

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *BARTONELLA* SPP. FROM BAT BLOOD AT TANJUNG RINGGIT CAVE ON EAST LOMBOK

By :

Andreyani Attamimi, Rima Nurmayani, Erni, Kunti Kartikasari, Kholik

Faculty of Veterinary Medicine Universitas Nusa Tenggara Barat,

Abstrac : Many research explained that bats are an important reservoir for *Bartonella* spp. On Lombok Island has many caves for breeding house of bats. The purpose of this research is to isolate and identify *Bartonella* spp. at Tanjung Ringgit Cave on East Lombok. An Observational survey with explorative laboratory was carried out on Tanjung Ringgit bat cave during May 2018. The bats were captured by net trap and blood samples were collected by puncturing the axillaries vein of bats for blood smears and examination of the presence of intraerythrocytic corpuscles. Each of blood samples was dipped in sterile BHI and they were incubated over the night. After 24 hours the samples were inoculated in Blood Agar under aerobic conditions at Laboratory of Public Health and calibration, Province of Nusa Tenggara Barat. The colonies were purified and characterized by biochemical methods. The result of blood smears by showed that 3 (30%) of 10 bat blood samples were found intraerythrocytic corpuscles. The morphological colonies of bacteria of the three bat blood that found intraerythrocytic corpuscles on Blood Agar are Heterogenic colonies, small regular to irregular larger forms and No hemolysis on blood agar. The result of the biochemical test showed that bacteria was non fermentative, urease, and indole negative. It also did not utilize citrate and Triple Sugar Iron (TSI) showed alkaline. *Bartonella-like* was isolated from bat blood at Tanjung Ringgit Cave on East Lombok besides on blood smears examination, The morphological colonies on Blood Agar and biochemical test of isolated bacteria of this research.

Keywords : *Bartonella* spp, Bat blood, Lombok

PENDAHULUAN

Bartonellosis merupakan penyakit zoonosis dan menjadi perhatian dunia karena dapat berakibat fatal pada kesehatan hewan dan manusia. Bartonellosis yang disebabkan oleh *Bartonella* spp. telah dinyatakan sebagai potensial zoonotic patogen yang dapat menyebabkan bakterimia, namun tanpa menyebabkan sakit pada inang reservoir (Bemis dan Kania, 2007). Kelelawar telah dinyatakan menjadi reservoir alami dari beberapa bakteri termasuk *Bartonella* spp. telah ditemukan pada kelelawar yang hidup liar pada beberapa negara di dunia (Reeves *et al.*, 2005). Bartonellosis adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Bartonella* spp merupakan bakteri gram negative, pleomorfik, dan bersifat intraselluler yang dapat menginfeksi manusia dan hewan liar. *Bartonella* spp. bisa menyebabkan demam Orroya, demam Trench, dan Cat Scratch disease (Pasavento *et al.*, 2005).

Bartonella spp. merupakan bakteri yang dapat menginfeksi darah manusia dan kelelawar serta hewan lain seperti anjing dan kucing. Karakteristik bartonella pada darah mamalia termasuk kelelawar adalah dengan adanya intraerythrocytic bacteremia (Regier *et al.*, 2016). Kelelawar jenis *Eonycteris speleae* yang terdapat di Gua Kabupaten Tanjung Ringgit Lombok Timur diduga telah terinfeksi *Bartonella* spp. dengan korpuskel body intraeritrosit dan terdapatnya ektoparasit penghisap

darah sebagai vektor bakteri tersebut (Kholik *et al.*, 2017).

Gua kelelawar yang terletak di Tanjung Ringgit Kecamatan Jerowaru Kabupaten Lombok Timur. Gua tersebut berdekatan dengan lokasi Pantai Pink yang merupakan salah satu tujuan wisata turis domestik maupun manca negara. Gua di Tanjung ringgit tersebut berlokasi pada titik koordinat -8.614710 S, 116.5944200E dan merupakan gua kelelawar yang dihuni oleh kelelawar jenis *Eonycteris speleae* tersebut (Kholik *et al.*, 2017).

Kelelawar mempunyai kebiasaan mencari makan dan terbang dengan jarak yang cukup jauh sehingga dapat membahayakan kesehatan hewan, manusia dan lingkungan di sekitar Gua di Tanjung Ringgit maka dari itu diperlukan isolasi dan identifikasi dari bakteri *Bartonella* spp. Pada darah kelelawar jenis *Eonycteris speleae* di Gua Tanjung Ringgit untuk memastikan keberadaan penyakit Bartonellosis.

MATERI DAN METODE

Jenis penelitian ini adalah epidemiologi deskriptif dengan rancangan survei observasional. Pada penelitian ini Populasi kelelawar di Gua Tanjung Ringgit tidak diketahui, sehingga

pengambilan sampel menggunakan non probabilitas dengan metode *Purposive sampling* yang dilakukan pada bulan Mei tahun 2018.

Gua Kelelawar yang menjadi lokasi pengambilan sampel terletak di desa Tanjung Ringgit, Kabupaten Lombok Timur Provinsi Nusa Tenggara Barat. Adapun letak Gua tersebut pada titik koordinat -8.614710 S dan 116.5944200 E.

Besar sampel dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan jumlah kelelawar per roaster. Berdasarkan obsevasi terlihat 25 ekor per roaster, maka jumlah estimasi populasi adalah sebagai berikut: $25/\beta = 25/0,25 = 100$, maka Jumlah sampel adalah $10\% \times 100 = 10$ ekor. β adalah fraksi populasi (FAO, 2011).

Penangkapan kelelawar dilakukan dengan menggunakan jaring (Net trap) pada pukul 16.00 WITA s/d pukul 19:00 WITA. Kelelawar yang tertangkap akan dimasukkan terlebih dahulu kedalam kandang. Kelelawar yang terkumpul akan diidentifikasi jenis dan kelaminnya terlebih dahulu, kemudian dilakukan pengambilan darah pada vena aksilaris. Darah yang keluar dari vena tersebut akan dimasukkan kedalam tabung EDTA dan BHI broth untuk dibawa ke laboratorium. Sampel darah dari lapangan dibuat preparat ulas darah dan dilakukan penanaman bakteri. Karakteristik *Bartonella* pada darah mamalia termasuk kelelawar adalah dengan adanya intraerythrocytic bacteremia (Regier *et al.*, 2016). Ulas darah dengan pewarnaan Giemsa dilakukan untuk mengetahui intraeritrosit korpuskel yang merupakan salah satu ciri adanya *Bartonella* spp. pada eritrosit.

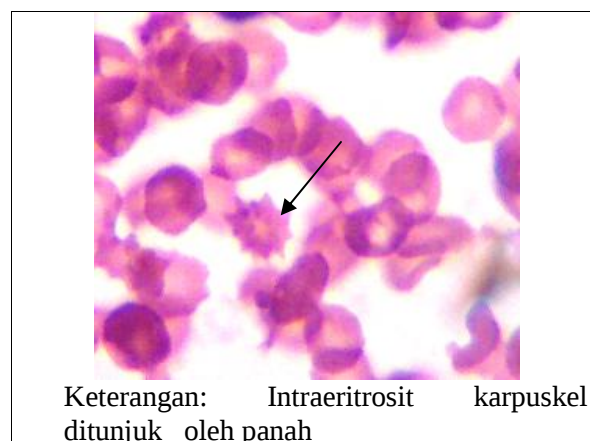
Penanaman bakteri dengan tujuan untuk isolasi *Bartonella* spp. dilakukan dengan memasukkan darah dari lapangan ke dalam BHI broth, kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 18-24 Jam. Pertumbuhan bakteri akan terlihat adanya hemolisis, terbentuk gas atau gelembung pada media BHI dan butiran putih pada lapisan darah. Koloni yang tumbuh akan diinokulasikan pada media agar darah dan Mac Conkey Agar (MCA), kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 18-24 (KemenKes, 2014).

Koloni yang tumbuh pada media tersebut diatas akan dilanjutkan dengan pewarnaan gram. Hasil dari koloni yang telah tumbuh pada media dalam cawan petri dipindahkan dalam objec glass identifikasi yang meliputi pengamatan mikroskopis dan uji biokimia mengacu pada pedoman identifikasi bakteri (Bergey's Manual Determinative Bacteriology tahun 1948) (Holt *et al.*, 1994).

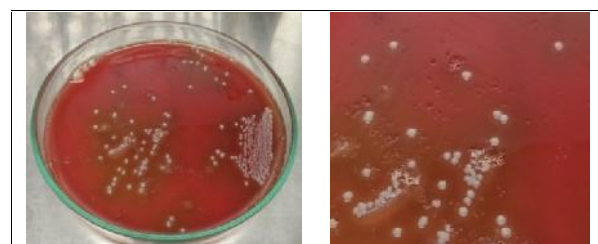
HASIL DAN DISKUSI

Hasil pengamatan preparat ulas darah kelelawar menunjukkan adanya intraeritrosit karpuskel, dari 10 sampel didapatkan 3(30%)

sampel yang yang positif. Intraeritrosit karpuskel dapat dilihat pada Gambar 1 berikut ini :



Dilakukan penanaman sampel positif yang menunjukkan adanya intraeritrosit karpuskel pada media *Blood Agar Plate*. Karakteristik dan morfologi bakteri yang tumbuh pada media dapat dilihat pada gambar 2 dan tabel 1 berikut ini:



Gambar 2. Morfologi Koloni pada Media *Blood Agar Plate*

Table 1. Karakteristik dan Morfologi Koloni pada Media *Blood Agar Plate*

Media	Jenis Gram	Morfologi Koloni
BAP (<i>Blood Agar Plate</i>)	Negatif (-)	Koloni yang tumbuh pada media agar berukuran kecil, berbentuk bulat, dengan permukaan sedikit cembung, tepian halus dan berwarna putih seperti susu.

Gambar 2 menunjukkan pada *Blood Agar Plate* bakteri yang tumbuh berwarna putih seperti susu, berukuran kecil, berbentuk bulat, dengan permukaan sedikit cembung dan tepian halus. Pada pewarnaan gram menunjukkan isolate bakteri termasuk dalam golongan bakteri gram negative berbentuk pleomorfic basil.

Morfologi *Bartonella* spp. sampai saat ini pada media agar bervariasi tergantung jenis *Bartonella*. Urushadze *et al.* (2017) menyatakan bahwa koloni *Bartonella*-like tampak kecil,

sirkuler, dan *raised* dengan morfologi halus atau kasar. Berdasarkan hal tersebut koloni bakteri yang tumbuh pada Media *Blood Agar Plate* menunjukkan kemiripan.

Hasil Uji biokimia dari isolat koloni bakteri yang tumbuh pada media *Blood Agar Plate* dapat dilihat pada Tabel 2 :

Tabel 2. Hasil Uji biokimia Koloni Bakteri yang Tumbuh pada Media *Blood Agar Plate*

Uji Biokimia	Hasil
Glucose fermentation	-
Lactose fermentation	-
Sucrose fermentation	-
Sorbitol fermentation	-
Indol production	-
Malonat	-
Urea utiliy	-
Simon Citrate Agar	-
Sulfide Indole Motilty	+
Triple Sugar Iron Agar	Alkalin (Gas +)

Hasil Uji Biokimia Koloni Bakteri yang tumbuh pada Media *Blood Agar Plate* menunjukkan bahwa bakteri tidak memfermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa, maltose dan sukrosa), Urease negatife, indol negatife, TSIA menunjukkan alkalin-alkalin hal tersebut sesuai dengan penelitian *Didi, Kavita et al.* (2013) yang menyatakan bahwa *B. henselae*. bakteri tidak memfermentasi karbohidrat. Oxidase, urease, indol negative. Hanya saja terdapat perbedaan pada TSIA yang menyatakan bahwa tidak ada perubahan, sedangkan di hasil penelitian menunjukkan adanya gas. Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri hasil isolate dari darah kelelawar dapat menggunakan besi untuk menimbulkan H_2S .

Berdasarkan hasil pengamatan intraeritrosit karpuskel, morfologi koloni bakteri di *Blood Agar Plate* dan uji biokima dapat diduga hasil isolate dari darah kelelawar adalah *Bartonella-like*.

SIMPULAN

Penelitian ini telah mengisolasi dan mengidentifikasi 3(30%) sampel dari 10 sampel yang diduga positif terdapat bakteri *Bartonella spp.* pada darah kelelawar jenis *Eonycteris speleae* yang hidup di Gua Tanjung Ringgi Kabupaten Lombok Timur Provinsi Nusa Tenggara Barat.

Hasil pengamatan preparat ulas darah menyatakan adanya intareritrosit karpuskel pada 3(30%) sampel. Morfologi koloni bakteri di *Blood Agar Plate* dan uji biokima dapat diduga hasil isolate dari darah kelelawar adalah *Bartonella-like*.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian analisis genomis dengan menggunakan PCR (Polymerase Chain Reaction) untuk memastikan keberadaan *Bartonella spp.* serta perlu dilakukan penanaman pada media coklat agar dan BHI Plate (*Brain Heart Infusion Plate*) dengan suasana anaerob untuk memastikan karakteristik dan morfologi dari *Bartonella spp.*

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Kementrian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi (KEMENRISTEK DIKTI) Republik Indonesia yang telah membiayai penelitian ini. Peneliti juga mengucapkan terima kasih kepada Badan Kesatuan Bangsa dan Politik (BAKESBANGPOL) Provinsi Nusa Tenggara Barat atas izin penelitian yang diberikan, serta tidak lupa pula Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi (BLK PK) yang telah membantu dalam isolasi dan mengidentifikasi *Bartonella spp.* yang berasal dari darah kelelawar di Gua Tanjung Ringgit, Kabupaten Lombok Timur Provinsi Nusa Tenggara Barat.

DAFTAR PUSTAKA

- Holt, J.G. Krieg, N.R., Sneath, P., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. Family Enterobacteriaceae; in Bergey's manual of determinative bacteriology (9th edition.), edited by W.R. Hensyl (Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland), pp. 175-194.
- Reeves, W. K., Loftis, A. D., Gore, J. A., & Dasch, G. A. 2005. Molecular evidence for novel *Bartonella* species in *Trichobius major* (Diptera: Streblidae) and *Cimex adjunctus* (Hemiptera: Cimicidae) from two southeastern bat caves, U.S.A. J. Vector. Ecol. 30:339-341.
- Bemis, D.A., and Kania, S.A. 2007. Isolation of *Bartonella sp.* from Sheep Blood. Emerging Infectious Diseases 13 (10): 1565-1567
- (FAO) Food and Agriculture Organisation of the United Nations.(2011) Investigating the role of bats in emerging zoonoses: Balancing ecology, conservation and public health interests. Edited by S.H. Newman, H.E. Field, C.E. de Jong and J.H. Epstein. FAO Animal Production and Health Manual No. 12. Rome.

- Didi, K., Chaudhry, R., Sharma, N., Dhawan, B., 2013. Strategy for Identification and Characterization of *Bartonella henselae* with Conventional and Molecular Methods, pp 380-387
- KemenKes RI. 2014. Prosedur Pemeriksaan Bakteriologi Klinik. Sub dit Bina Pelayanan Mikrobiologi dan Imunologi, pp: 34-37.
- Regier, Y., O'Rourke, F and Kempf, V.A.J. 2016. *Bartonella* spp. - a chance to establish One Health concepts in veterinary and human medicine. Parasites & Vectors 9:261.
- Kholik., Permatasari, F.B., Legowo, D., Rohmawati, R., Rachmawati, Wicaksono, A.B., Saputra, M.I.R. 2017. Bat flies from cave-dwelling bats and their potential role of *Bartonella* spp. transmission on Lombok Island, Indonesia (Abstract). The 26th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP), Kuala Lumpur, Malaysia.
- Urushadze, L., Bai, Y., Osikowicz, L., McKee, C., Sidamonidze, K., Putkaradze, D., Imnadze, P., Kandaurov, A., Kuzmin, I., Kosoy, I. 2017. Prevalence, diversity, and host associations of *Bartonella* strains in bats from Georgia (Caucasus). PLOS Negl Trop Dis 11(4): e0005428 .<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005428>.

