

LAPORAN  
HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL  
TAHUN ANGGARAN 2010



**Pengembangan Metode Deteksi Cepat dan Tingkat Spesifik Kepekaannya  
terhadap *Escherichia coli* O157:H7 pada  
Bahan Makanan dan Spesimen**

Emy Koestanti Sabdoningrum, M.Kes, Drh  
Dr. Garry Cores de Vries, drh, MS, MSc  
Dadik Rahardjo, M.Kes, Drh

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010 sesuai dengan Surat Keputusan  
Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional  
Nomor:553/H3/KR/2010, Tanggal 11 Maret 2010

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2010**

LAPORAN  
HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL  
TAHUN ANGGARAN 2010



FK  
KBC  
LP. 161/11  
Sab  
P

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

**Pengembangan Metode Deteksi Cepat dan Tingkat Spesifik Kepekaannya  
terhadap *Escherichia coli* O157:H7 pada  
Bahan Makanan dan Spesimen**

Emy Koestanti Sabdoningrum, M.Kes, Drh  
Dr. Garry Cores de Vries, drh, MS, MSc  
Dadik Rahardjo, M.Kes, Drh

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010 sesuai dengan Surat Keputusan  
Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional  
Nomor:553/H3/KR/2010, Tanggal 11 Maret 2010

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2010**



## Halaman Pengesahan

1. Judul Penelitian : Pengembangan Metode Deteksi Cepat dan Tingkat Spesifik Kepekaannya terhadap *Escherichia coli* O157:H7 pada Bahan Makanan dan Spesimen

## 2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : Emy Koestanti Sabdoningrum, drh., MKes  
 b. Jenis Kelamin : P  
 c. NIP : 197012101999032002  
 d. Pangkat/Golongan : Penata/ IIC  
 e. Jabatan fungsional : Lektor  
 f. Bidang Keahlian : Mikrobiologi Pangan  
 g. Fakultas/Jurusan : Fakultas Kedokteran Hewan

Tim Peneliti

No.	Nama dan Gelar	Keahlian	Fakultas	Perguruan Tinggi
1	Dr. Garry Cores de Vries, drh, MS, MSc	Mikrobiologi Genetik	FKH UNAIR	Unair
2	Dadik Rahardjo, MKes, Drh	Mikrobiologi Pangan	FKH	Unair

## 3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian :

- a. Jangka Waktu Penelitian yang diusulkan : 1 tahun  
 b. Jumlah biaya yang diusulkan : Rp 100.000.000,-  
 c. Biaya yang disetujui tahun : Rp 72.000.000,-

Surabaya, 29 Oktober 2010

Mengetahui,  
 Dekan  
 Fakultas Kedokteran Hewan  
 Universitas Airlangga

Ketua Peneliti

Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., PhD  
 NIP. 130 687 305

Emy Koestanti Sabdoningrum, drh., MKes  
 NIP. 197012101999032002

Menyetujui :  
 Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Unair,



Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt. MSi  
 NIP 19590805 198701 1001



## Ringkasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan suatu sistem deteksi cepat terhadap *E. coli* O157:H7 dari sampel feses dan bahan makanan dalam jumlah kecil (25 gram) dan jumlah besar (375 gram). Pengembangan metode pengujian baru yang spesifik untuk *E. coli* O157:H7 dengan pembandingan kontrol positif dan negatif. Teknik ini menggunakan *E. coli* O157:H7, alat PCR dengan penggunaan primer multiplex yang dirancang khusus dan pengoptimasian siklus ulangan, waktu dan temperatur denaturasi, annealing dan ekstensi primer. Suatu protokol akan dikembangkan untuk sistem ini yang dirancang guna meminimalkan kompleksitas dan panjangnya rantai media perbenihan, memakai media umum yang ada dipasaran (komersial). Dapat memeriksa beberapa sampel sekaligus. Preparasi sampel untuk pengujian menggunakan langkah-langkah sederhana untuk melisiskan dan mengencerkannya. *E. coli* O157:H7 merupakan bakteri patogen "food borne disease" yang menyebabkan hemolytic-uremic syndrome (HUS) dan hemorrhagic colitis (HC). Metode yang dikembangkan untuk mendeteksi *E. coli* O157:H7 dan diperuntukan bagi industri makanan, distributor makanan dan badan pengawas makanan.

Metode : 25 g bahan makanan (daging giling, hati, kecambah) dalam 375 g larutan buffer NaCl 0,9 % diinokulasi dengan *E. coli* O157:H7 yang telah dibiakan dalam media pertumbuhan, kemudian diuji. Data yang diperoleh dari hasil pengujian ini menggambarkan berbagai variasi gene virulen yang dimiliki untuk dievaluasi. Variabel ini meliputi berbagai strain *E. coli* O157:H7.

Media yang digunakan adalah buffered peptone water (BPW) untuk memperbanyak *E. coli* O157:H7. Protokol yang dihasilkan khusus untuk *E. coli* O157:H7. Lama waktu pembiakannya hanya 8 jam. Pembacaan hasil uji keseluruhan tahapan proses hanya memakan waktu 10 jam dari sampel hingga hasil. Sistem ini dirancang khusus untuk deteksi secara spesifik dan cepat terhadap *E. coli* O157:H7.

Sistem ini berdasarkan teknik PCR, yang memungkinkan pendeteksian *E. coli* O157:H7 lebih cepat, spesifik, sah dan sensitif.

### Summary

This study was an attempt to isolate *Escherichia coli* O157:H7 from diarrheal patients, various foods, and water samples collected in Surabaya and adjacent regions (Sidoarjo, Lamongan and Tuban). The isolates *Escherichia coli* O157:H7 were both phenotypically and genotypically characterized. Phenotypic characterization consisted biochemical tests and serological assays performed in order to see environmental prevalence of and homology analyses. Genotypic characterization was performed by PCR-based assays targeted for virulent gene, *i.e.* *ctx* gene. Data on isolates and prevalence of isolation from environment was compared to those of clinical patients in the corresponding regions to determine if there is any discrepancy in prevalence, phenotypic or genotypic features between the environmental isolates and clinical isolates.

PCR was successfully employed in detecting toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 from diarrheal stool samples of clinical patients, foods and environment. The sensitivity in dilution of the minced beef and liver were higher than that in the dilution of saline and white radish sprout.

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas rahmatNya yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan penelitian dengan judul :

**Pengembangan Metode Deteksi Cepat dan Tingkat Spesifik Kepekaannya terhadap *Escherichia coli* O157:H7 pada Bahan Makanan dan Spesimen**

Penulis sangat berterimakasih kepada :

1. Allah SWT atas rahmatNya
2. Almarhum Dr. Garry Cores de Vries, MS, MSc, Drh yang telah melakukan penelitian ini sebelum beliau wafat.
3. Ketua Lembaga Penyakit Tropis Dr. Nasrodin, dr, SpPD, K-Pti
4. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., PhD
5. Serta semua pihak yang telah membantu penelitian ini

Besar harapan penulis penelitian ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan masyarakat luas.

Penulis



**DAFTAR ISI**

	<b>Halaman</b>
Lembar Identitas dan Halaman Pengesahan .....	i
Ringkasan dan Summary .....	ii
Prakata .....	iv
Daftar Isi .....	v
I Pendahuluan .....	1
II Tujuan dan Manfaat Penelitian .....	3
III Studi Pustaka.....	5
IV Metode Penelitian .....	16
V Hasil dan Pembahasan .....	20
VI Kesimpulan dan Saran .....	26
DAFTAR PUSTAKA .....	27

## BAB I. PENDAHULUAN

Flora normal saluran pencernaan terdiri dari berbagai macam bakteri yang hidup di dalam saluran usus dari hewan mamalia, termasuk manusia. Sebagian besar anggota kelompok ini adalah bakteri berbentuk batang yang dikenal sebagai *Escherichia coli*. Umumnya ditemukan di dalam colon, organisme yang berflagela ini hidup saling menguntungkan satu dengan lainnya yaitu dengan induk semangnya, yaitu sebagian besar serotype *E. coli* yang hidup di dalam colon tidak merugikan induk semangnya. Namun terdapat beberapa serotype *E. coli* yang ada di dalam tubuh induk semangnya dapat merugikan kesehatan. Secara klinis penting untuk membedakan bakteri ini antara berbagai jenis serotype *E. coli*. Serotype bakteri ini ditentukan berdasarkan antibody yang ada di dalam pasien atau hewan coba laboratorium, yang menentukan type spesifik dari antigen yang ada pada bakteri tersebut. Type antigen disandi dengan huruf seperti antigen-O menggambarkan komponen polysaccharida dinding sel, antigen-H merupakan komponen flagella. Angka menunjukkan subtype antigen, yang dapat dibedakan dengan antibodi spesifik sehingga digunakan untuk menentukan serotype bakteri. Satu serotype yang telah diketahui patogen adalah *E. coli* O157:H7, yang merupakan anggota dari keluarga *shigatoxin (verotoxin) – producing E. coli* (STEC atau VTEC).

Hewan ternak seperti ruminansia merupakan reservoir bagi STEC dan menyebarkan bakteri ini ke dalam lingkungan melalui ekskresi feses. Manusia dapat terinfeksi baik secara penularan langsung atau melalui makanan yang terkontaminasi (Nataro dan Kaper, 1998). *Shigatoxin-producing E. coli* O157:H7 kadangkala dapat ditemukan di dalam saluran pencernaan sapi. Daging dapat terkontaminasi dengan bacteria ini yang berasal dari saluran pencernaan sewaktu proses pemotongan hewan. Bila daging kurang sempurna dimasak maka panasnya daging merupakan kondisi baik bagi pertumbuhan bakteri. Timbulnya infeksi disebabkan karena daging mentah terkontaminasi dan kurang sempurna pemasakannya. Jadi terdapat hubungan antara terinfeksi STEC dengan mengkonsumsi daging ayam, juice apel, susu non pasteurisasi dan air yang terkontaminasi.

Beberapa *Shiga toxin-producing Escherichia coli* (STEC) menyebabkan diare berdarah pada manusia, *haemolytic ureamic syndrome* dan *haemorrhagic colitis*. *Escherichia coli* O157:H7 dan serotype *E. coli* O111 menyebabkan *foodborne disease* (Nataro & Kaper 1998). Orang dewasa yang menderita *hemorrhagic colitis* atau



perdarahan colon menunjukkan gejala kejang perut, dan diare encer dan berdarah. Orang lanjut usia dan anak-anak dapat menderita *Hemolytic uremic syndrome* (HUS) yang ditandai dengan perdarahan gastrointestinal, kencing berdarah, anemia dan gagal ginjal akut. Ketiga penyakit ini ada kaitannya dengan infeksi *E. coli* O157:H7, *thrombotic thrombocytopenic purpura* (TTP) merupakan manifestasi dari HUS. Keganasan O157:H7 tergantung pada produksi shigatoxin (verotoksin).

Suatu penelitian telah dilakukan terhadap pencemaran *E. coli* dari feses terhadap bahan makanan dan dampak yang ditimbulkannya (Grau *et al.* 1969; Diez-Gonzalez *et al.* 1998; Jordan & McEwen 1998) dan juga terhadap *E. coli* O157:H7 (Kudva *et al.* 1995, 1997). Bagaimana keadaan ekologi serotype STEC ini di Indonesia?. Hanya sedikit yang diketahui.

## BAB II

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### **Penelitian ini bertujuan :**

- (1) untuk lebih mendalami pengertian dari ekologi dari STEC di dalam lingkungan hidup manusia dan hewan dengan memantau penyebaran coliform dan STEC di dalam feses. Hubungan diantara isolat STEC dirumuskan dengan mengkarakterisasi bakteri tersebut secara serotype, genotype dan adanya gene virulen yang dimilikinya seperti gene Shigatoxin-1 (*stx1*), Shigatoxin-2 (*stx2*), gene *attaching and effacing* (*eae*) dan gene *enterohaemolysin* (*EhlyA*) yang terletak pada plasmid EHEC (Beutin *et al.* 1995).
- (2) mengevaluasi ancaman dari *Shigatoxin-Producing E. coli* yang terdapat pada hewan dan makanan yang berpengaruh terhadap kesehatan manusia.
- (3) mengembangkan suatu system multiplex PCR/metode deteksi cepat terhadap STEC yang ada di dalam feses manusia dan hewan serta mengevaluasi tingkat kepekaan deteksinya terhadap spesifitas gene virulen

#### **Manfaat Penelitian**

Tidak semua STEC asal hewan menimbulkan ancaman bagi kesehatan manusia. Varian STEC seperti *E. coli* O157:H7, diketahui sebagai penyebab wabah penyakit akibat *foodborne* dan *waterborne* pada masyarakat termasuk *E. coli strain* STEC O26, O103 , O111 dan lain-lain.

Belum terdapat suatu metode diagnostik yang dapat membedakan secara tepat antara STEC yang menimbulkan penyakit dan yang tidak menimbulkan penyakit, hal ini akan mempersulit penginterpretasian penemuan STEC pada hewan. Oleh karena itu penentuannya didasarkan pada keputusan manajemen dan perspektif resiko. Gene yang menyandi Shigatoxin berada di dalam bacteriophage yaitu virus yang menyerang bakteri. Bacteriophages ini sering berintegrasi ke dalam genom bacteria, dan dengan cara ini bakteri mampu untuk menghasilkan *Shigatoxin*.

Bervariasinya jumlah coliform yang tersebar diantara masing-masing individu manusia dan hewan dengan berbagai variasi persentase shigatoxin (*stx+*) yang ada dalam sampel tinja, yang ada kaitannya dengan jenis makanan yang dikonsumsi atau lama waktu berada di dalam makanan sangat berpengaruh terhadap penyebaran strain STEC di dalam feses.

Kemampuan untuk mengidentifikasi bakteri STEC dan gene virulen sebagai marker STEC termasuk varian Shigatoxin (*stx1*, *stx2*, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d* dan *stx2e*). Demikian pula membedakan isolat *E. coli* O157:H7 dari *E. coli non-O157* memerlukan suatu pengembangan metode dasar PCR sehingga karakterisasi cepat untuk STEC dapat terwujud.

Sistem perbenihan, cara mengisolasi dan mendeteksi *E. coli* O157, O26, O111 dalam penelitian ini menghasilkan suatu metode rutin yang cepat berdasarkan pada tingkat molekular.

### BAB III. STUDI PUSTAKA

#### Diarrheagenic *Escherichia Coli*

*Escherichia coli* merupakan suatu kelompok bacteria yang besar dan banyak jenisnya. Sebagian besar strain *E. coli* tidak menimbulkan penyakit, hanya beberapa strain saja. Ada beberapa strain *E.coli* menyebabkan diare, infeksi saluran kemih, penyakit saluran pernafasan dan pneumonia penyakit lainnya. Selain itu *E.coli* digunakan sebagai patokan terjadinya pencemaran air walaupun tidak berbahaya, hal ini sedikit membingungkan bagi mikrobiolog.

Ada strain *E.coli* tertentu yang dapat menghasilkan racun *Shiga toxin* sehingga strain tersebut dikenal dengan berbagai nama seperti *Shiga toxin-producing E.coli* (STEC) atau *verocytotoxigenic E.coli* (VTEC) atau *enterohemorrhagic E.coli* (EHEC). Bakteri yang dimaksud ini adalah *E.coli* strain O157:H7 yang biasanya hanya disingkat *E.coli* O157 atau O157.

Kauffman pada tahun 1940-an membedakan serotipe *E.coli* berdasarkan pada jenis antibodi yang terbentuk di dalam serum pasien atau hewan coba yang sama dengan jenis antigen *E.coli*. Jenis antigen dibedakan berdasarkan huruf seperti antigen-O merupakan komponen *lipopolysaccharide* dinding sel *E.coli*, antigen-H merupakan komponen flagella. Telah ditemukan 171 *serogroup* O dan 56 H. Gabungan ini dikenal dengan sistem O:H, yang telah banyak dipelajari pada penelitian infeksi *E.coli* secara epidemiologis dan patogenesisnya.

Tabel 1. Perbedaan kategori diarrheagenic *E.coli*

Organisme	Acronym
Enterotoxigenic <i>E.coli</i>	ETEC
Enteroinvasive <i>E.coli</i>	EIEC
Enteropathogenic <i>E.coli</i>	EPEC
Enterohaemorrhagic <i>E.coli</i>	EHEC
Enteroadherent <i>E.coli</i>	EAEC
Facultative Enteropathogenic <i>E.coli</i>	FEEC
Attacing and Effacing <i>E.coli</i>	AEEC

Hubungan serogroup O dengan kategori diarreagenic *E.coli*.

Enteropathogenic *E.coli*

O26\*, O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128ab, O142

O18, O44, O112, O114

Enterotoxigenic *E.coli*

O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85

O115, O128ac, O139, O148, O153, O159, O167

Enteroinvasive *E.coli*

O28ac, O29, O124, O136, O143, O144, O152, O164, O167

Enterohemorrhagic *E.coli*

O157, O26, O111

Enteroadherent *E.coli**serogroup* O belum selesai dirumuskan

\*, *Serogroup* O26 sebelumnya dimasukkan ke dalam EPEC, tetapi kini dikelompokkan di dalam EHEC. EAEC untuk sementara belum terdefinisi di dalam kategori diarrheogenic *E.coli*.

Penyebab diare yang paling sering ditemukan adalah infeksi bakteri, virus dan parasit. Diare oleh bakteri galur *diarrheogenic Escherichia coli* dibedakan dalam 4 kategori yaitu : *enterotoxigenic* (penyebab utama diare pada turis dan bayi di negara sedang berkembang), *enteroinvasive* (penyebab dysentri), *enteropathogenic* (penyebab diare pada bayi) dan *enterohemorrhagic* (penyebab diare, kolitis berdarah (HC = *Hemorrhagic colitis*) dan sindroma uremia berdarah (HUS = *Hemolytic uremic syndrome*).

Terdapat juga jenis *serogroup* STEC non-O157 yang menimbulkan penyakit. *Serogroup E.coli* ini adalah O26, O111 dan O103. Penyakit yang ditimbulkan oleh *serogroup* non-O157 lebih ringan dibandingkan *E.coli* O157.

Infeksi STEC dapat menyerang orang pada semua umur, namun infeksi ini lebih parah pada anak kecil dan orang usia lanjut seperti *hemolytic uremic syndrome* (HUS). Gejala klinis infeksi STEC pada setiap orang bervariasi tapi umumnya menunjukkan kejang lambung yang cukup berat, diare berdarah dan muntah. Demam yang ringan kurang dari 38,5 °C. Penderita umumnya sembuh dalam 5 – 7 hari.

Sekitar 5 – 10 % penderita diare yang didiagnosa terinfeksi STEC dapat menderita komplikasi dengan *hemolytic uremic syndrome* (HUS). Penderita HUS mengalami penurunan frekuensi kencingnya, merasa lelah dan pucat. Penderita HUS harus dirawat inap karena kerja ginjalnya terhenti, yang akan dapat berkembang ke masalah yang lebih serius. Penderita HUS akan sembuh dalam beberapa minggu, namun ada pula yang mengalami kerusakan ginjal yang permanen dan bahkan ada yang meninggal.

Masa inkubasi infeksi STEC berkisar rata-rata 3 – 4 hari atau antara 1 – 10 hari. Gejala infeksi berjalan lambat, mulai nyeri lambung ringan atau diare tanpa darah hingga memburuk dalam beberapa hari. Bila berkembang menjadi HUS, biasanya terjadi dalam 7 hari setelah gejala pertama diare.



STEC hidup di dalam lambung hewan ruminansia seperti sapi, kambing, domba dan rusa. Sumber utama penularan STEC pada manusia berasal dari sapi. STEC yang menyebabkan penyakit pada manusia umumnya tidak menimbulkan penyakit pada hewan. Babi dan burung dapat bertindak sebagai penyebar STEC, yang diperoleh dari lingkungannya.

Infeksi diperoleh ketika sejumlah kecil feses manusia atau hewan tertelan, seperti termakannya makanan yang terkontaminasi, minum susu segar yang tidak dipasteurisasi, penggunaan air yang tidak didisinfeksi, kontak dengan sapi atau kontak dengan feses yang berasal dari penderita STEC. Susu mentah (segar) yang tidak dipasteurisasi dan keju yang terbuat dari susu mentah merupakan bahan makanan yang berisiko tinggi terhadap penularan *E.coli* O157. Penularan STEC dapat juga terjadi pada pekerja peternakan sapi atau melalui makanan hamburger yang kurang benar pemanasannya atau yang terkontaminasi atau infeksi ini dapat juga terjadi akibat berenang di danau atau makanan yang disajikan oleh mereka yang tidak mencuci tangan setelah selesai menggunakan toilet dan masih banyak cara lainnya.

Sumber infeksi STEC sangat banyak sehingga hanya 20 % dari kasus ini berasal dari suatu wabah penyakit yang dapat terlacak sumber infeksinya oleh petugas dinas kesehatan. Diperkirakan paling sedikit 70.000 penderita infeksi *E.coli* O157 setiap tahunnya, hal ini disebabkan banyak penderita infeksi ini tidak pergi ke rumah sakit, tidak melakukan pemeriksaan fesesnya di laboratorium dan banyak pula laboratorium yang tidak melakukan pengujian terhadap STEC. Banyak pula penderita diare yang disebabkan oleh STEC non-O157. Banyak laboratorium diagnostik tidak melakukan identifikasi terhadap STEC non-O157 karena pekerjaan ini lebih rumit daripada identifikasi *E.coli* O157.

Infeksi STEC biasanya di diagnose berdasarkan hasil pemeriksaan terhadap specimen feses. Penentuan strain STEC yang spesifik sangat penting bagi bidang Kesehatan Masyarakat untuk menemukan adanya suatu wabah penyakit. Sebaiknya semua laboratorium diagnostik harus dapat menentukan adanya STEC di lingkungannya dan mampu mengidentifikasi *E.coli* O157. Untuk penentuan grup O dari non-O157 maka sebaiknya strain tersebut dikirim ke laboratorium khusus yang dapat mendeteksi *E.coli* non-O157 atau yang ditunjuk oleh Departemen Kesehatan. STEC pada umumnya menghilang dari feses pada masa penyembuhan, namun penderita tersebut masih dapat menyebarkan STEC ini untuk beberapa minggu walaupun setelah gejala penyakit sudah tidak tampak. Anak-anak cenderung membawa

STEC lebih lama (carrier) dibandingkan orang dewasa. Maka untuk pencegahan penularan STEC bagi diri kita, keluarga kita atau orang lain adalah dengan mencuci tangan dengan baik.

Pengobatan simptomatis seperti penanganan dehidrasi sangat membantu. Jangan beri antibiotik pada jenis infeksi ini. Pemberian antibiotik terbukti tidak membantu penderita STEC dan malahan antibiotik ini meningkatkan resiko terjadinya HUS, demikian pula halnya dengan obat antidiare seperti ImodiumA® akan meningkatkan resiko HUS.

Penggunaan obat terutama obat antimikroba perlu dievaluasi kembali, demikian pula terhadap toksin *shiga* (Stx) dan faktor virulen lain dari *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) galur O157 (Choi *et al.*, 2002; Schroeder *et al.*, 2002). Panduan pengobatan infeksi EHEC O157 yang dikeluarkan oleh Kementerian Kesehatan dan Kesejahteraan Jepang menganjurkan pemakaian *kanamycin*, *fosfomicin*, *quinolone* dan *norfloxacin* untuk infeksi EHEC O157 (Matsushiro *et al.*, 1999). Pada pemberian antimikroba dengan dosis di atas batas yang dibutuhkan untuk tujuan menghambat replikasi bakteri, antimikroba ini malah meningkatkan aktivitas transkripsi gen *stx* hingga 140 kali lipat, oleh sebab itu pemakaian antimikroba harus dihindari pada pengobatan pasien yang terinfeksi *Shiga toxin-producing Escherichia coli* (STEC). Demikian pula dengan toksin lain yang dihasilkan oleh galur *E.coli* juga mengalami hal yang sama namun dengan efek sintesis yang kurang dibandingkan toksin *shiga* (Kimmit *et al.*, 2000; Urio *et al.*, 2001).

### **Diagnosis dan deteksi**

Dengan pertimbangan tidak meningkatkan ongkos pemeriksaan pada laboratorium mikrobiologi klinik, maka ditekankan secara ekonomi untuk tidak melakukan pemeriksaan sampel tinja secara rutin terhadap EHEC. Jadi tidak dilakukannya pengujian terhadap pengobatan spesifik bagi infeksi EHEC, juga mengurangi entusiasme terhadap penemuan baru test diagnostik di laboratorium. Alasan utama kesehatan masyarakat untuk uji penyaringan terhadap EHEC adalah untuk mendeteksi suatu wabah penyakit. Dengan berhasilnya suatu wabah dapat terdeteksi, maka dengan pendekatan kesehatan masyarakat dapat diintervensi jumlah kasus dan kematian penderita infeksi EHEC.

Strain *E.coli* O157:H7 dan strain *E.coli* penghasil toksin Shiga (Stx ) merupakan kuman enterik patogen yang berbahaya sehingga mendapat banyak

perhatian oleh para mikrobiologis klinik di negara dunia ketiga, karena pernah dilaporkan menyebabkan berbagai kasus termasuk kegagalan ginjal dan *hemorrhagic colitis*. Dosis rendah dan kuatnya ekspresi Stx ini yang serupa dengan *Shigella dysenteriae type I*, umumnya luput dari perhatian para mikrobiologis di negara dunia ketiga. Kasus ini terjadi akibat tidak pedulinya para buruh/pekerja terhadap *biosefety*, yang tidak sengaja membawa bakteri ini ke rumah dimana anak-anaknya dapat terinfeksi olehnya.

### Cara diagnosis

Ada tiga cara umum yang digunakan untuk mendiagnosis infeksi EHEC, yaitu :

1. Isolasi strain *E.coli* O157 dari sampel tinja
2. Deteksi terhadap bakteri penghasil Stx atau deteksi adanya Stx di dalam tinja
3. Deteksi titer antibodi terhadap LPS (lipopolysaccharida) O157 atau antigen EHEC lain di dalam serum.

Di bawah ini terdapat beberapa metode diagnostik, metode subtyping strain dan determinasi adanya faktor –faktor virulen seperti plasmid O157 atau gen *eae* yang berguna untuk diagnostik dan penyidikan epidemiologi.

Isolasi terhadap *E.coli* O157:H7 dan strain *E.coli* lainnya penghasil Stx dari sampel tinja sebaiknya dilakukan pembiakannya pada saat permulaan menderita sakit. Pada umumnya penderita baru akan diperiksa setelah timbul gejala HUS yang umumnya timbul beberapa hari setelah diare. Bila sampel tinja penderita diare diperiksa dalam kurun waktu 2 hari dan mengandung *E.coli* O157:H7, umumnya angka penyembuhannya mencapai 100 %. Bila tinja penderita diperiksa antara 3 – 6 hari atau lebih dari 6 hari setelah diare berjalan maka angka penyembuhannya akan menurun menjadi 91,7 % hingga 33,3 %. Sebab dua per tiga penderita yang sudah mencapai gejala HUS tidak dapat ditemukan *E.coli* O157:H7 di dalam tinjanya. Sebaliknya beberapa penderita dapat mengeluarkan *E.coli* O157:H7 dalam tinjanya untuk beberapa minggu hingga beberapa bulan setelah menderita infeksi ini. Oleh karena ini perlu dilakukan pemeriksaan terhadap tinja beberapa kali setelah penderita sembuh.

Sifat biokimiawi yang dapat digunakan untuk identifikasi terhadap strain O157:H7 adalah tidak dapat memfermentasi D-Sorbitol secara cepat , hal ini berbeda dengan strain *E.coli* pada umumnya yang mencapai antara 75 - 94 %. Demikian pula halnya terhadap Rhamnose dimana *E.coli* O157 tidak dapat memfermentasinya di dalam plate agar dan 60 % dari *E.coli* yang non-sorbitol fermenting adalah milik *E.coli* serogroup

lain yang memfermentasi rhamnose. Strain EHEC O157 tidak dapat memfermentasi rhamnose dalam 1 hari pada uji standart fermentasi gula-gula di dalam tabung reaksi, hal yang sangat berbeda dibandingkan pada plate agar. Sifat biokimia yang lain yang membedakan strain *E.coli* O157:H7 dari strain *E.coli* yang lain adalah tidak mempunya menghasilkan B-glucuronidase yang menghidrolisis 4-methyl-umbelliferyl-D-glucurinate (MUG). *E.coli* O157:H7 juga tidak dapat tumbuh subur pada temperatur 44 – 45 °C, dimana temperatur ini merupakan suhu yang digunakan untuk menumbuhkan *E.coli* dari bahan makanan dan sampel air.

### **Teknik perbenihan.**

Media agar yang biasa digunakan untuk mengisolasi *E.coli* O157:H7 adalah agar SMAC. Media ini mengandung sorbitol 1 % sebagai pengganti lactose di dalam media standart MacConkey. Koloni transparan akibat tidak memfermentasi sorbitol merupakan khas dari *E.coli* O157:H7. Agar SMAC tidak dapat digunakan untuk membedakan antara strain STEC O157:H7 dengan strain STEC lain karena tidak diketahui adanya hubungan genetik antara produksi Stx dengan fermentasi sorbitol. Demikian pula halnya dengan serotipe H tidak ada hubungannya dengan sorbitol. Peningkatan jumlah isolat *E.coli* O157:H7 di dalam agar SMAC dapat dicapai bila sebelumnya sampel spesimen dibiakan terlebih dahulu dalam media cair selektif selama 4 jam hingga semalam. Selain SMAC untuk mengisolasi *E.coli* O157:H7 juga dapat dipakai media cair GN Broth Hajna dan Trypticase Soy Broth yang ditambahkan cefixime (50 ng/ml) dan Vancomycin (40 µg/ml).

Modifikasi agar SMAC yang digunakan untuk seleksi dan deferensiasi adalah dengan penambahan cefixime dan telurite (CT-SMAC agar) yang digunakan untuk menumbuhkan STEC O157:H7 dan strain *Shigella sonnei* sedangkan sebagian besar strain *E.coli* lainnya dihambat pertumbuhannya. Demikian pula dengan penambahan novobiocin akan meningkatkan daya seleksi untuk *E.coli* O157:H7. *E.coli* O157:H7 tidak memfermentasi rhamnose pada cawan agar. Penambahan sorbitol dan rhamnose serta cefixime di dalam agar SMAC (CR-SMAC) dapat meningkatkan proporsi koloni transparan (colorless) yang merupakan koloni milik serotype O157:H7. Untuk menguji ketidak mampuan *E.coli* O157:H7 menghasilkan β-glucuronidase dapat dilihat dengan MUG. Strain *E.coli* non-O157:H7 dapat menghidrolisis MUG dengan menghasilkan ikatan dengan fluorescent yang terdapat di dalam media tersebut. Media fluorescent tersebut telah diproduksi secara commercial seperti Rainbow agar O157 (Biolog Inc.,

Hayward California); Fluorocult *E.coli* O157 agar (Merck, Darmstadt, Germany). Substrat chromogenic yang ada di dalam Rainbow agar adalah spesifik untuk  $\beta$ -galactosidase dan  $\beta$ -glucuronidase dengan memberi spektrum warna pada koloni dari warna hitam untuk *E.coli* O157:H7, abu-abu untuk *E.coli* O26:H11, merah untuk strain STEC lainnya, biru dan ungu untuk *E.coli* yang bukannya penghasil Stx (Stx negatif). *Escherichia hermanii* secara biokimiawi dan serologis sama dengan dengan *E.coli* O157:H7 dan untuk membedakannya dengan uji fermentasi cellobiose (*E.coli* O157:H7 adalah negatif sedangkan *E. hermanii* adalah positif) dan dengan menumbuhkannya pada media yang mengandung kalium cyanida (*E.coli* O157:H7 tidak tumbuh, *E. hermanii* dapat tumbuh). *E.coli* O157:H7 dapat diidentifikasi berdasarkan pertumbuhannya pada agar SMAC dengan hasil sorbitol negatif dan beraglutinasi dengan antiserum O157.

### Immunoassay

Pengujian imunologi dapat dilakukan terhadap EHEC yaitu terhadap antigen O dan H (O157 LPS dan flagellar antigen H7) atau terhadap toxin Stx baik bagi strain O157 maupun strain non O157.

#### (1) Antigen O dan H

Koloni *E.coli* yang mengandung O157 LPS dapat langsung diketahui dari agar SMAC, sedangkan untuk antigen H diperlukan pasase ke dalam media motility (setengah padat). Kit diagnostik yang menyediakan antisera terhadap O157 LPS dan antigen H7 untuk digunakan pada ELISA, reagen Latex, Antibodi yang dilabel pada serbuk-serbuk emas dan bentukan lainnya dapat diperoleh di pasaran dengan berbagai merek buatan LMD Laboratories Inc, Carlsbad; Oxoid diagnostic reagent, Denka Seiken- Japan; Difco Laboratory, Detroit; Pro-Lab Diagnostic, Texas; Remel Microbiology Product, Kansas dan lain sebagainya.

#### (2) Shiga toxin

Beberapa uji imunologi yang digunakan oleh FDA (Food and Drug Administration) untuk mendeteksi toxin Stx dan STEC seperti Premier EHEC test (Meridian Diagnostic, Inc) . Kit ini menggunakan monoclonal antibodi terhadap Stx1 dan Stx2 untuk mengikat antigen dan antibodi polyclonal anti-Stx dan horseradish peroxidase untuk deteksi. Kit ini digunakan untuk mendeteksi antigen Stx di dalam perbenihan bakteri, sampel makanan dan sampel tinja. Premier EHEC test lebih peka dibandingkan dengan uji agar SMAC, namun kurang peka bila dibandingkan PCR. Sensitivitas dan spesifitas

Premier EHEC test adalah 100 % dan 99,7 % untuk mendeteksi *E.coli* O157:H7 dibandingkan dengan sensitivitas dan spesifitas agar SMAC adalah 60 % dan 100 %. Reaksi positif palsu dapat terjadi terhadap *Pseudomonas aeruginosa* (yang Stx negatif).

VTEC-RPLA test (Oxoid, Inc) digunakan untuk mendeteksi Stx1 dan Stx2 berdasarkan reverse passive latex agglutination test. Uji ini dikombinasi dengan enterohemolisin test dimana sampel tinja dibiakan dalam agar enterohemolisin. Pendeteksian terhadap Stx1 dan Stx2 dapat dilakukan dengan ELISA yaitu dengan menggunakan antibodi terhadap Stx1 dan Stx2.

Uji lainnya yaitu Vero test (MicroCarb, Gaitersburg) yang menggunakan reseptor Gb3 .

### (3) Antigen lainnya.

Telah ditemukan antibodi monoklonal (4E8C12) yang dapat mengenal OMP 5 sampai 6 kDa yang diekspresikan oleh strain O157:H7 dan strain O26:H11 untuk mengidentifikasi strain EHEC. Fungsi dari protein yang ditemukan oleh antibodi tersebut belum diketahui. Antibodi monoklonal ini telah digunakan pada ELISA dan Dipstick immunoassay untuk mendeteksi *E.coli* O157:H7 yang diisolasi dari makanan. Juga telah ditemukan antibodi poliklonal yang digunakan untuk mengenal produk dari plasmid *E.coli* O157:H7 yaitu pO157 namun belum dapat diperoleh secara komersial di pasaran.

### (4) Pemisahan Immunomagnetik

Karena hanya sedikit jumlah *E.coli* O157 yang ada di dalam sampel tinja maka Immunomagnetic Separation (IMS) dengan bead magnetik yang dilapisi antibodi terhadap *E.coli* O157 (produk dari Dynabeads anti-*E.coli* O157, Dynal, Inc, NY). IMS ini digunakan untuk mengisolasi *E.coli* O157 dari sampel makanan, air dan tinja sapi. Untuk tinja manusia sebaiknya dilakukan tahapan preenrichment terlebih dahulu di dalam GN broth Hajna atau buffered pepton water yang ditambahkan vancomycin, cefiximine dan cefsulodin yang kemudian dilanjutkan dengan inkubasi bersama anti-*E.coli* O157 Dynabead dan magnetic separation. Kemudian ikatan kompleks magnetic bead – bakteri diresuspensi kembali dan ditanam pada cawan berisi agar SMAC, CT-SMAC atau CR-SMAC. Dari hasil penelitian Karch dan kawan-kawan preenrichment dilakukan di dalam GN Broth Hajna selama 4 jam untuk dilanjutkan dengan IMS, diperoleh hasil terhadap deteksi strain *E.coli* O157 sebanyak  $10^2$  CFU/g tinja dari  $10^7$  flora coliform. Dari 20 pasien penderita HUS dengan tingkat antibodi terhadap strain *E.coli* O157 di dalam serum dapat terdeteksi dengan teknik IMS sebanyak 18 sampel sedangkan dengan teknik PCR terhadap Stx sebanyak 13 sampel sedangkan dengan

teknik koloni hibridisasi *stx* terdeteksi sebanyak 12 sampel dan dengan perbenihan langsung ke dalam agar SMAC atau CT-SMAC hanya sebanyak 7 sampel. Jadi teknik IMS adalah yang paling peka dari semua metode deteksi terhadap STEC yaitu hanya membutuhkan  $10^2$  CFU organisme strain *E.coli* O157 per gram tinja, kemudian diikuti oleh PCR sebanyak  $10^5$  CFU strain O157 per gram tinja.

(5) Aktivitas Cytotoxic tinja bebas

Pemeriksaan terhadap aktivitas Stx atau adanya STEC di dalam sampel tinja membutuhkan metode deteksi yang sangat sensitif. Untuk maksud ini digunakan kultur sel (cell culture assay), walaupun kurang praktis bagi laboratorium Mikrobiologi Klinik. Garis besar cara teknik ini adalah pengenceran terhadap sampel tinja lalu disentrifug dan diambil supernatan filtratnya yang mengandung bakteri lalu ditambahkan pada kultur sel. Sel vero yang direkomendasikan untuk digunakan pada kultur sel ini adalah sel HeLa karena sel HeLa kurang begitu sensitif terhadap pertumbuhan STEC varian Stx2. Kultur sel ini diamati selama 3 hari untuk melihat cytopathogenic effect dan aktivitas cytotoxic -nya dan di konfirmasi dengan uji netralisasi dengan pemakaian serum anti-Stx spesifik. Metode kultur sel ini juga digunakan untuk menguji kultur bakteri terhadap aktivitas Stx.

**Probe DNA dan PCR**

Teknik probe DNA dan PCR (Polymerase Chain Reaction) untuk EHEC ditujukan langsung pada deteksi gen yang menyandi Stx. Hilangnya gen *stx* sering terjadi karena perbenihan yang berulang-ulang di laboratorium sehingga menurunkan akurasi teknik probe DNA dan PCR.

(1) Deteksi gen *stx*.

Dibutuhkan 2 probe fragment DNA yang berbeda terhadap EHEC yaitu *stx1* dan *stx2*. Selain kedua sintetik probe *stx1* dan *stx2* terdapat juga probe spesifik terhadap strain-strain *stx2* lainnya yaitu seperti *stx2c* dan *stx2e*. Untuk menghibridisasi probe oligonukleotida pada *stx1*, *stx2* dan *stx2e* dapat dilakukan dengan temperatur rendah (45 °C) tetapi hibridisasi dengan temperatur yang lebih tinggi (53 °C) hanya dapat dilakukan terhadap *stx1*.

Teknik PCR digunakan untuk mendeteksi gen *stx* dan multipleks seperti *eae* (intimin), *ehx*, *uidA* atau *fliC* (antigen H7), O157 LPS, plasmid pO157,  $\beta$ -glucoronidase dengan penggunaan primer untuk masing-masing gen tersebut. Terdapat beberapa primer dan protokol PCR yang dirancang untuk mengamplifikasi gen tersebut. Ada primer yang





digunakan untuk mendeteksi *stx1* dan *stx2*. Namun kini yang banyak digunakan adalah primer tunggal untuk masing-masing strain *stx1* dan *stx2* yang memiliki ukuran yang berbeda. Primer yang lebih spesifik telah dirancang untuk mendeteksi *stx2c* dan *stx2e*. Untuk membedakan antara *stx2c* dan *stx2* digunakan kombinasi teknik PCR dan RFLP (restriction fragment length polymorphism). Disini PCR menggunakan sebuah pasangan primer yang dapat mengamplifikasi kedua gen tersebut, kemudian produk amplifikasi tersebut dipotong (didigesti) dengan enzim restriksi endonuklease yang akan menghasilkan dua fragment dengan ukuran yang berbeda yaitu *stx2* dan *stx2c*.

Teknik PCR sangat peka dan spesifik pada penggunaan terhadap perbenihan koloni bakteri namun kurang peka untuk digunakan langsung terhadap sampel tinja karena adanya masalah dengan latar belakang dan faktor hambatan yang diperlihatkan tinja pada PCR. Namun Ramotar dan kawan-kawan berhasil mendeteksi *stx1* dari sampel tinja dengan teknik PCR yaitu sebanyak  $10^2$  CFU per 0,1 g tinja tetapi tidak berhasil pada *stx2* dan pada *stx2* dibutuhkan sebanyak  $10^7$  CFU per 0,1 g tinja. Teknik PCR lebih peka dari pada agar SMAC dalam mendeteksi *E.coli* O157:H7, namun kurang peka dibandingkan dengan pengujian kultur sel dalam mendeteksi cytotoxin di dalam sampel tinja. Terdapat hubungan antara hasil uji PCR dan teknik koloni hibridisasi dengan penggunaan probe *stx*. Brain dan kawan-kawan melaporkan telah berhasil meningkatkan tingkat kepekaan deteksi *stx1* dan *stx2* sebesar 2 log unit dari  $10^5$  CFU per 0,1 g sampel tinja bila menggunakan labeling radioisotop pada probe *stx* yang dihibridisasi dengan Southern blot. Paton dan kawan-kawan menggunakan enrichment broth dalam prosedur teknik PCRnya dan berhasil menemukan 50 % yang positif PCRnya dari sampel tinja anak-anak yang sehat. Caprioli dan kawan-kawan melaporkan bahwa dengan teknik PCR terhadap *stx* memberi hasil positif sebanyak 50 % dari sampel tinja yang positif mengandung cytotoksin. Karch dan kawan-kawan menemukan bahwa prosedur PCR memiliki kepekaan sebesar  $10^4$  CFU per 0,1 g tinja, namun tidak sepeka IMS dalam mendeteksi O157.

## (2) Deteksi gen *eae*

Probe *eae* pada ujung 5' gen dapat digunakan untuk mengidentifikasi EHEC dan EPEC. Jerse dan kawan-kawan memperlihatkan sebuah probe *eae* pasangan ganda dengan fragment sebesar 1 kb, sangat sensitif dan spesifik digunakan untuk mendeteksi adanya gen *eae* dengan ujung 5'. Ujung 3' gen *eae* umumnya menentukan berbagai variant serotype. Telah dikembangkan probe oligonukleat spesifik dan primer PCR untuk mendeteksi adanya urutan nukleotida pada ujung 3' gen *eae* dari strain EPEC O127:H6,

EHEC O157:H7 dan EHEC O111. Yang menarik disini adalah strain O157:H45, O157:H8 dan O157:H39 yang *stx*-negatif memiliki urutan nukleotida gen *eae* ujung 3' yang mirip dengan EPEC O127:H6 namun berbeda sekali dengan urutan *eae* O157:H7. Primer untuk *eae* digabungkan dengan primer *stx1* dan *stx2* pada multiplex PCR.

#### (3) Deteksi plasmid pO157 / gen hemolisin

Plasmid pO157 terdapat pada hampir semua strain O157:H7 dan strain EHEC lainnya. Levine dan kawan-kawan memperoleh probe yang fragmentnya sebesar 3,4 kb dari plasmid CVD419 yang digunakan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi EHEC. Di dalam fragment tersebut mengandung gen *ehxA* (*hlyA*) yang menyandi hemolysin EHEC. Juga telah dikembangkan suatu probe oligonukleotida dan teknik PCR untuk mendeteksi gen yang menyandi hemolysin di dalam plasmid pO157.

#### (4) Deteksi gen lainnya

Teknik PCR juga pernah dicoba untuk mendeteksi gen *fliC* yang menyandi antigen H7. Pasangan primer *fliC* yang dikombinasikan dengan primer untuk *stx* dan *eae* dalam multiplex PCR digunakan untuk mengidentifikasi strain *E.coli* O157:H7, O157:Nm dan strain EHEC lainnya. Strain O157:H7 tidak memproduksi  $\beta$ -glucuronidase. Jadi juga telah dikembangkan primer untuk multiplex PCR terhadap gen mutant glucuronidase (*uidA*) yang digabungkan dengan pasangan primer untuk *stx1* dan *stx2* guna mengidentifikasi O157:H7 dengan gen *stx*.

## BAB IV. METODE PENELITIAN

### Preparasi strain *E. coli* sebagai inokulum

Satu koloni masing-masing dari *Escherichia coli* O26 dan O157 diinokulasi ke dalam 3 botol falcon yang berisi 4 ml Nutrient broth (Oxoid) dan diinkubasi 37 °C selama 4 jam pada shaking waterbath. Kultur *E. coli* yang telah diinkubasi selama 4 jam tersebut dibuat seri pengenceran dalam 9 ml Maximum Recovery Diluent (MRD; Oxoid) sehingga akhir pengenceran adalah 10<sup>-9</sup>. Sebanyak 100 µl dari masing-masing strain *E. coli* dengan pengenceran 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> dan 10<sup>-9</sup> ditanam pada Agar Nutrient (Oxoid) dan diinkubasi pada 42 °C selama 16 jam untuk dihitung jumlah sel bakteri pada saat permulaan inokulasi. Inokulasi pada penelitian ini dikerjakan secara duplo.

### Inokulasi bakteri pada sampel daging cincang, hati, kecambah dan PZ

Daging cincang, hati sapi/ayam dan kecambah dibeli dari toko swalayan di Surabaya kemudian disimpan pada 4 °C hingga digunakan untuk diinokulasi dengan strain *E. coli* O26 dan O157. Satu ml dari seri pengenceran 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> dan 10<sup>-9</sup> dari masing-masing strain *E. coli* ditambahkan ke dalam 25 g sampel (daging cincang, hati, kecambah) yang mengandung 225 ml Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid) dan ditambah antibiotic Novobiocin sehingga konsentrasi akhir menjadi 20 mg/l, kemudian diinkubasi pada suhu 42 °C selama 16 jam (semalam). Sebagai control digunakan sampel daging cincang, hati, kecambah dan larutan PZ yang tidak diinokulasi *E. coli*.

### Ekstraksi DNA

DNA diekstraksi dari sampel broth yang telah dieramkan 16 jam dan yang disimpan selama 7 hari pada suhu - 20 °C dengan menggunakan Dneasy tissue kit (Qiagen, Germany), cara ekstraksi sesuai petunjuk dari Qiagen. Sebanyak 25 µl dari masing-masing sampel diisikan kedalam tabung Eppendorf yang mengandung 180 µl buffer tissue lysis kit. Sebanyak 20 µl Proteinase K ditambahkan pada setiap tabung dan homogenasi dengan alat vortex. Semua sampel dipanaskan 55 °C selama 135 menit dan secara berkala tabung digoyangkan selama inkubasi agar tetap homogen. Setelah inkubasi semua sampel di vortex selama 15 detik dan isolasi terhadap total DNA dari jaringan hewan (daging giling, hati) dan tanaman sesuai prosedur langkah ke-3 dari protocol Dneasy tissue kit dari Qiagen.

### Serogrouping *E. coli* dengan multiplex PCR

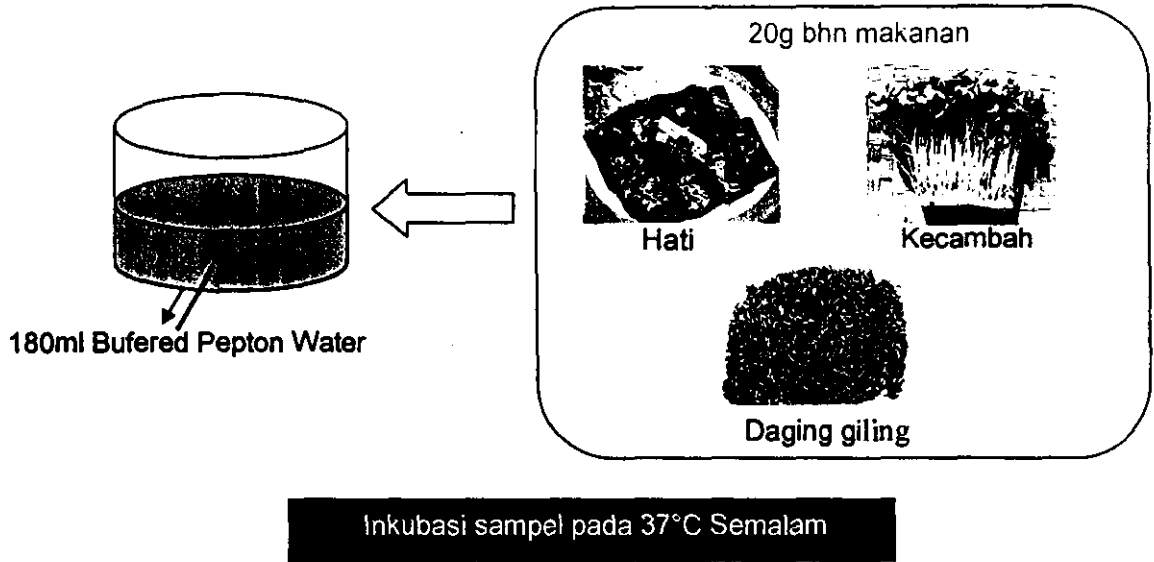
Semua sampel diuji terhadap adanya *E. coli* O157, O111 dan O26 dengan menggunakan Triplex (multiplex) PCR. Reaksi triplex dirancang dengan menggabungkan primer yang dipublikasi oleh Paton and Paton (1998) terhadap gene *rfb* dari *E. coli* O157 dan O111 yaitu [O157-Forward (5'-CGGACATCCATGTTGATATGG-3'), O157-Reverse (5'-TTGCCTATGTACAGCTAATCC-3'), O111-F (5'-TAGAGAAATTATCAAGTTAGTTCC-3') dan O111-R (5'-ATAGTTATGAACATCTTGTtagc-3')] dan primer yang di publikasi oleh Debroy et al. (2004) untuk *E. coli* O26 gene *wzx* [O26-F (5'-GCGCTGCAATTGCTTATGTA-3') dan O26-R (5'-TTTCCCCGCAATTTATTCAG-3')].

### Triplex PCR

Setiap 5 µl template DNA murni sampel (kurang lebih 100 ng) diamplifikasi dalam 50 µl larutan reaksi yang mengandung 5 µl dNTP (mengandung 3 mM masing-masing dATP, dCTP, dGTP dan dTTP), 2 µl campuran primer forward dan reverse (5 pmol/ µl setiap primer), 5 µl 10 x buffer (750 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 % (v/v) Tween 20), 5 mM MgCl<sub>2</sub> dan 2,5 U *Taq* DNA Polymerase. PCR dijalankan dengan 36 cyclus dengan langkah: 95 oC untuk 30 detik, 60 oC selama 60 detik dan 72 oC selama 60 detik dan untuk ekstensi terakhir 72 oC selama 10 menit. Setiap reaksi amplifikasi mengandung control positif dan control non-DNA template. Produk amplifikasi DNA dilarutkan dengan 2 % (w/v) gel agarose elektroforesis dalam 1 x TBE (tris-borate-EDTA) bufer yang mengandung 0,5 µmg/ml ethidium bromide dengan 100 volt dan visualisasi dengan sinar UV dan dipotret dengan camera digital.

Pengujian terhadap tingkat

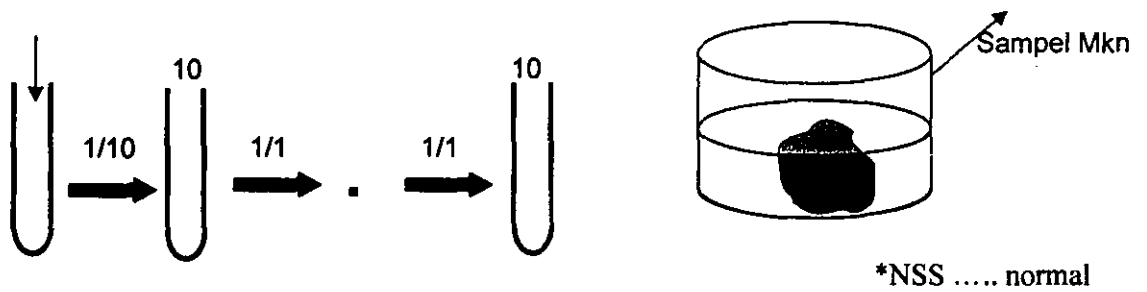
1. Inkubasi sampel bahan makanan dalam BPW



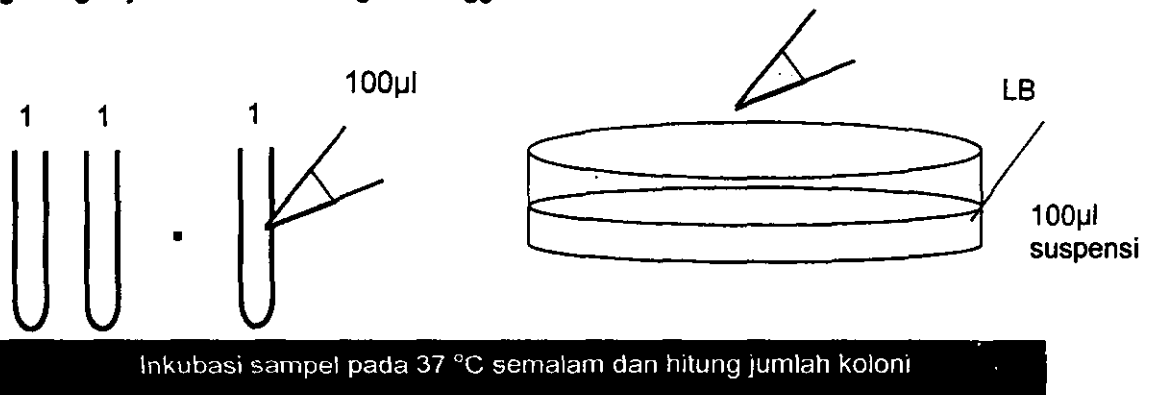
2. Pengenceran kultur O157 dengan lar. NaCl\*

EHEC O157 atau O26 diinkubasi dlm BPW – 6jam

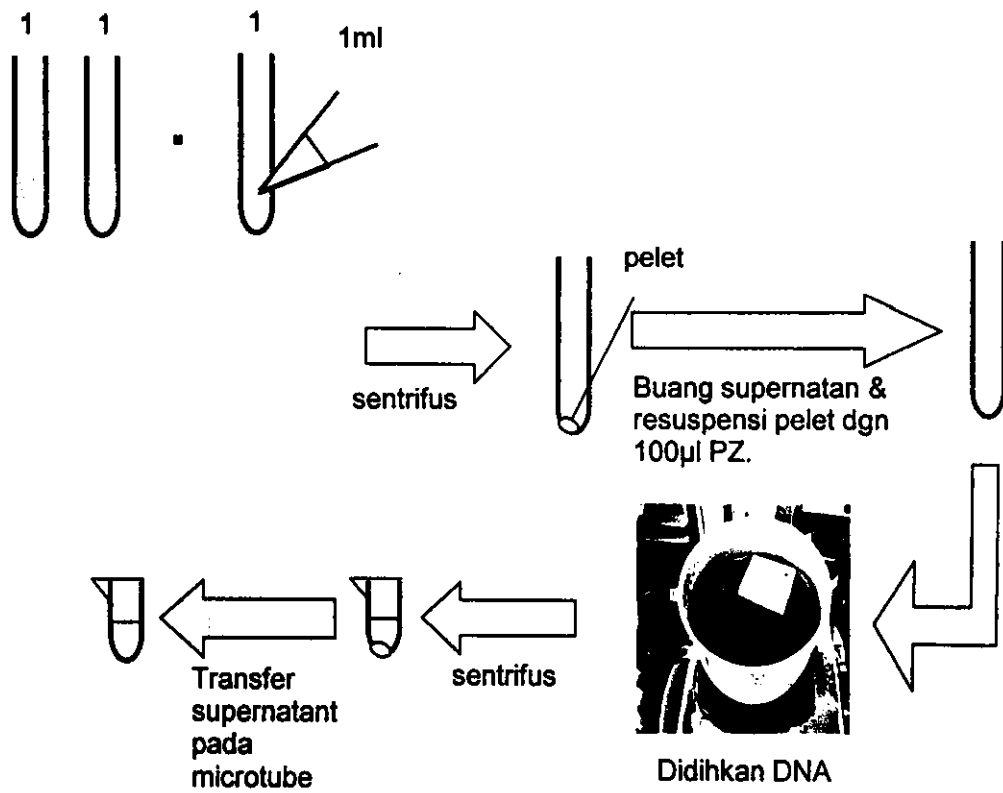
Kultur E. coli : PZ or kultur sampel= 1ml : 9ml



Penghitungan jumlah kuman dengan menggunakan Total Plate Count Method



### 3. Extract DNA dari sampel



### 4. DNA extract di PCR (target : *toxB* DNA)

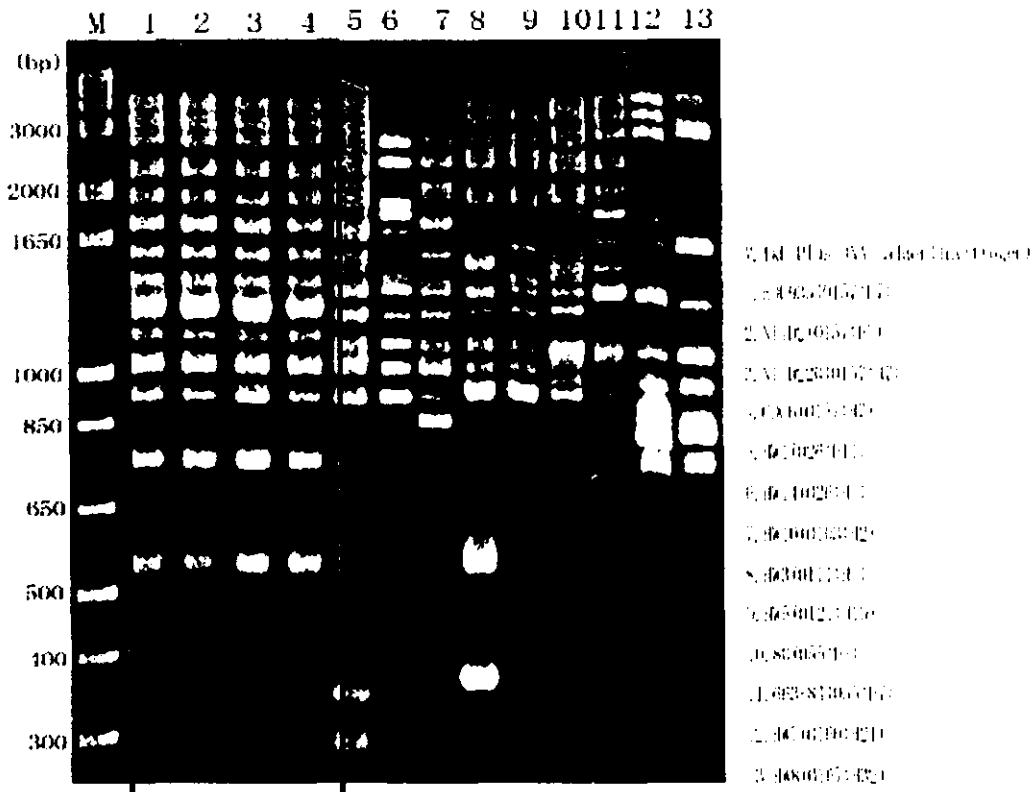
## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### Identifikasi dan karakterisasi isolat *E.Coli* O157:H7

Isolat *E.Coli* diambil dari 2 sumber yang berbeda yaitu penderita diare di berbagai Puskesmas di Kabupaten Lamongan dan Sidoarjo dan dari lingkungan di sekitarnya. Sampel feses penderita diare diambil dengan cotton swab steril kemudian diusapkan pada Media EMBA dan diinkubasi selama semalam pada suhu 37 °C. Koloni yang berwarna merah keemasan merupakan *E.Coli* dibawa ke laboratorium Biologi Molekuler- Fakultas Kedokteran Hewan – Universitas Airlangga untuk diidentifikasi. Demikian pula untuk sampel pangan berupa daging ayam, sayuran dan hati sapi diambil dari 5 lokasi berbeda di pasar tradisional Surabaya diperiksa di laboratorium Biology Molecular – FKH UNAIR. Pengambilan / pengumpulan sampel dilakukan secara berkala untuk memperoleh pemutakhiran (updated) data dan kemungkinan ditemukannya strain baru.

Kegiatan mikroflora di dalam usus merangsang gerakan peristaltik saluran pencernaan. Gerakan peristaltik yang menurun akibat pemberian bahan pembunuh bakteri seperti antibiotik atau alkohol, akan mempermudah kolonisasi bakteri patogen pada permukaan lapisan epitel usus. Diantara flora normal terdapat pula *E.coli* O157-H7 patogen yang faktor virulensinya berasal dari bakteri patogen seperti galur STECmendapat gen *stx* dari bakteri patogen. Galur STEC O157-H7 selain sebagai flora normal mengadakan blokade tempat ikatan bakteri patogen pada epitel usus, juga dapat berbalik menimbulkan berbagai penyakit seperti diare.

*E.Coli* O157 –H7 yang mengandung plasmid dapat diketahui dari resistensinya terhadap antibiotik. Plasmid adalah suatu unit molekul DNA yang merupakan kromosom ekstra yang non esensial dan mampu melakukan replikasi sendiri. Fungsi plasmid di dalam *E.Coli* O157 –H7 adalah memberi resistensi terhadap sejumlah antibiotik dan logam, memberi kemampuan konjugatif pada bakteri (transfer DNA), menghasilkan faktor virulensi seperti enterotoksin. Untuk mengetahui jenis plasmid yang diisolasi dari STEC O157 –H7 dapat dilihat dari besarnya molekul. Secara biologi molekuler dapat dibuktikan dengan memotong DNA plasmid dengan enzim restriksi endonuklease.



O157  
O157-specific DNA fragment (ca. 1100bp).

Pita DNA hasil ekstraksi kromosom pada lajur 1 dan 4 diperoleh dari STEC yang terdeteksi dengan metode hibridasi koloni menggunakan probe oligo-10, demikian juga dengan lajur 5 dan 8 diperoleh dari STEC yang dideteksi dengan menggunakan probe oligo-9. Ukuran molekul DNA kromosom isolat yang mengandung gen STEC diperlihatkan pada gel agarose elektroforesis 1% adalah 1100bp.

Penentuan galur STEC isolat E.Coli O157 yang dihasilkan dengan PCR adalah sebagai konfirmasi hasil deteksi dengan hibridasasi koloni. Metode PCR ditujukan langsung pada deteksi gen O157 dengan menggunakan primer masing-masing gen. Terdapat beberapa primer dan protokol PCR yang dirancang untuk mengamplifikasi gen target.



**Hasil PCR toxB**

Deteksi O157 dilakukan dengan metode dasar DNA yaitu penggunaan probe DNA dan primer oligonukleotida. Sepotong fragmen DNA spesifik terhadap gen STEC O157-H7 digunakan sebagai primer untuk amplifikasi fragmen DNA dengan PCR.

55981

65490

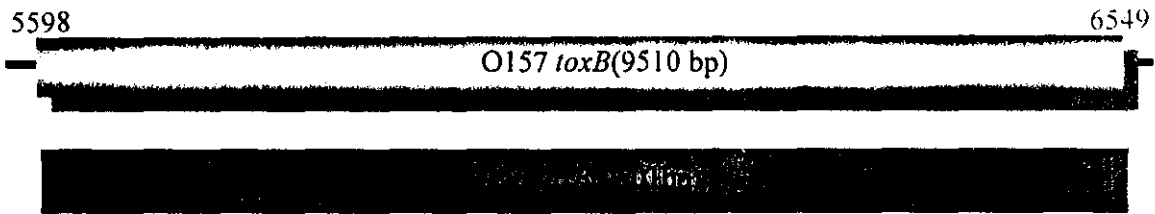
	toxB-1	toxB-2	toxB-3	toxB-4	toxB-5	toxB-6	toxB-7	toxB-8	toxB-9
O157 n=41	41	41	41	41	41	41	41	41	41
O55 n=7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O26 n=7	0	7	7	7	7	7	0	0	7*
O103 n=4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O111 n=7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O121 n=4	0	2	3	3	2	3	0	0	0
Others n=4	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Primer yang digunakan untuk deteksi gen O157 dengan teknik PCR terdapat dalam tabel diatas. Amplifikasi fragmen DNA dengan thermocycler-PCR diawali dengan tahap pertama pemanasan pada temperatur 94°C selama 4 menit, kemudian tahap ke-2 sebanyak 35 putaran masing-masing dengan urutan siklus temperatur 94°C selama 1,5 menit dengan tujuan denaturasi, 55°C selama 1 menit dengan tujuan annealing dan 72°C selama 1 menit untuk tujuan ekstensi rangkaian nukleotid dan ditutup dengan tahap ke-3 sebanyak satu putaran 72°C selama 4 menit.

Pembagian gene ini dibagi dalam 9 bagian dan design primer pada masing-masing bagian. Selanjutnya hasil PCR digunakan untuk menetapkan toxB dalam EHEC O157 dan serotype lainnya pada gene ini. Analisis ini dapat disimpulkan bahwa toxB keberadaannya benar-benar tinggi daam EHEC O157. Sebagai tambahan dalam analisis ini juga ditemukan O26 dan O127 juga ada dalam gene ini terutama untuk O26.

Hasil sequencing toxB pada EHEC O26 dan dibandingkan dengan toxB O157. memberikan hasil yang sangat tinggi persamaannya antara toxB pada EHEC O26

dan O 157 dengan sequence homolog 8704/9528 (91%) dan asam amino homolog 2850/3168 (89%).



Penelitian ini menggunakan primer

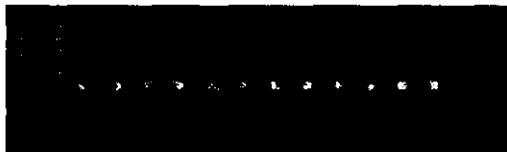
O157 : GTCATGGGCTGTCAGAAA . . . . .  
 CTCCGAGAGGTTATATCATGT  
 O26 : GTCATGGGCTGTTAGAAA . . . . .  
 CTCCGAGAGGTTATATCATGT

Hasil PCR dari bahan makanan dan spesimen menunjukkan semua strain O157 dan O26 sangat jelas terlihat seperti dalam gambar dibawah ini:

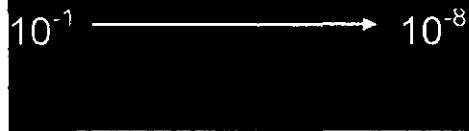
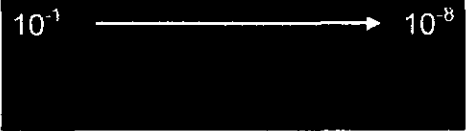
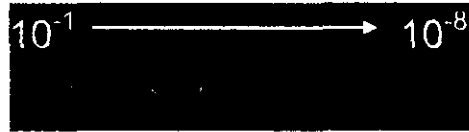
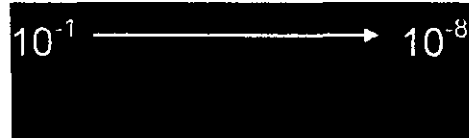
**Serotype O157 (total number 38):**



**Serotype O26 (total number 7):**



Hasil ini dapat disimpulkan bahwa PCR merupakan dasar pengembangan metode deteksi cepat dan tingkat spesifik kepekaannya terhadap *sxt gene Escherichia coli* O157:H7 pada bahan makanan dan spesimen. Untuk Pengembangan kedepan PCR ini bisa digunakan untuk mendeteksi *sxt gene* pada bahan makanan dan spesimen. Pada perbenihan dalam garam, kecambah, daging cincang dan hati didapatkan gambaran hasil PCR sebagai berikut :

**Saline :****O157****O26****Kecambah****O157****O26****Daging Cincang****O157****O26****Hati****O157****O26****Kontrol (+)    Kontrol (-)**EHEC culture O157 : ca.  $5.0 \times 10^8$  CFU/mlO26 : ca.  $7.0 \times 10^8$  CFU/ml

Sensitivitas dalam dilusi untuk daging cincang dan hati lebih tinggi daripada NaCl (saline) dan kecap putih ini menunjukkan sensitivitas untuk mendeteksi EHEC O26 rendah pada makanan, mungkin dikarenakan cara penyimpanan sampel makanan yang kurang baik sebaiknya untuk sampel disimpan dengan es untuk menghindari perkembangan EHEC.

Teknik PCR lebih peka dan spesifik bila digunakan pada perbenihan koloni bakteri yang dimurnikan. Sistem uji untuk mendeteksi O157-H7 dilakukan melalui pendekatan biologi molekuler. Teknik PCR terhadap O157-H7 memberi hasil positif pada sampel spesimen dan makanan yang mengandung *stx*. Prosedur pCR memiliki kepekaan sebesar  $10^4$ CFU per 0,1 g sampel yang telah dibiakan dalam enrichment broth.

Secara umum keberhasilan suatu pengujian tergantung pada ketrampilan laboratoris dan lama waktu penyidikan dan bukan pada diagnosis rutin laboratorium, tanpa sarana kultur jaringan dan antiserum netralisasi terhadap STEC O157-H7 yang tidak dapat diperoleh secara komersial. Sangat penting untuk menggunakan berbagai metode uji yang lengkap seperti uji serologik, kultur sel, uji genetik, uji virulensi ini secara berkesinambungan oleh laboratorium rujukan, sebab akan ditemukan varian-varian baru dengan perbedaan imunologis atau DNA. Metode PCR dapat dijadikan uji standar emas bagi metode yang lain. Dasar uji patokan ini adalah adanya toksin yang potensial yaitu verocytotoxin yang berefek terhadap sel vero, dengan menghasilkan efek spesifik sitotoksik.

Metode PCR untuk menentukan gen stx pada biakan *E. Coli O157-H7*. Penentuan pemakaian isolat sebagai wakil suatu sampel feses untuk mendeteksi adanya STEC *O157-H7* membutuhkan waktu lama. Hal ini disebabkan oleh fakta bahwa STEC *O157-H7* terdapat dalam jumlah rendah, pemilihan koloni untuk menemukan STEC *O157-H7* memerlukan ketelitian, pilihan harus dibiakkan dalam media cair dan preparasi DNA dan mengujinya rumit dan memerlukan kecermatan. Sebagai screening test yang cepat terhadap STEC *O157-H7* yang terdapat pada bahan makanan dan spesimen yang jumlahnya sedikit diharapkan memberi hasil positif dengan sistem ini.

Suatu pengujian yang ideal yang digunakan secara rutin untuk penyaringan terhadap spesimen harus memenuhi syarat: mudah penggunaannya, terdapat secara komersial dipasar, memberi hasil yang jelas dan akurat dalam waktu yang singkat, tidak tergantung pada kit dan supplier, dengan sifat sensitivitas dan spesifitas yang dapat membedakan gen STEC *O157-H7*. Tambahan lain adalah tenaga laboratorium dan harga kit yang dibutuhkan untuk test ini cukup murah. Harga juga ditentukan oleh frekuensi penggunaan uji ini dan kecepatan memperoleh hasil, serta sarana/prasarana laboratorium yang telah dimiliki. Laboratorium yang telah memiliki alat PCR untuk teknik penyaringan dan /atau fasilitas kultur jaringan yang biasa digunakan untuk tujuan deteksi penyakit lain dapat digunakan untuk tujuan deteksi *E.coli O157-H7*.

## **VI. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **KESIMPULAN**

1. Metode deteksi cepat terhadap STEC dapat menggunakan sistem multiplex PCR
2. Sistem ini berdasarkan teknik PCR, yang memungkinkan pendeteksian *E. coli* O157:H7 lebih cepat, spesifik, sah, dan sensitif.

### **SARAN**

1. Penelitian ini perlu dikembangkan protocol untuk strain E.Coli pathogen yang lain terhadap makanan dan lingkungan.
2. Sebaiknya penggunaan teknik PCR dikonfirmasi dengan metode diagnostik lain (uji biologis, uji sitotoksitas, uji serologis, metode genetik) untuk menghindari hasil yang salah.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bettelheim K. A and L. Beutin, 2003. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). *Journal of Applied Microbiology*. 95: 2: 205-217
- Bettelheim KA, 1996. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: a new problem, an old group of organisms. *Aust Vet J* 73:20-26
- Beutin L, Montenegro MA, Ørskov I, Ørskov F, Prada J, Zimmermann S, Stephan R, 1989. Close association of verocytotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 27:2559-2564
- Bettelheim KA, Beutin L, 2003. Rapid Laboratory Identification and Characterization of Verocytotoxigenic (Shiga toxin producing ) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). *J App Microbiol* 95:205-217
- Cermelli C, Fabio G, Casolari C, Quaglio P, 2002. Evaluation of a VERO cell toxicity test to detect EHEC infection. *Microbiologica* 25: 235-238
- Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, Tanaka M, Tobe T, Iida T, Takami H, Honda T, Sasakawa C, Ogasawara N, Yasunaga T, Kuhara S, Shiba T, Hattori M, Shinagawa H, 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* 8:11-22
- Nataro JP, Kaper JB, 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11:142-201
- O'Hanlon K.A, T.M.G. Catarama, G. Duffy, I.S. Blair and D.A. McDowell . 2004. RAPID detection and quantification of E. coli O157/O26/O111 in minced beef by real-time PCR.  
*J. of Environ. Microbiol.* 96: 1013-1023
- Zhu P, S. Li, C-M. Tang, D. Shelton. 2008. Sensitive and Rapid Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by Coupling of Immunomagnetic Separation with Fluorescence Immunoassay. *American Society for Microbiology*

