

WAKTU REGENERASI BAKTERI *Vibrio cholerae* PADA MEDIUM APW

Kambang Sariadji, Melati Wati, Syamsidar, Novi A, Sundari, Khariri, Sunarno

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560 Indonesia

THE REGENERATION TIME OF Vibrio cholerae IN APW MEDIA

Abstract

Water and food could be contaminated by Vibrio cholerae which caused diarrhea to someone consumed them; serious cholerae disease could lead to death. In extreme environments cholerae could be in viable but nonculturable. Epidemiologically, this condition has contributed cholera outbreaks events. On the contrary, the bacteria can grow quickly in favorable conditions,. However, information about the cholerae growth rate are still limited. The aims of research was To determine the regeneration time of cholerae from time to time in optimum condition, as a base of assessment during cholerae outbreaks. The number of cholerae cells in 101 cfu / mL were made by dilution, then determined the number of bacteria in the beginning by using the colony count method with Thio sulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) media. the growth rate of bacteria was determined by inoculated 2 mL dilution 101 cfu / mL to the enrichment alkaline peptone water (APW) media and then incubated at 37°C. Every one hour up to the end of eight hours, the bacteria were measured by colony count method using TCBS media. The obtaining of results were calculated by specified regeneration time. The results showed that v. Cholerae generate between 8-15 minute from time to time in 8 hours

Keywords : Vibrio cholerae, Colony count, regeneration time

Abstrak

Vibrio cholerae dapat menjadi pencemar pada air dan makanan yang dapat menyebabkan diare pada seseorang yang mengkonsumsinya. Penderita penyakit kolera pada kasus yang berat dapat menyebabkan kematian. *Vibrio cholerae* pada lingkungan yang ekstrim dapat menjadi *viable but nonculturable*, sehingga secara epidemiologi lingkungan ini mempunyai andil dalam menyebabkan wabah kolera. Sementara pada kondisi yang menguntungkan, bakteri ini dapat tumbuh dengan cepat. Namun informasi tentang kecepatan pertumbuhan dari *cholerae* sebagai antisipasi tindakan pencegahan wabah masih sangat terbatas. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui waktu regenerasi *cholerae* dari waktu ke waktu dalam kondisi yang optimum, sehingga dapat menjadi dasar penilaian ketika terjadi wabah kolera. Peningkatan jumlah bakteri ini dilakukan dengan cara membuat jumlah sel *cholerae* terlebih dahulu menjadi 101 cfu/mL melalui pengenceran, kemudian ditentukan jumlah bakteri awal yang sesungguhnya dengan metode hitung koloni menggunakan medium *Thio sulphate Citrate Bile Sucrose* (TCBS). Untuk mengetahui kecepatan pertumbuhan bakteri maka jumlah sel 101 cfu/mL diambil sebanyak 2 ml dan ditumbuhkan pada medium pengayaan yakni medium *alkali peptone water* (APW), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Setiap satu jam sampai jam ke delapan dilakukan pengukuran jumlah bakteri dengan metode hitung koloni menggunakan medium TCBS, kemudian ditentukan waktu generasi *V.cholerae* . Hasil penelitian menunjukkan waktu regenerasi *Vibrio cholerae* dari jam ke jam selama 8 jam adalah antara 8-18 menit.

Kata kunci : *Vibrio cholerae* , Hitung koloni, waktu regenerasi

PENDAHULUAN

Vibrio cholerae adalah bakteri gram negatif penghasil enterotoksin yang dapat menimbulkan infeksi saluran cerna dengan gejala muntah, buang air besar seperti air cucian beras dalam jumlah banyak (1 liter/jam) sehingga mengakibatkan dehidrasi, kehilangan elektrolit dan naiknya keasaman darah. Pada kasus yang berat, penderita kehilangan cairan serta elektrolit dengan cepat dan banyak sehingga terjadi renjatan keasaman metabolik dan bila tidak diobati akan menyebabkan kematian.¹

Vibrio cholerae dapat menjadi pencemar pada air dan makanan yang menyebabkan diare pada seseorang yang mengkonsumsinya. Pada suatu komunitas masyarakat dengan tingkat sanitasi dan higiene yang buruk bakteri ini dapat menyebabkan wabah kolera. Timbulnya wabah kolera ini tidak hanya dipengaruhi sanitasi dan higiene yang buruk, akan tetapi faktor kemampuan bakteri yang dapat bertahan hidup dalam jangka waktu lama dalam bentuk *viable but nonculturable*. Penyebabnya adalah lingkungan ekstrim yang kurang mendukung pertumbuhan bakteri, sehingga bakteri menyesuaikan diri dengan cara mengurangi metabolisme dan bentuk ukuran bakteri yang lebih kecil dari ukuran semula. Pada lingkungan bakteri ini disebut *viable but nonculturable*, Sehingga secara epidemiologi lingkungan ini mempunyai andil dalam menyebabkan wabah kolera.^{2,3}

Sebaliknya pada kondisi lingkungan yang menguntungkan dengan pH alkali (8,5 - 9,5), suhu 37°C dan nutrisi yang mengandung garam mineral dan asparagin sebagai sumber karbon dan nitrogen, *V.cholerae* dapat tumbuh dan berkembang dengan cepat. Kecepatan pertumbuhan bakteri *V.cholerae* pada lingkungan yang menguntungkan akan meningkatkan daya infeksi terhadap seseorang. Kemampuan bakteri untuk memperbanyak diri melalui pembelahan diri berbeda - beda antara bakteri satu dengan bakteri lainnya. Waktu yang diperlukan untuk membelah diri dari satu sel menjadi dua sel sempurna disebut waktu generasi.^{2,4}

Secara invitro beberapa bakteri mempunyai waktu generasi yang beragam pada kondisi optimal dengan suhu, pH dan nutrisi yang sesuai diantaranya *V. parahaemolyticus* 8 - 9

menit 5, *E.coli* 20 menit pada pH 40°C, *Bacillus subtilis* 28 menit pada pH 40°C, *Staphylococcus aureus* 30 menit pada pH 37°C dan *Pseudomonas aeruginosa* 35 menit pada pH 37°C, bahkan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* mempunyai waktu generasi 13 jam 20 menit pada pH 37°C. Secara invivo waktu generasi masing - masing bakteri ini dapat lebih lama lagi.⁶ Cepat lambatnya waktu generasi pada bakteri patogen berhubungan erat dengan proses infeksi pada host. Makin cepat waktu generasi bakteri patogen, menyebabkan penyakit yang ditimbulkan semakin cepat pula bila menginfeksi host.

Saat ini informasi tentang waktu generasi *V.cholerae* secara invitro dan invivo belum banyak diketahui baik pada lingkungan maupun pada medium yang kondisinya sesuai dengan pertumbuhan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui waktu generasi *V.cholerae* setiap jamnya pada kondisi pertumbuhan yang sesuai atau optimum (invitro) dengan menggunakan medium alkali peptone water pada suhu 37°C. Adanya gambaran tentang waktu generasi ini akan menjadi dasar penilaian ketika terjadi wabah kolera, karena secara invivo kecepatan pertumbuhan *V.cholerae* sukar diprediksi, terutama pada lingkungan dengan kondisi pertumbuhan yang ekstrim. Informasi tentang waktu generasi *V.cholerae* berhubungan dengan kecepatan pertumbuhan bakteri menjadikan antisipasi tindakan preventif pada keadaan kasus luar biasa agar tidak menyebar ke daerah sekitar terjadinya wabah

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan, pada bulan Januari-April 2011. Bakteri yang digunakan adalah salah satu isolat *V.cholerae* O1 yang berasal dari *stock* hasil investigasi kejadian luar biasa di Bogor tahun 2009. Medium yang digunakan untuk meningkatkan pertumbuhan bakteri *V.cholerae* adalah medium air peptone alkali.^{5,6} Komposisi medium tersebut adalah Peptone 10 gr dan NaCl 5 gr dilarutkan dalam 1 liter aquadest (pH 9,1) kemudian dimasukkan ke dalam tabung bertutup masing-masing 18 mL dan

disterilisasi dengan *autoclave*.

Pemantauan pengujian waktu generasi ini dilakukan tiap jamnya pada masing - masing cawan petri dari jam pertama sampai jam ke delapan karena inokulasi dan perbanyakkan *V.cholerae* menggunakan medium APW antara 6 - 8 jam pada suhu 37°C. Sampel uji bakteri didapatkan dengan cara membuat konsentrasi jumlah sel bakteri 10¹ cfu/mL. Sel bakteri *V.cholerae* O1 dari *stock isolat* dihidupkan kembali dengan cara kultur, isolasi dan identifikasi pada medium selektif, kemudian dibuat suspensi bakteri *V.cholerae* dengan tingkat kekeruhan 0,5 MacFarland yang setara dengan 10⁷ cfu/mL. Selanjutnya dibuat pengenceran menggunakan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sampai dengan pengenceran 10¹ cfu/mL.⁷ Konsentrasi pengenceran 10¹ cfu/mL inilah yang dijadikan sampel uji untuk mengetahui waktu generasi *V.cholerae* O1. Sampel uji ditentukan jumlah bakteri awal yang sesungguhnya menggunakan metode hitung koloni dengan medium Thio sulphate *Citrate Bile Sucrose* (TCBS). Untuk mengetahui kecepatan pertumbuhan bakteri pada medium yang optimum maka pengenceran 10¹ cfu/mL diambil 2 ml dan diinokulasikan ke dalam tabung medium pengayaan yakni medium air pepton alkali (APW). Medium APW ini diinkubasi pada suhu 37°C dari jam pertama sampai jam ke delapan, tiap jamnya dari jam pertama sampai jam ke delapan dilakukan pengukuran jumlah bakteri metode hitung koloni menggunakan medium TCBS dan diinkubasi selama 18 - 24 jam pada suhu 37°C, kemudian dilakukan pengamatan koloni yang tumbuh pada tiap cawan petri medium TCBS. ditentukan dan dihitung jumlah koloni yang tumbuh. Hasil perhitungan jumlah bakteri tiap jamnya dari jam pertama sampai jam ke delapan kemudian ditentukan waktu generasi.

Data yang diperoleh untuk mengetahui waktu generasi bakteri *V.cholerae* O1 menggunakan rumus: 4

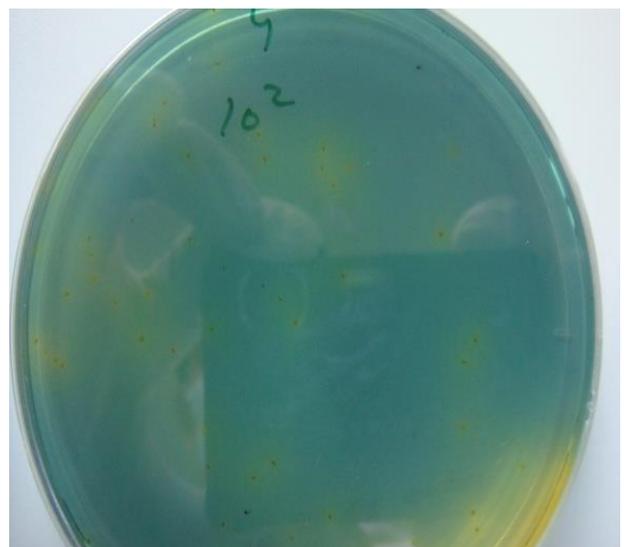
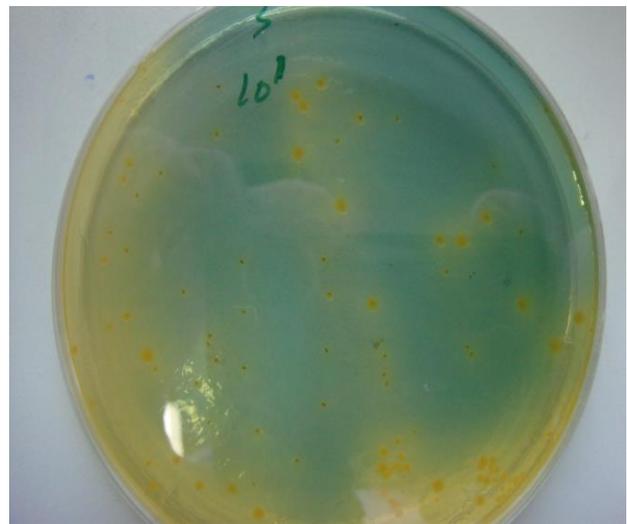
Jumlah Generasi =

$$\frac{(\log_{10} \text{Jumlah sel akhir}) - (\log_{10} \text{Jumlah sel awal})}{0.301}$$

$$\text{Waktu Generasi} = \frac{60 \text{ Menit} \times \text{Jam}}{\text{Jumlah Generasi}}$$

HASIL

Pada Gambar 1, menunjukkan bentuk dan koloni yang berwarna kuning pada medium TCBS. Hitung koloni dilakukan sesuai dengan aturan tumbuh koloni pada cawan petri dengan jumlah 30 - 300 koloni. Pada penentuan awal jumlah sel yang sebenarnya dari *V.cholerae* O1 didapatkan jumlah hitung koloni 15 cfu/mL. Hasil ini menunjukkan jumlah awal bakteri yang akan ditumbuhkan pada medium APW terdapat kesesuaian jumlah dengan pengenceran 10¹.



Gambar 1. Gambaran bentuk koloni bakteri yang berwarna kuning ketika hitung koloni *V.cholerae* O1 pada kedua medium TCBS

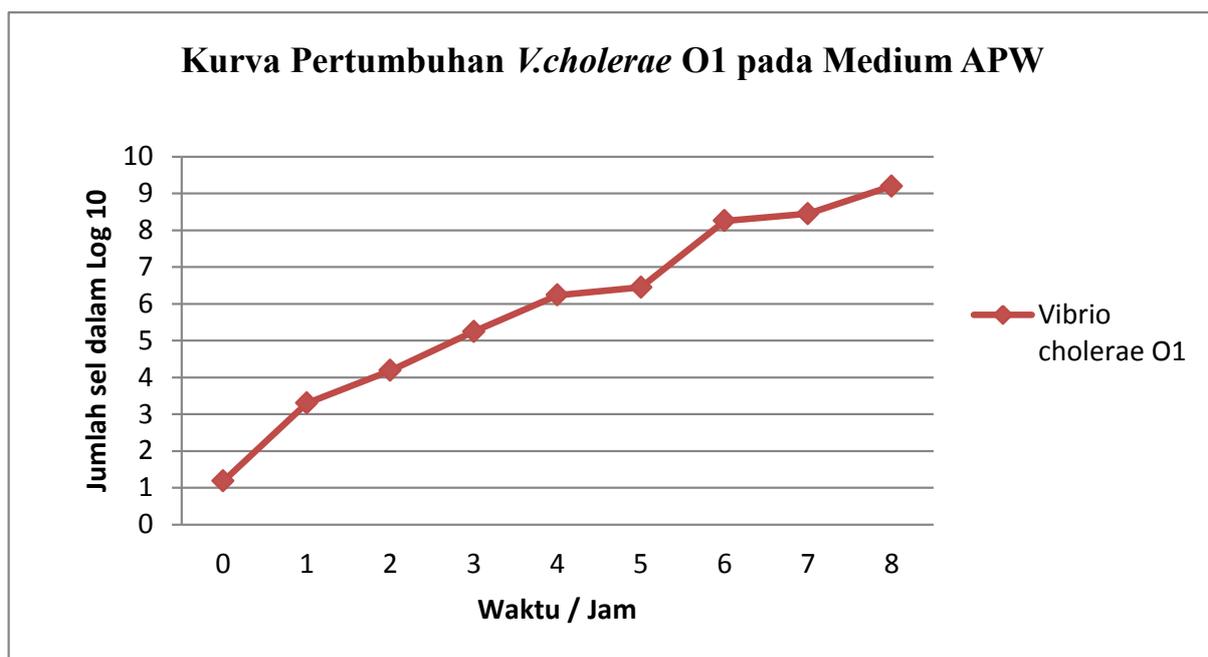
Pada Tabel 1 menunjukkan hasil pertambahan jumlah *V.cholerae* O1 pada medium APW pada tiap jamnya. Pada pemeriksaan penentuan awal dengan metode hitung koloni diketahui jumlah *V.cholerae* O1 adalah 15 cfu/mL yang setara

dengan pengenceran 10¹. Setelah diinokulasikan ke medium APW jumlah bakteri semakin meningkat. Dengan menggunakan rumus perhitungan di atas maka dapat ditentukan jumlah dan waktu generasi bakteri *V.cholerae* O1.

Tabel 1. Waktu generasi *V.cholerae* O1 pada medium APW dengan jumlah awal bakteri yang ditumbuhkan sebanyak 10¹ sel ~ 15 cfu/mL (log₁₀ Jumlah sel awal = 1.18)

Waktu (dalam jam)	jumlah koloni	log ₁₀ Jumlah sel akhir	Waktu generasi (menit)
1	2.006	3,30	8
2	15.421	4,19	12
3	175.510	5,24	13
4	1.728.200	6,24	14
5	2.823.667	6,45	17
6	181.220.000	8,26	15
7	282.400.000	8,45	17
8	1.587.850.000	9,20	18

Gambar 2. Kurva pertumbuhan bakteri *V.cholerae* O1 pada medium APW



PEMBAHASAN

Pada penentuan awal jumlah bakteri *Vibrio cholerae* O1 dengan pengenceran 10¹ dan setara dengan hasil konfirmasi yang dilakukan dengan hitung koloni yakni 15 cfu/mL atau 15 sel bakteri. Sel bakteri ini mempunyai kemampuan untuk memperbanyak diri pada kondisi lingkungan

yang optimum dengan nutrisi dan suhu yang sesuai. Jumlah bakteri yang sedikit ini jika menginfeksi manusia secara langsung secara oral belum menimbulkan daya infeksi kuat atau tidak akan menimbulkan gejala klinis yang berarti. Namun apabila jumlah bakteri yang sedikit ini mengkontaminasi makanan atau minuman, maka dalam waktu beberapa jam *V.cholerae* ini

akan berkembang dan meningkat jumlahnya terlebih lagi jika makanan atau minuman tersebut mempunyai kandungan nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan *V.cholerae* O1. Makanan dan minuman yang terkontaminasi ini akan menjadi sumber penularan infeksi.

Pada kondisi normal, *V.cholerae* hanya pathogen terhadap manusia. Untuk dapat menginfeksi manusia dan menimbulkan gejala klinis memerlukan jumlah sebanyak 10¹⁰ atau lebih sel bakteri *V.cholerae* secara oral. Jika mediatornya makanan maka sebanyak 10² - 10⁴ organisme yang diperlukan untuk dapat menimbulkan gejala klinis, karena kapasitas buffer yang cukup dari makanan dapat menetralkan asam lambung.¹

Pada Gambar 1 terlihat pertumbuhan *V.cholerae* dari waktu ke waktu. Pada fase permulaan, bakteri baru menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru, sehingga sel belum membelah diri. Sel bakteri mulai membelah diri pada fase pertumbuhan yang dipercepat. Fase pertumbuhan ini memungkinkan bakteri *V.cholerae* mempunyai waktu generasi yang cepat karena ketersediaan nutrisi yang melimpah. Selama fase pertumbuhan yang cepat ini, metabolisme sel paling aktif, sintesis bahan sel sangat cepat dengan jumlah konstan sampai nutrisi habis atau terjadinya penimbunan hasil metabolisme yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan. Jika pertumbuhan ini terjadi secara *in vivo* maka kecepatan pertumbuhannya akan lebih lambat dibandingkan dengan *in vitro*.⁴

Penurunan waktu generasi dari waktu ke waktu ini juga berlangsung dikarenakan adanya pertumbuhan yang cepat yang menyebabkan kompetisi setiap sel untuk mendapatkan nutrisi yang tersedia. Nutrisi ini makin lama akan habis sampai dengan fase konstan. Dari tabel 1 terlihat bahwa ketersediaan nutrisi yang melimpah berdampak pada pertumbuhan bakteri yang cepat dengan waktu generasi tercepat adalah 8 menit, sementara semakin banyak jumlah sel yang berkembang menyebabkan waktu generasi menjadi melambat yakni 18 menit. Hal ini karena keterbatasan nutrisi dan kompetisi dari masing-masing sel bakteri. Pada tabel 1 terlihat waktu generasi *V.cholerae* O1 suhu 37°C antara 8-18 menit tergantung dari kecukupan nutrisi, suhu dan pH optimum. Berbeda dengan waktu generasi

V. parahaemolyticus pada suhu yang sama yakni 21-30 menit.⁸ Jumlah sel bakteri *Vibrio cholerae* O1 yang berkembang dari 15 sel bakteri menjadi 2006 sel bakteri pada jam pertama sudah cukup untuk menyebabkan infeksi dan gejala klinis pada manusia jika masuknya melalui mediator makanan. Pada keadaan wabah, hal ini menjadi perhatian akan penanggulangan secara dini untuk mencegah penyebaran dan penularan kolera yang sangat cepat, mengingat pola penularannya adalah melalui makanan dan air yang terkontaminasi. Ketika *V.cholerae* dalam jumlah kecil dan tersedia media nutrisi untuk tumbuh berupa makanan atau air dengan cara mengkontaminasinya, maka bakteri tersebut akan meningkat dalam beberapa jam dan dapat menimbulkan bencana wabah, terlebih pada daerah dengan tingkat sanitasi dan hygiene yang buruk

KESIMPULAN

Pada kondisi nutrisi dan suhu yang sesuai bakteri *V.cholera* mempunyai kemampuan untuk memperbanyak diri dengan waktu generasi antara 8-18 menit. Kecepatan pertumbuhan ini pada daerah dengan tingkat sanitasi dan hygiene yang buruk akan membawa bencana wabah kolera. Kecepatan pertumbuhan ini harus menjadi kewaspadaan dini untuk dilakukannya pencegahan dan penyebaran bila terjadi kejadian kolera.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Maria Dorkas yang telah menyiapkan media kultur. Saya juga mengucapkan terima kasih kepada kawan-kawan Peneliti Laboratorium Bakteriologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang telah membantu selama proses pemeriksaan di laboratorium

DAFTAR RUJUKAN

1. Soemarsono H. Kolera: dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Balai Penerbit FKUI. Jakarta. 1996.
2. Lesmana Murad. *Vibrio cholerae* O1, Viable but nonculturable. J Kedokteran Trisakti. Vol 21 No 3, desember 2002

3. Oliver James. The Viable but Nonculturable State in Bacteria The Journal of Microbiology, Vol 43 February 2005.
4. Kayser F.H. Medical Microbiology, 2005
5. Zulkifli, Alithen, Son R, Yeap *et.al.* Identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by PCR targeted to the *toxR* gene and detection of virulence genes . International Food Research Journal 16, 289-296, 2009.
6. Animous. The Scope of Microbiology
7. Lesmana M. *Vibrio & Campylobacter*. Universitas Trisakti. Jakarta. 2003
8. Pronadisa, Microbiology Culture Media Manual, wwwcondalab.com.
9. Rohani MY, Hasnidah D, Ong KH. Evaluation of the Cholera Spot Test: a chromatographic immunoassay for the rapid detection of Cholera antigen Malaysian J Path; 20(1): 31-33, 1998
10. J Matthew, Zielinski, Larsen R A. Growth dynamics of *Vibrio parahaemolyticus*, Department of Biological Sciences, Bowling Green State University, Bowling Green, OH, 43403