	28,0833	,58452	,23863	27,4699	28,6968	27,00	28,50
5	6	28,1667	,68313	,27889	27,4498	28,8836	27,00	29,00
6	6	28,0833	,20412	,08333	27,8691	28,2975	28,00	28,50
Total	36	28,0694	,52308	,08718	27,8925	28,2464	27,00	29,00

Test of Homogeneity of Variances

suhu

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,991	5	30	,440

ANOVA

suhu

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,285	5	,057	,184	,967
Within Groups	9,292	30	,310		
Total	9,576	35			

Oneway

Descriptives

Asiditas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	6,8833	,07528	,03073	6,8043	6,9623	6,80	7,00
2	6	6,8500	,12247	,05000	6,7215	6,9785	6,70	7,00
3	6	6,8333	,05164	,02108	6,7791	6,8875	6,80	6,90
4	6	6,9333	,05164	,02108	6,8791	6,9875	6,90	7,00
5	6	6,8667	,10328	,04216	6,7583	6,9751	6,70	7,00
6	6	6,9500	,05477	,02236	6,8925	7,0075	6,90	7,00
Total	36	6,8861	,08669	,01445	6,8568	6,9154	6,70	7,00

Test of Homogeneity of Variances

Asiditas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,004	5	30	,107

ANOVA

Asiditas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,065	5	,013	1,958	,114
Within Groups	,198	30	,007		
Total	,263	35			

Oneway

Descriptives

salinitas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	,004017	,0002927	,0001195	,003710	,004324	,0035	,0043
2	6	,004117	,0005565	,0002272	,003533	,004701	,0033	,0050
3	6	,003950	,0003782	,0001544	,003553	,004347	,0034	,0044
4	6	,004667	,0008524	,0003480	,003772	,005561	,0035	,0058
5	6	,004567	,0004926	,0002011	,004050	,005084	,0038	,0052
6	6	,004083	,0005193	,0002120	,003538	,004628	,0034	,0050
Total	36	,004233	,0005772	,0000962	,004038	,004429	,0033	,0058

Test of Homogeneity of Variances

salinitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,064	5	30	,400

ANOVA

salinitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,000	5	,000	1,872	,129
Within Groups	,000	30	,000		
Total	,000	35			



DEPARTEMEN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
BALAI BESAR LABORATORIUM KESEHATAN SURABAYA
 Jalan Karangmenjangan No. 18 Surabaya 60286
 Telp. Tata Usaha : 031-5021451, Kabag. TU / Fax. : 031-5021452 pes. 104, 031-5020388
 e-mail : blksub@idola.net.id



DATA SALINITAS

Tgl	Waktu (WIB)	Kode Sampel	Lokasi	Hasil	
				mg/lt	%
13/02/09	07.59	EV.1.1	Jl. Darmokali (Pintu Air Kalimas)	42,40	0,0042
	08.26	EV.2.1	Jl. Ngagel (jembatan BAT)	50,53	0,0050
	08.52	EV.3.1	Jl. Kayun (Jembatan Kayun)	14,62	0,0014
	09.21	EV.4.1	Jl. Genteng Kali (Depan Perhutani Unit II)	40,66	0,0040
	09.53	EV.5.1	Jl. Kembang Jepun (Jembatan Merah)	52,27	0,0052
	10.24	EV.6.1	Jl. Petekan (Jembatan Petekan)	16,84	0,0016
	07.16	EV.7.1	Jl. Arif Rahman Hakim Keputih	731,85	0,0731
19/02/09	07.54	EV.1.2	Jl. Darmokali (Pintu Air Kalimas)	39,85	0,0039
	08.20	EV.2.2	Jl. Ngagel (jembatan BAT)	42,24	0,0042
	08.38	EV.3.2	Jl. Kayun (Jembatan Kayun)	44,02	0,0044
	08.58	EV.4.2	Jl. Genteng Kali (Depan Perhutani Unit II)	54,73	0,0054
	09.26	EV.5.2	Jl. Kembang Jepun (Jembatan Merah)	45,21	0,0045
	10.10	EV.6.2	Jl. Petekan (Jembatan Petekan)	1,32	0,0001
	07.16	EV.7.2	Jl. Arif Rahman Hakim Keputih	671,01	0,0671
25/02/09	08.05	EV.1.3	Jl. Darmokali (Pintu Air Kalimas)	42,98	0,0042
	08.20	EV.2.3	Jl. Ngagel (jembatan BAT)	33,11	0,0033
	08.38	EV.3.3	Jl. Kayun (Jembatan Kayun)	34,85	0,0034
	09.09	EV.4.3	Jl. Genteng Kali (Depan Perhutani Unit II)	35,43	0,0035
	09.31	EV.5.3	Jl. Kembang Jepun (Jembatan Merah)	45,43	0,0045
	10.05	EV.6.3	Jl. Petekan (Jembatan Petekan)	41,24	0,0041
	07.40	EV.7.3	Jl. Arif Rahman Hakim Keputih	570,37	0,0570
03/03/09	08.10	EV.1.4	Jl. Darmokali (Pintu Air Kalimas)	43,03	0,0043
	08.45	EV.2.4	Jl. Ngagel (jembatan BAT)	43,03	0,0043
	09.15	EV.3.4	Jl. Kayun (Jembatan Kayun)	42,46	0,0042
	09.34	EV.4.4	Jl. Genteng Kali (Depan Perhutani Unit II)	47,56	0,0047
	09.59	EV.5.4	Jl. Kembang Jepun (Jembatan Merah)	44,73	0,0044
	10.24	EV.6.4	Jl. Petekan (Jembatan Petekan)	41,33	0,0041
	07.35	EV.7.4	Jl. Arif Rahman Hakim Keputih	298,96	0,0298
09/03/09	07.54	EV.1.5	Jl. Darmokali (Pintu Air Kalimas)	35,67	0,0035
	08.21	EV.2.5	Jl. Ngagel (jembatan BAT)	9,62	0,0009
	08.41	EV.3.5	Jl. Kayun (Jembatan Kayun)	36,24	0,0036
	09.18	EV.4.5	Jl. Genteng Kali (Depan Perhutani Unit II)	46,43	0,0046
	09.46	EV.5.5	Jl. Kembang Jepun (Jembatan Merah)	38,50	0,0038
	10.29	EV.6.5	Jl. Petekan (Jembatan Petekan)	40,77	0,0040
	07.16	EV.7.5	Jl. Arif Rahman Hakim Keputih	403,71	0,0403
15/03/09	07.27	EV.1.6	Jl. Darmokali (Pintu Air Kalimas)	40,66	0,0040
	07.55	EV.2.6	Jl. Ngagel (jembatan BAT)	40,66	0,0040
	08.37	EV.3.6	Jl. Kayun (Jembatan Kayun)	40,66	0,0040
	08.59	EV.4.6	Jl. Genteng Kali (Depan Perhutani Unit II)	58,08	0,0058
	09.38	EV.5.6	Jl. Kembang Jepun (Jembatan Merah)	50,53	0,0050
	09.56	EV.6.6	Jl. Petekan (Jembatan Petekan)	52,27	0,0052
	07.03	EV.7.6	Jl. Arif Rahman Hakim Keputih	532,62	0,0532

Surabaya, 27 Maret 2009

Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya
 Manajer Teknik

Dra. Damiana Aryesam
 NIP. 140240761