

Isolation and Identification of Gram Negative Bacteria in The Lumen Fluid of Colorectal Cancer Patients

Rita Maliza^{1*} & Hevi Horiza²

¹Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Andalas University, Padang, West Sumatra, Indonesia;

²Sanitation Health Polytechnic, Tanjungpinang, Indonesia;

Article History

Received : September 06th, 2023

Revised : September 01th, 2023

Accepted : Oktober 14th, 2023

*Corresponding Author:

Rita Maliza, Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Andalas University, Padang, West Sumatra, Indonesia.

Email:

malizarita@sci.unand.ac.id

Abstract: Colorectal cancer is one of the major health problems in Indonesia and the third most common cause of death worldwide. Colorectal cancer is a cancer of the colon and the rectum. There is considerable research evidence demonstrating the important role of complex gut microbiota communities in developing intestinal tumorigenesis. This study aims to isolate and identify gram-negative bacteria found in the colonic lumen fluid of colorectal cancer patients using the gram-staining method and biochemical test. From microscopic identification results, macroscopic gram staining, motility test, Simon citrates agar (SCA), and triple sugar iron agar (TSIA) tests against H1 and H2 isolates described gram-negative stem bacteria included in the Enterobacteriaceae family belonging to the species *Shigella* sp.

Keywords: Colorectal cancer, intestinal microbiota, gram negative bacteria.

Pendahuluan

Saluran pencernaan manusia merupakan rumah bagi beragam bakteri, termasuk mikrobiota usus. Usus manusia mengandung sekitar 100 triliun sel mikrobiota dari 1.000 spesies yang berbeda-beda (Dietert, 2015). Bakteri pada mikrobiota manusia memiliki peran pada imunitas, nutrisi, dan perkembangan manusia. Setiap manusia memiliki mikrobioma atau mikrobiota (kumpulan bakteri) berbeda-beda yang disebabkan oleh akibat dari efek diet, gaya hidup, dan sumber bakteri di masa kecil (Prakash *et al.*, 2011). Faktor yang memengaruhi keseimbangan mikrobiota salah satunya adalah kesalahan dalam memilih asupan makanan. Berbagai penyakit dapat timbul akibat perubahan populasi mikrobiota, dan risiko penyakit di masa yang akan datang (Kurniati 2016). Kanker kolorektal (CRC) menduduki peringkat ketiga jenis kanker di dunia yang menyebabkan kematian (American Cancer Society, 2014; Ferlay *et al.*, 2015). Menurut data Departemen Kesehatan 28,17% dari seluruh kanker di Indonesia adalah kanker kolorektal.

Kanker kolorektal ditujukan pada tumor ganas yang ditemukan di kolon dan rektum (Siegel, Miller dan Jemal, 2016). Pertumbuhan sel yang tidak ganas yaitu adenoma merupakan awal dari penyakit kanker kolorektal yang mana membentuk polip, pada kondisi tertentu memiliki berpotensi menjadi kanker (Boyle dan Langman, 2000). Insiden Kanker Kolorektal mulai meningkat secara bermakna setelah usia 50 tahun (Khosama, 2015; Astuti, Rafli dan Zeffira, 2019; Hamdi *et al.*, 2015; Astuti *et al.*, 2019). Hal ini disebabkan karena pola makan yang tidak sehat, tinggi lemak dan kurang serat, serta mengalami radang usus besar (Sabiston, 1995). Diet diperkirakan memiliki efek 30-50% terhadap angka kejadian kanker kolorektal. Pola diet yang dimaksud disini adalah tingkat konsumsi serat atau bahan makanan yang berserat. Banyaknya konsumsi serat terbukti dapat mencegah resiko kanker kolorektal (Masrul, 2018). Hal ini bisa mengurangi efek karsinogenik dari bakteri-bakteri yang ada di flora kolon, makanan atau senyawa mutagenik merupakan faktor yang dikaitkan dengan meningkatnya risiko kanker kolorektal.

Karsinogen berkorelasi dengan aktivitas bakteri usus, beberapa jenis bakteri usus seperti *E. coli*, *Bacteroides*, dan bakteri anaerob dalam jumlah yang banyak menghasilkan enzim β -glukuronidase yang dapat menghidrolisis β -glukuronida, azoreduktase dan nitroreduktase mereduksi gugus suatu senyawa mutagen menjadi senyawa karsinogen. Pemecahan ikatan β -glukuronida menghasilkan aglicon yang sangat karsinogenik (Siegel *et al.*, 2016). Tujuan dari studi ini mengetahui mikrobiota yang terdapat pada cairan lumen kolon dan rektum pasien kanker kolorektal RS. DR. M. Djamil Padang Sumatera Barat.

Bahan dan Metode

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang. Sampel pada penelitian ini adalah cairan lumen kolon dan rektum pasien penderita kanker kolorektal di RSUP. DR. M. Djamil Padang Sumatera Barat. Dilakukan pengayaan dengan menggunakan 9 ml larutan Pepton untuk isolasi bakteri gram negative yang terdapat dalam cairan lumen dan dilanjutkan dengan penanaman. Sebelum diinokulasi ke media agar MacConkey larutan stok di encerkan bertingkat sampai pengenceran 10^{-7} , diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan kemudian dilakukan identifikasi dengan pewarnaan gram.

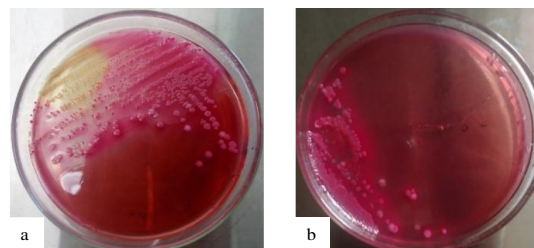
Identifikasi makroskopik dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, tepian dan elevasi koloni yang tumbuh pada medium agar. Identifikasi mikroskopik melalui pewarnaan gram. Pengujian Biokimia Bakteri antara lain menggunakan uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar), Uji Simon Sitrat, dan Uji Semi Solid (Motilitas). Uji TSIA.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi dan identifikasi bakteri cairan lumen usus besar

Isolasi bakteri diidentifikasi dari cairan lumen usus besar pasien kanker kolorektal. Isolasi bakteri dimulai dengan proses pengkayaan (enrichment) pada media MacConkey selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan pengenceran menggunakan pepton water hingga

kosentrasi pengenceran 10^{-7} dan ditanam pada media MacConkey agar selama 24 jam pada suhu 37°C . Isolasi yang dilakukan memberikan 2 isolat, yaitu isolat H1 dan H2 yang dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Isolat bakteri H1 (a) dan H2 (b) pada media MacConkey

Hasil uji biokimia bakteri cairan lumen usus besar

Pencirian dan pengidentifikasian bakteri tidak hanya mengidentifikasi warna, sifat tembus cahaya, pinggiran (tepi), sifat permukaan (elevasi) dan bentuknya sebagai ciri-ciri morfologi tetapi juga dilakukan proses pewarnaan gram (Boyle dan Langman, 2000). Koloni tunggal pada setiap isolat diidentifikasi secara makroskopik yang disimpulkan pada Tabel 1. Koloni bakteri juga di amati jumlahnya dengan menggunakan alat koloni counter. Pada Tabel 2 dapat diamati jumlah total koloni setiap isolat dalam satuan CFU/mL.

Tabel 1. Hasil Identifikasi Isolat Bakteri H1 dan H2 secara Makroskopik

No	Morfologi makroskopis	Isolat H1	Isolat H2
1	Bentuk	Bulat - cembung	Bulat - cembung
2	Ukuran	Kecil - sedang	Kecil - sedang
3	Permukaan	Mengkilat - halus, pinggir rata (mukoid / berlendir)	Mengkilat - halus, pinggir rata (mukoid /berlendir)
4	Warna koloni	Pink	Pink

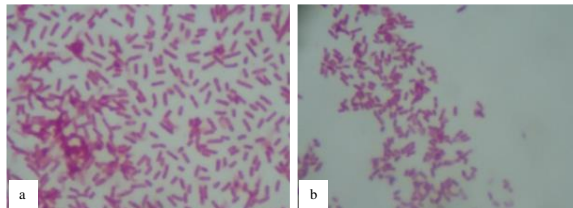
Tabel 2. Jumlah total koloni Isolat bakteri H1, H2, H3 dan H4 dalam satuan CFU/mL

Isolat	Jumlah Koloni CFU/mL
H1	190×10^7
H2	43×10^7

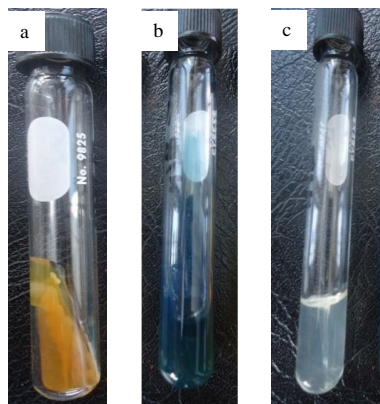
Identifikasi secara mikroskopik dilakukan dengan pewarnaan gram yang hasil identifikasinya terdapat pada Tabel 3. Hasil uji pewarnaan gram isolat H1 dan H2 pada Gambar 2 memperlihatkan bahwa isolat H1 dan H2 tergolong kepada bakteri gram negatif berwarna pink berbentuk basil pendek-pendek dan sel tunggal.

Tabel 3. Hasil Identifikasi Isolat Bakteri H1 dan H2 Secara Mikroskopik

No	Morfologi mikroskopis	Isolat H1	Isolat H2
1	Pewarnaan gram	Gram Negatif	Gram negatif
2	Warna	Pink muda	Pink Tua
3	Bentuk	Batang - pendek	Batang - pendek
4	Susunan	Tidak teratur	Tidak teratur
5	Motilitas	Tidak bergerak	Tidak bergerak
6	Spora	Tidak berspora	Tidak berspora



Gambar 2. Pewarnaan gram isolat bakteri batang gram negatif H1 (a) dan H2 (b)



Gambar 3. Uji Biokimia bakteri batang gram negatif; Uji TSIA (a), Uji SCA (b) dan Uji Motilitas atau Semisolid (c)

Tabel 4 memperlihatkan karakteristik hasil pengamatan uji biokimia sederhana yaitu

uji Motilitas, uji Simon citrat agar (SCA) dan uji Triple sugar ion agar (TSIA). Uji biokimia juga menunjukkan isolat H1 dan H2 merupakan bakteri gram negatif.

Tabel 4. Hasil pembacaan uji Biokimia Isolat bakteri H1 dan H2 gram negatif

Bakteri	TSIA	SCA	Motilitas
Isolat H1	Acid/acid + H2S -	+	-
Isolat H2	Acid/acid + H2S -	+	-

Keterangan:

TSIA (+) : *Triple sugar ion agar*

SCA (+) : *Simon citrat agar*

Motilitas : *Semi solid*

Medium Mac Conkey agar terdapat koloni yang dapat meragi laktosa menjadi asam, dengan ciri morfologi berwarna pink, bulat, ukuran kecil-sedang, permukaan konveks dan halus, pinggir rata. Pada medium ini terdapat juga koloni yang tidak berwarna karena tidak dapat meragi laktosa. Identifikasi secara mikroskopik dilakukan dengan pewarnaan gram. Hasil uji yang dilakukan memperlihatkan isolat tergolong kepada bakteri gram negatif berwarna pink berbentuk basil pendek dan bersel tunggal. Bakteri gram negatif saat pencucian dengan alkohol, lemak tereksitasi dari dinding sel, pori-pori membesar, kompleks kristal violet tercuci dan keluar dari dinding sel bakteri, sel menjadi tidak berwarna. Saat penambahan safranin sel menyerap zat warna sehingga sel berwarna merah (Khosama, 2015).

Uji biokimia menunjukkan isolat gram negatif pada uji TSIA (Triple sugar ion agar). Pada uji ini warna media berubah menjadi kuning karena bakteri mampu memfermentasi laktosa dan sukrosa yang disebabkan karena sifat asamnya. Pecah dan terangkatnya medium agar menandakan adanya pembentukan gas positif hasil dari fermentasi H₂ dan CO₂, tidak adanya endapan berwarna hitam artinya pembentukan H₂S negatif. Hasil uji sitrat ditandai dengan terjadinya perubahan warna karena adanya enzim sitrat permiase yang membawa sitrat ke dalam sel. Pada studi ini diperoleh hasil uji motilitas negatif karena tidak pertumbuhan koloni yang menyebar luas pada agar (Siegel *et al.*, 2016).

Komunitas mikrobiota usus memiliki hubungan erat dengan perkembangan kanker

kolorektal dengan mempengaruhi mekanisme tubuh dan mengatur fungsi fisiologis kolorektum dan bahkan seluruh sistem pencernaan (Astuti, 2019; Azcarate-Peril *et al.*, 2011; Candela *et al.*, 2011; Yu dan Fang., 2015; Rebersek., 2021). Beberapa strain bakteri tertentu telah diklasifikasikan sebagai bakteri patogen untuk kanker, seperti *Streptococcus bovis*, *H. pylori*, *Fusobacterium nucleatum* dan *Enterococcus faecalis* (Sabiston, 1995; Masrul, 2018; Surono, 2004; Kusuma dan Adi, 2016). Peningkatan *Prevotella* dilaporkan pada pasien CRC (Sobhani *et al.*, 2011). Wang *et al.* juga menemukan adanya penurunan bakteri penghasil butirir dalam tinja pasien CRC (Wang *et al.*, 2011).

Hasil identifikasi secara mikroskopik, pewarnaan gram makroskopik dan hasil uji biokimia sederhana yang telah dilakukan terhadap isolat H1 dan H2 menggambarkan bakteri batang gram negatif yang termasuk kedalam famili Enterobacteriaceae dari spesies *Shigella* sp. *Shigella* sp merupakan bakteri batang dengan pewarnaan gram bersifat gram negatif, tumbuh pada suasana aerob dan fakultif anaerob, pada pH 6,4 – 7,8 dengan suhu 37°C. *Shigella* sp merupakan bakteri patogen di saluran pencernaan manusia yang menyebabkan radang usus besar sehingga feses yang dikeluarkan akan berdarah dan berlendir.

Adanya bakteri pathogen didalam kolon dan rektum sangat dipengaruhi oleh makanan yang dikonsumsi oleh seseorang (Piccioni *et al.*, 2023; Bäumlner *et al.*, 2016). Asupan tinggi lemak juga memberikan pengaruh pada kejadian karsinoma kolorektal (Aykan., 2015; Williams *et al.*, 2010; yang dan Yu., 2018). Diet tinggi lemak mampu membuat fungsi hati dalam mensintesis kolesterol dan asam empedu meningkat. Patogen kolon menggunakan enzim 7-dehidroksilase untuk mengubah kolesterol dan asam empedu menjadi asam empedu sekunder, metabolit kolesterol seperti koprostanol, dan zat-zat toksik yang dapat membahayakan mukosa kolon dan memacu pertumbuhan sel-sel kolon yang bersifat kanker (Kusuma dan Adi, 2016).

Kesimpulan

Isolasi dan identifikasi bakteri dengan pewarnaan gram dan uji biokimia pada cairan lumen pasien kanker kolorektal menggambarkan bakteri batang gram negatif yang termasuk ke

dalam famili Enterobacteriaceae, dari spesies *Shigella* sp. Untuk mendapatkan gambaran identifikasi yang lebih baik perlu dilakukan karakterisasi secara molekuler berdasarkan metoda genotip.

Ucapan Terima Kasih

Penulis menyampaikan terimakasih kepada, Almarhumah Asril Zahar, Sp.Pd. yang telah memberikan bimbingan, arahan, saran, dan motivasi selama proses penelitian ini.

Referensi

- American Cancer Society (2014) *Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016*.
- Astuti, N. S. A., Rafli, R., & Zeffira, L. (2019). Profil dan Kesintasan Penderita Kanker Kolorektal di RSUP Dr. M. Djamil Padang. *Health and Medical Journal*, 1(1), 45-49.
- Astuti, N., Rafli, R. and Zeffira, L. (2019) 'Profil Dan Kesintasan Penderita Kanker Kolorektal Di RSUP Dr. M. Djamil Padang', *Health & Medical Journal*, 1(1), pp. 45–49.
- Aykan, N. F. (2015). Red meat and colorectal cancer. *Oncology reviews*, 9(1). doi: 10.4081/oncol.2015.288. PMID: 26779313; PMCID: PMC4698595.
- Azcarate-Peril MA, Sikes M, Bruno-Barcena JM. (2011) 'The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer?'. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* ;301:G401–424.
- Bäumlner, A. J., & Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*, 535(7610), 85-93. doi: 10.1038/nature18849. PMID: 27383983; PMCID: PMC5114849.
- Boyle, P. and Langman, J.S. (2000) 'ABC of colorectal cancer Epidemiology', *British Medical Journal*, 321, pp. 805–808.
- Candela M, Guidotti M, Fabbri A, Brigidi P, Franceschi C, et al. (2011) 'Human intestinal microbiota: cross-talk with the host and its potential role in colorectal cancer. *Crit Rev Microbiol* ;37:1–14.

- Dietert, R. R., & Dietert, J. M. (2015). The microbiome and sustainable healthcare. In *Healthcare* (Vol. 3, No. 1, pp. 100-129). MDPI.
- Ferlay, J. *et al.* (2015) 'Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012', *International Journal of Cancer*, 136, pp. E359–E386. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
- Hamdi, M., Zahari, A., & Asri, A. (2015). Profil Karsinoma Kolorektal di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Priode Januari 2009 sampai Desember 2011. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 4(2).
- Khosama, Y. (2015) 'Faktor Risiko Kanker Kolorektal', *CDK-234*, pp. 829–832. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.d6617>.
- Kurniati, AM. (2016). Mikrobiota Saluran Cerna: Tinjauan dari Aspek Pemilihan Asupan Makanan. *Jurnal Kedokteran Unila*. Volume 1 Nomor 2. pp. 380-384. URL: <https://juke.kedokteran.unila.ac.id/index.php>
- Kusuma Hapsari, P. and Adi Murbawani, E. (2016) 'Hubungan Asupan Serat, Lemak dan Kalsium dengan Kejadian Karsinoma Kolorektal di Semarang', *Journal of Nutrition College*, 5(4), pp. 461–468. URL: <http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/jnc>.
- Masrul, M. (2018) 'Pengaruh Konsumsi Serat dengan Pengurangan Risiko Kanker Kolon di Negara Barat: Studi Meta Analisis', *Jurnal Kesehatan Masyarakat Andalas*, 12(2), pp. 97–101. URL: <http://jurnal.fkm.unand.ac.id/index.php/jkma/>.
- Piccioni, A., Covino, M., Candelli, M., Ojetti, V., Capacci, A., Gasbarrini, A., ... & Merra, G. (2023). How Do Diet Patterns, Single Foods, Prebiotics and Probiotics Impact Gut Microbiota? *Microbiology Research*, 14(1), 390–408. DOI: <https://doi.org/10.3390/microbiolres14010030>
- Prakash, S., Rodes, L., Coussa-Charley, M., & Tomaro-Duchesneau, C. (2011). Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics: targets and therapy*, 71-86.
- Rebersek, M. (2021). Gut microbiome and its role in colorectal cancer. *BMC cancer*, 21(1), 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-021-09054-2>
- Sabiston, D.C. (1995) *Buku Ajar Bedah*. Jakarta: EGC.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2016) 'Cancer Statistics, 2016', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(1), pp. 7–30. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21332>.
- Sobhani, I., Tap, J., Roudot-Thoraval, F., Roperch, J. P., Letulle, S., Langella, P., & Furet, J. P. (2011). Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS one*, 6(1), e16393.
- Surono, I.S. (2004) *Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Jakarta: PT. Tri Cipta Karya.
- Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., & Zhao, L. (2012). Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *The ISME journal*, 6(2), 320-329.
- Williams, C. D., Satia, J. A., Adair, L. S., Stevens, J., Galanko, J., Keku, T. O., & Sandler, R. S. (2010). Associations of red meat, fat, and protein intake with distal colorectal cancer risk. *Nutrition and cancer*, 62(6), 701-709. DOI: [10.1080/01635581003605938](https://doi.org/10.1080/01635581003605938).
- Yang, J., & Yu, J. (2018). The association of diet, gut microbiota and colorectal cancer: what we eat may imply what we get. *Protein & cell*, 9(5), 474-487. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0543-6>
- Yu, Y. N., & Fang, J. Y. (2015). Gut microbiota and colorectal cancer. *Gastrointestinal tumors*, 2(1), 26-32. DOI: [10.1159/000380892](https://doi.org/10.1159/000380892)