

**TESIS**

**PENCARIAN SUMBER DAN KARAKTERISTIK GEN SHIGA TOXIN  
DARI ISOLAT *Escherichia coli* O157:H7 PADA SUSU SEGAR**

**PENELITIAN EKSPLORATIF LABORATORIS**



**Oleh :**

**RAMA ARGE FRISMANA**

**NIM. 061214253018**

**PROGRAM STUDI MAGISTER  
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2014**

**PENCARIAN SUMBER DAN KARAKTERISTIK GEN SHIGA TOXIN  
DARI ISOLAT *Escherichia coli* O157:H7 PADA SUSU SEGAR**

**PENELITIAN EKSPLORATIF LABORATORIS**

**TESIS**

**Untuk memperoleh gelar Magister**

**Dalam Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner  
Pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga  
Surabaya**

**Oleh :**

**RAMA ARGE FRISMANA**

**NIM. 061214253018**

**PROGRAM STUDI MAGISTER  
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2014**

Tesis ini telah diuji dan dinilai pada

Tanggal 25 September 2014

**KOMITE PENGUJI USULAN PENELITIAN TESIS**

**Petua** : Dr Mustofa Helmi Effendi, DTAPH., drh

**Anggota** : 1. Dr Dadiék Rahardjo, M.Kes., drh

2. Dr Wiwik Misaco, M.Kes., drh

3. Dr. Kusnoto, MSi., drh

4. Dr. Iwan Sahrial Hamid, Msi., drh

**Surabaya, 25 September 2014**

**Fakultas Kedokteran Hewan**

**Universitas Airlangga**

**Dekan,**

**Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh.**

**NIP. 19531216 197806 2 001**

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas limpahan rahmat, luhur, serta anugerah yang begitu Maha Agung sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul **“Pencarian Sumber dan Karakteristik Gen *Stx2a* Toxin dari Isolat *Escherichia coli* O157:H7 pada susu segar”**.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah banyak membantu baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penyusunan tesis ini, antara lain:

Ibu Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof. Hj. Komariah Sidik, Ph.D., Drh. atas kasih sayang kepada penulis selama belajar di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Bapak Dr. Anwar Ma'ruf, M.Kes., Drh., selaku Wakil Dekan I, Prof. Dr. Sudji Sianto, M.Kes., Drh., selaku Wakil Dekan II, Dr. Suwarno, M.Si., Drh., selaku Wakil Dekan III, serta Ibu Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, M.Si., Drh., selaku Kepala Bagian Akademik atas bimbingannya kepada penulis selama menjalani pengabdian sebagai aktivis di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Bapak Dr. Kusnoto, M.Si., Drh selaku pembimbing utama dan Bapak Dr. Iwan Sahrial Hamid, M.Si., Drh., selaku pembimbing kedua atas segala saran, kritik serta kesabaran dalam membimbing penulis dari persiapan sampai akhir penelitian sehingga tujuan agar tesis ini terus bermanfaat dapat tertunaikan dengan baik.

Bapak Dr Mustofa Helmi Effendi, DTAPH., Drh., selaku ketua komisi penguji, Bapak Dr Dadiék Rahardjo, M.Kes., Drh., serta Ibu Dr Wiwik Misaco, M.Kes., Drh., selaku anggota penguji atas segala bimbingan, kritik, serta saran yang sangat bermanfaat dan banyak membantu penulis untuk menyempurnakan tesis ini.

Ibu Dr. Lucia Tri Suwanti, MP., Drh., selaku dosen wali sekaligus ketua program studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner yang selama ini banyak meluangkan waktu kepada penulis serta memberikan bimbingan dan dukungan untuk terus dapat berprestasi dan bermanfaat baik dalam prestasi akademik, non akademik maupun berorganisasi.

Seluruh bapak dan ibu dosen pengajar atas wawasan keilmuan serta pengalaman belajar selama penulis mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Bapak dan Ibu staff kependidikan, Bagian Kemahasiswaan, Bagian Akademik, Bagian Keuangan, Bagian Tata Usaha dan Kerumahtanggaan serta Bagian Sistem Informasi yang telah banyak membantu selama penulis belajar di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Ayahanda, Parwoto Frismana dan Ibunda, Kasinem Frismana yang telah memberikan dukungan, bimbingan, pengorbanan, serta kasih sayang bagi penulis dari kecil sampai saat ini yang tak terhingga dan senantiasa memberikan motivasi bagi penulis untuk terus bisa bermanfaat bagi sesama. Tak lupa juga kepada adik Zelina Frismana Putri, kakak Adin Eko Frismana, kakak Aprilya Citra dan wanita

hebat kedua saya Hemasayu Nirmala Putri serta sanak keluarga yang juga nyak memberikan dukungan bagi penulis.

Semua teman-teman angkatan 2008, alumni sejawat Dokter Hewan angkatan 151, para mahasiswa S2 IPKMV dan keluarga besar FKH Unair serta seluruh civitas akademika yang telah banyak memberikan dukungan kepada penulis.

Keluarga IMAKAHI yang senantiasa harmonis dalam kebhinnekaan untuk juaan memajukan kehidupan kampus veteriner yang selalu lebih baik dan menjadi yang terbaik.

Helmi Adhitya, Drh., M. Thohawi Elziyad M.Si, Drh., Herinda Pertiwi Drh., Bagus Syamsah Hattaka, Drh., Nanang Romadoni, S.Pd., MT., Faris Hamsyari Khozin, M.Si., Drh., Bagus Kurniawan, Drh., Dewi Candra, Drh., Dewi Marga, Drh., Bayu Andika, Drh., Bagus Jakadewa, Drh., Tartila Roshanbahar Drh., Amalia Widya, Drh., Dea Paramitha, Drh., yang telah banyak menginspirasi melalui dukungan moral yang telah kalian berikan.

Sahabat – sahabat kepompong Deo Prasetya, Nur Solikin, Handito Utama, Rizal Agung Kurnia, Eko Putra Akbar, Tri Rizki Saputra, Pandyo Agung, Bangkit Tito, Lita Novilia, Salwa Amaliyah, Ratih Tri Winarto yang telah memberikan dukungan dan semangat agar tesis ini dapat diselesaikan dengan baik dan terimakasih untuk para mantan yang pernah ada karena sakit hati yang kalian berikan membuat saya termotivasi untuk terus berprestasi.

Semua pihak yang tidak disebutkan tetapi sangat membantu dalam proses pelaksanaan penelitian dan penyusunan tesis ini.

Penulis juga menyadari bahwa masih terdapat kesalahan dan kekurangan pada tesis ini, untuk itu mohon kritik dan saran yang membangun demi perbaikan di masa mendatang. Semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan semua pihak yang membutuhkan demi kemajuan dan perkembangan ilmu pengetahuan di bidang kedokteran hewan serta meningkatkan kesehatan masyarakat veteriner di Indonesia.

Surabaya, 25 September 2014

Penulis

## RINGKASAN

### Pencarian Sumber dan Karakteristik Gen Shiga Toxin dari Isolat *Escherichia coli* O157:H7 pada susu segar

Susu segar merupakan cairan berwarna putih yang berasal dari ambing sapi yang sehat tanpa mengurangi atau menambah suatu komponen lain atau benda asing. Susu memiliki kandungan gizi dan pH yang disukai oleh bakteri, sehingga bakteri yang mengkontaminasi susu dapat tetap hidup dan berkembang di dalam susu.

Kontaminasi bakteri pada susu terjadi apabila penanganan susu di peternakan tidak higienis. Kontaminasi bisa berasal dari badan sapi yang kotor, pemerah yang tidak menjaga kebersihan badannya pada saat melakukan pemerahan, kandang yang kotor, serta pencucian dan penyimpanan peralatan pemerahan yang tidak baik.

Bakteri yang sering mencemari susu yaitu bakteri spesies *Escherichia coli*. Bakteri ini merupakan koliform fekal yang secara normal hidup di dalam usus besar dan kotoran manusia atau hewan.

Bakteri *Escherichia coli* tertentu dapat menghasilkan *shiga toxin*, misalnya *Escherichia coli* O157:H7. *Shiga toxin* tersebut merupakan antigenik yang dihasilkan. *Shiga toxin* disandi oleh gen spesifik yaitu gen *stx1* dan *stx2* yang mana bisa dideteksi secara molekular. Struktur antigenik *shiga toxin 1* (*stx1*), sifat antigenik serta daya toksisitasnya lebih kecil dari pada *Shiga toxin 2* (*stx2*). Hal ini menyebabkan *stx2* lebih mudah dikarakterisasi dari pada *stx1*. *Shiga toxin* ini sangat patogen yang merupakan penyebab utama *Haemorrhagic Colitis* (HC) serta sebagian besar kasus *Hemolytic Uremic Syndrom* (HUS) dan *Thrombocytopenic Purpura* (TPP) pada manusia.

Bakteri *Escherichia coli* O157:H7 yang dapat menghasilkan *shiga toxin* tersebut dapat ditemukan di sekitar lingkungan kita serta dapat juga ditemukan pada makanan dan minuman yang tercemar. Sumber munculnya bakteri *Escherichia coli* O157:H7 penyebab diare berdarah pada manusia perlu diketahui. Hal ini untuk melakukan pencegahan mewabahnya infeksi bakteri tersebut.

Pada penelitian ini bertujuan untuk mencari sumber munculnya bakteri *Escherichia coli* O157:H7 terutama pada susu segar yang akan dikonsumsi. Metode pencarian sumber tersebut dilakukan dengan cara mencari homologi antara bakteri *Escherichia coli* O157:H7 pada susu dengan bakteri *Escherichia coli* O157:H7 penyebab diare berdarah pada manusia. Dari 40 sampel yang diteliti terdapat 24 sampel yang positif terdapat bakteri *Escherichia coli*. Hasil ini didapatkan setelah dilakukan pembiakan sampel susu pada media EMBA yang kemudian dikonfirmasi dengan uji Indol. Setelah itu dilakukan pencarian karakterisasi dari gen *shiga toxin 2* dan *fliC<sub>H7</sub>* yang pada umumnya dimiliki oleh bakteri *Escherichia coli* O157:H7. Pencarian karakterisasi ini menggunakan metode M-PCR dan didapatkan hasil berupa 3 sampel positif terdapat *shiga toxin*



dan *fliC7* yang ditunjukkan dengan panjang *band* sebesar 779bp dan 625bp. Setelah itu dilakukan pencarian homologi untuk mempertegas hasil yang diperoleh dengan cara memasukan data sekuensing salah satu sampel pada software ClustalW2. Hasil tersebut menunjukkan adanya homologi dengan bakteri *Escherichica coli* O157:H7 penyebab diare berdarah pada manusia. Nilai dari uji homologi tersebut sebesar 91.86 untuk *Escherichica coli* O157:H7 dan 76.45 untuk *shiga toxin 2*.

Kesimpulan dari pengujian homologi tersebut yaitu susu segar merupakan salah satu sumber adanya bakteri *Escherichica coli* O157:H7. Oleh sebab itu maka sebelum mengkonsumsi susu hendaknya susu tersebut dimasak terlebih dahulu untuk mencegah terjadinya infeksi dari bakteri *Escherichica coli* O157:H7, karena infeksi bakteri tersebut dapat berakibat fatal bagi manusia.

## SUMMARY

### Searching Sources and Characteristic of *Shiga Toxin* Gene From The Isolate of *Escherichia coli* O157: H7 in Fresh Milk

Fresh milk is the white liquid that comes from a healthy udder without reduces future or adding other components or a foreign object. Milk has nutrients and pH is preferred by bacteria, so the bacteria that contaminate the milk can be kept alive and growing in the milk. Contamination occurs when bacteria in dairy farm handlers are not hygiene. Contamination come from a dirty cow, milker who do not maintain a healthy body at the time of milking, filthy cages, and washing and storing milking equipment that is not good enough.

The bacteria that often contaminate the milk are bacterial species *Escherichia coli*. Fecal coliform bacteria are normally lives in the colon and feces of humans or animals. *Escherichia coli* bacteria can produce *shiga toxin*, such as *Escherichia coli* O157: H7. Shiga toxin is antigenic produces. *Shiga toxin* is encoded by specific genes *stx1* and *stx2* genes that can only be detected by molecular method. Antigenic structure of shiga toxin 1 (*stx1*), antigenic properties and toxicity is smaller than the Shiga toxin 2 (*stx2*). This causes characterized *stx2* easier than *stx1*. The highly pathogenic *Shiga toxin* which is a major cause of Hemorrhagic Colitis (HC) as well as most cases of Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) and thrombocytopenic purpura (TPP) in humans.

Bacteria *Escherichica coli* O157: H7 that can produce *shiga toxin* can be found around our environment and also be found in contaminated food and drink. Sources emergence of bacteria *Escherichica coli* O157: H7 causes bloody liarrhea in humans needs to be known. It is for the prevention of the spread of bacterial infections.

The aims of this study to find the source of the emergence of bacterial *Escherichica coli* O157: H7, especially on fresh milk to be consumed. Searching for homology between bacterial *Escherichica coli* O157: H7 in milk with bacteria *Escherichica coli* O157: H7 causes bloody diarrhea in humans is the searching method. 40 samples studied contained 24 positive samples has *Escherichica coli* bacteria. These results were obtained after culturing milk samples on the media with the EMBA were later confirmed by Indol test. Once the search is to characterization of *shiga toxin 2* and *flich7* gene are generally owned by bacteria *Escherichica coli* O157: H7. Searching this characterization using M-PCR method and the results obtained 3 positive samples contained *shiga toxin 2* and *flich7* shown with long bands of 779bp and 625bp.

After homology search was performed to confirm the results obtained by means of entering sequencing data from one them sample on ClustalW2 software. These results showed a homology with bacterial *Escherichica coli* O157: H7 causes bloody diarrhea in human. The score of homology test is 91.86 for *Escherichica coli* O157: H7 and *shiga toxin* 76.45 for 2.

The conclusion of the homology testing the fresh milk is a source of bacteria *Escherichica coli* O157: H7. Therefore, the consumption of milk should be cooked first to prevent infection from bacteria *Escherichica coli* O157: H7, because the bacterial infection can be severe damage for human.

## SEARCHING SOURCES AND CHARACTERISTICS OF SHIGA TOXIN GENE FROM THE ISOLATE OF *ESHERICHIA COLI* O157: H7 IN FRESH MILK

Rama Arge Frismana

### ABSTRACT

Shiga toxin is a toxin produced by STEC bacteria, one of which is the bacterium *Escherichia coli* O157: H7. Shiga toxin is a toxin that can cause Haemorrhagic Colitis (HC) and Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) in humans. In this study explains the the sourcing and characteristics of shiga toxin genes isolates *Escherichia coli* O157: H7 on fresh milk taken at from milk can at the farm located in the Surabaya city. 40 samples of milk in the milk can there were 24 positive samples contained *Escherichia coli* that had been planted in the EMBA media and was confirmed by Indol test. 24 samples are then conducted confirmatory test by multiplex-PCR using a primer for the specific H7 and shiga toxin 2 gene, and then Multiplex-PCR results were obtained 3 samples showed the presence of the band stx2. Three of the test sample to look for nucleotide by sequencing method. After sequencing, we flooking for the homology of the sample using Bioedit software called ClustalW2, and obtained the results that have a kinship score of 91.86 *Escherichia coli* O157: H7 and 76.45 stx2. The conclusion of this study was that the milk taken from dairy farms in Surabaya city be found the bacteria *Escherichia coli* O157: H7 but does not cause HC and HUS in humans because stx2 produced is different.

**Keyword:** *Escherichia coli* O157:H7, shiga toxin, Multiplex-PCR, Sequencing

**DAFTAR ISI**

	Halaman
HALAMAN SAMPUL DALAM .....	ii
PERSYARAT GELAR .....	iii
PERNYATAAN .....	iv
Persetujuan .....	v
PENETAPAN PANITIA PENGUJI .....	vi
PICAPAN TERIMAKASI .....	vii
PINGKASAN .....	xi
SUMMARY .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
DAFTAR ISI .....	xvi
DAFTAR TABEL .....	xix
DAFTAR GAMBAR .....	xx
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG .....	xxi
Bab1 Pendahuluan .....	1
1.1 Latar belakang .....	1
1.2 Rumusan masalah .....	2
1.3 Tujuan penelitian .....	3
1.4 Manfaat penelitian .....	3
1.4.1 Manfaat teoritis .....	3
1.4.2 Manfaat praktis .....	3
Bab 2 Tinjauan Pustaka .....	4
2.1 Pengertian tentang susu .....	4
2.1.1 Komposisi susu .....	4
2.1.2 Kualitas susu .....	5
2.2 Sanitasi Susu .....	9

2.2.1 Kontaminasi pada susu .....	10
2.2.2 Penanganan susu hasil pemerahan .....	11
2.3 <i>Escherichia coli</i> .....	12
2.4 <i>Escherichia coli</i> O157:H7 .....	15
2.4.1 Sifat pemupukan <i>Escherichia coli</i> .....	16
2.4.2 Sifat biokimia <i>Escherichia coli</i> O157:H7 .....	16
2.4.3 Resistensi <i>Escherichia coli</i> O157:H7 .....	17
2.4.4 Patogenitas <i>Escherichia coli</i> O157:H7 .....	18
2.4.5 Transmisi ke Manusia .....	19
2.5 <i>Shiga Toxin</i> .....	20
2.5.1 Perkembangan <i>shiga toxin</i> .....	21
2.5.2 Struktur dan aktivasi <i>shiga toxin</i> .....	22
2.6 <i>Multiplex Polymerase Chain Reaction</i> .....	24
2.6.1 Tahapan PCR .....	25
2.6.1.1 Denaturasi .....	25
2.6.1.2 Anneling .....	25
2.6.1.3 Reaksi polimerisasi .....	25
2.6.2 Komponen PCR .....	26
2.6.2.1 Enzym DNA <i>polymerase</i> .....	26
2.6.2.2 Primer .....	26
2.6.2.3 Reagen Lainnya .....	27
BAB 3 Kerangka Konseptual .....	28
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian .....	28
BAB 4 Materi dan Metode .....	31
4.1 Jenis dan Rencana Penelitian .....	31
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	31
4.3 Definisi Operational varabel .....	31
4.4 Materi Penelitian .....	32
4.4.1 Bahan penelitian .....	32
4.4.2 Alat penelitian .....	32
4.5 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data .....	33
4.5.1 Pengambilan sampel .....	33
4.5.2 Identifikasi <i>Escherichia coli</i> .....	33
4.5.3 Ekstraksi DNA .....	34
4.5.4 Amplifikasi dengan <i>Multiplex Polymerase Chain Reaction</i> ....	34
4.5.5 Elektroforesis .....	35

4.6 Sekuensing DNA .....	35
4.7. Anlalisis Data .....	36
4.8 Kerangka Operational .....	37
AB5 Hasil Penelitian .....	38
5.1 Hasil Identifikasi <i>Escherichia coli</i> .....	38
5.2 Hasil Elektroforesis Produk Multiplex PCR .....	40
5.3 Hasil Analisa Homologi Bakteri .....	40
AB6 Pembahasan .....	43
6.1 Identifikasi <i>Escherichia coli</i> .....	43
6.2 Hasil Karakterisasi Gen <i>Shiga toxin 2</i> dengan M-PCR .....	45
6.3 Hasil Sekuensing dan Homologi <i>Escherichia coli</i> pada Isolat Susu.....	46
AB7 Kesimpulan dan Saran .....	48
7.1 Kesimpulan .....	48
7.2 Saran .....	49
DAFTAR PUSTAKA .....	50
Lampiran .....	54

**DAFTAR TABEL**

Label	Halaman
2.1 Batas Maksimum Cemaran Mikroba BMCM pada Susu Segar Menurut SNI 7388: 2009 .....	6
3.1 Primer Yang Digunakan Dalam Penelitian .....	35
5.1 Hasil Analisis Bioedit dengan Menggunakan <i>ClustalW2</i> .....	41



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Morfologi <i>Escherichia coli</i> .....	12
2.2 Food Borne Disease <i>Escherichia coli</i> O157:H7 .....	20
3.1 Alur Kerangka Konseptual .....	35
4.1 Bagan Kerangka Operational Penelitian .....	37
5.1 Media BGGB berwarna hijau keruh dan terdapat gas .....	38
5.2 Media EMBA yang ditumbuhi <i>Escherichia coli</i> .....	39
5.3 Uji Indo piritif pada <i>pepton water</i> 1% .....	39
5.4 Hasil Elektroforesis DNA sampel isolat <i>Escherichia coli</i> .....	40

## SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

A	: Adenine
AE	: Attaching and Effeching
3GBB	: Brilliant Green Bile Broth
3p	: base pair
C	: Cytosine
DNA	: Deoxyribonucleic Acidl
dNTP	: deoxynucleotide Triphosphate
EAEC	: Enteroagregative Escherchia coli
ED	: Edema Disease
EHEC	: Enterohemoragic Escherchia coli
EIEC	: Enteroinvasive Escherchia coli
EMBA	: Eosin Methyl Blue Agar
EPEC	: Enteropathogenic Escherchia coli
ETEC	: Enterotoxigenic Escherchia coli
EspA	: Enterococcal Surface Protein A
EspB	: Enterococcal Surface Protein B
<i>flicH7</i>	: Flagellar H7
G	: Guanine
HC	: Hemoragic Colitis
HUS	: Memolytic Uremic Syndrome
Hly	: Hemolysin
kDa	: kilo Dalton
LEE	: Locus of Enterocyte Effacement
m <sup>2</sup>	: meter persegi
MBRT	: Methylene Blue Reductase Test
Mg	: Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	: Magnesium Klorida
ml	: mili liter
mg	: mili gram
mm	: mili meter
MPN	: Most Probable Number
NA	: Nutrient Agar
NaOH	: Natrium Hidroksida
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pH	: Power of Hydrogen
SNI	: Standar Nasional Indonesia
T	: Thymine
TPP	: <i>Trhombochipenia Purpura</i>
TPC	: Total Plate Count
UV	: Ultra Violet
Stx 1	: Shiga Toxin 1
Stx2	: Shiga Toxin 2
α	: alfa

β	: beta
μl	: micro liter
μm	: mikro meter
C	: derajat Celcius
=	: kurang lebih
%	: persen
>	: lebih dari
<	: kurang dari

# **BAB 1**

# **PENDAHULUAN**

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Escherichia coli* merupakan bakteri yang secara normal dapat tumbuh pada saluran pencernaan manusia dan hewan. Bakteri ini merupakan bakteri *environment contaminant* yaitu bakteri cemaran lingkungan. Bakteri *Escherichia coli* merupakan salah satu patogen yang sangat penting karena dapat mengakibatkan infeksi yang berakibat fatal khususnya pada anak-anak. Salah satu bakteri *Escherichia coli* yang penting adalah *Escherichia coli* O157:H7 karena dapat menghasilkan toksin yang berbahaya. Toksin yang dihasilkan sering disebut dengan nama *Shiga toxin*. Toksin yang dihasilkan oleh bakteri *Escherichia coli* O157:H7 terdapat dua jenis, yaitu *shiga toxin 1 (stx 1)* dan *shiga toxin 2 (stx 2)*. *Shiga toxin 2* lebih antigenik daripada *shiga toxin 1*, oleh sebab itu *shiga toxin 2* lebih mudah untuk diisolasi karena jumlah yang dihasilkan lebih banyak. Salah satu cara untuk mengkarakterisasi *shiga toxin* tersebut adalah dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (Brenjchi *et al*, 2011)

Bakteri *Escherichia coli* O157:H7 termasuk kedalam kelompok bakteri *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC). Bakteri EHEC adalah penyebab berbagai jenis diare ringan sampai nyeri abdomen berat dengan *colitis haemorrhagic*. *Escherichia coli* *Enterohemorrhagic* termasuk kedalam *food borne disease* dan *water borne disease*. *Shiga toxin* yang dihasilkan merupakan penyebab utama *Haemorrhagic Colitis* (HC) serta sebagian besar kasus *Hemolytic Uremic Syndrome* (HUS) dan *Thrombocytopenic Purpura* (TPP) pada manusia. Bakteri *Escherichia coli* O157:H7 dapat ditemukan pada saluran pencernaan

ewan dan pada manusia yang mengalami gejala diare. Bakteri ini juga dapat ditemukan pada lingkungan disekitar kita yang kotor bahkan dapat ditemukan pada air, susu dan daging yang terkontaminasi oleh feses.

Pentingnya pencarian sumber *Escherichia coli* O157:H7 perlu dilakukan untuk mengetahui bakteri tersebut berasal. Salah satu sumber terjadinya infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* O157:H7 berasal dari susu yang terkontaminasi. Jika sumber adanya bakteri *Escherichia coli* O157:H7 pada manusia diketahui, maka pencegahan terjadinya wabah penyakit HC, HUS dan TPP dapat dicegah lebih awal. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui sumber dari bakteri tersebut berasal. Mengetahui homologi dari bakteri *Escherichia coli* O157:H7 yang merupakan penyebab terjadinya penyakit pada manusia dengan *Escherichia coli* O157:H7 yang terdapat pada susu terkontaminasi perlu dilakukan yang nantinya akan dikaitkan dengan sumber bakteri tersebut berasal. Untuk mengetahui homologi tersebut bisa dilakukan dengan mencari sekuensing DNA dari bakteri *Escherichia coli* O157:H7 yang berasal dari susu segar.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah

- 1) Bagaimana hasil isolasi bakteri *Escherichia coli* pada sampel susu yang diambil pada *milk can* pada beberapa peternakan di Surabaya.
- 2) Bagaimana hasil karakterisasi *shiga toxin 2* pada *Escherichia coli* O157:H7 dari isolat susu segar dengan menggunakan teknik PCR.

- 3) Bagaimana homologi antara bakteri *Escherichia coli* O157:H7 yang menyebabkan *hemoragic colitis* pada manusia dengan *Escherichia coli* O157:H7 pada isolat susu segar dengan metode sekuensing.

### **.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah

- 1) Untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri *Escherichia coli* dan bakteri *Escherichia coli* O157:H7 yang berasal dari sampel susu.
- 2) Untuk mengkarakterisasi gen penyandi *shiga toxin 2* dari *Escherichia coli* O157:H7.
- 3) Untuk mengetahui homologi bakteri *Escherichia coli* O157:H7 yang menyebabkan *hemoragic colitis* pada manusia dengan bakteri *Escherichia coli* O157:H7 pada isolate susu segar.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat teoritis**

Secara teoritis, hasil dari penelitian ini dapat menambah pengetahuan mengenai *shiga toxin 2* pada *Escherichia coli* O157:H7 dan dapat memberikan informasi tentang adanya homologi antara *Escherichia coli* O157:H7 yang menyebabkan *hemoragic colitis* pada manusia dengan bakteri *Escherichia coli* O157:H7 pada isolat susu segar.

### **1.4.2 Manfaat praktis**

Secara praktis, hasil dari penelitian ini diharapkan dapat mencegah diare berdarah pada manusia yang diakibatkan dari susu yang terkontaminasi bakteri *Escherichia coli* O157:H7.

## **BAB 2**

# TINJAUAN PUSTAKA



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Pengertian Tentang Susu Sapi

Menurut Keputusan Direktorat Jenderal Peternakan melalui SK No. 17/Kpts/DJP/Deptan/83, susu adalah susu sapi yang meliputi susu murni, susu segar, susu pasteurisasi, dan susu sterilisasi. Susu merupakan cairan berwarna putih yang disekresi oleh ambing yang merupakan hasil utama pada usaha budidaya ternak perah dan digunakan untuk bahan makanan serta sumber gizi (Deptan RI, 1983).

Susu murni adalah cairan yang berasal dari ambing sapi sehat dan bersih, yang diperoleh dengan cara pemerahan yang benar dan kandungan alaminya tidak dikurangi atau ditambah sesuatu apapun dan belum mendapat perlakuan apapun. Susu segar adalah susu murni yang tidak mendapat perlakuan apapun kecuali proses pendinginan tanpa mempengaruhi kemurniannya (BSN, 1998).

#### 2.1.1 Komposisi susu

Komposisi susu normal mengandung air sebesar 87,6 % dan bahan kering 12,4 % yang terdiri dari protein 3,3 %, lemak 3,8 %, karbohidrat 4,7 %, serta vitamin dan mineral 0,7 % (Purnomo dan Adiono, 1997). Menurut Keputusan Direktorat Jenderal Peternakan melalui SK No. 17/Kpts/DJP/Deptan/83, susu segar harus memenuhi persyaratan berat jenis susu 1,028 dan *Methylene Blue Reduktase Test* (MBRT) antara 2-5 jam (Deptan RI, 1983).

Susu mengandung empat macam protein yaitu kasein,  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin, dan immunoglobulin. Kasein penyusun 80% protein di dalam susu.

Makanan sehari-hari umumnya sedikit mengandung vitamin A serta B12 dan susu dapat menjadi pemenuh kebutuhan sehari-hari. Lemak susu mengandung keistimewaan karena terdiri dari lemak rantai pendek (C2-C4) dan rantai sedang (sampai atom C14) yaitu sekitar 70% dari total lemak susu. Semakin pendek rantai lemak susu, maka semakin mudah untuk dicerna oleh tubuh. Susu juga mengandung kolesterol yang sedikit sekitar 11 mg/ 100 g susu (Marlina dkk., 2007).

### **2.1.2 Kualitas susu**

Kualitas susu sangat penting untuk diperhatikan dalam rangka penyediaan susu sehat untuk konsumen dan hasil olahannya. Diperlukan suatu peraturan yang mengatur batas maksimum cemaran mikroba untuk menjamin konsumen mendapatkan susu berkualitas baik (Marlina dkk., 2007). Sekarang di Indonesia peraturan tersebut mengacu kepada SNI 7388:2009 yang mengatur persyaratan jumlah total bakteri yang boleh ada dalam susu segar adalah  $1 \times 10^6$  koloni/ml (Tabel 2.1). Disamping itu, ada beberapa persyaratan yang harus dipenuhi berkenaan dengan pencemaran beberapa jenis bakteri patogen (Badan Standarisasi Nasional, 2009).

**Label 2.1** Batas Maksimum Cemaran Mikroba (BMCM) pada Susu Segar Menurut SNI 7388:2009.

No	Jenis Cemaran Mikroba	BMCM
1	TPC (30°C, 72 jam)	$1 \times 10^6$ koloni/ml
2	Koliform	$2 \times 10^1$ koloni/ml
3	MPN <i>Escherichia coli</i>	< 3/ml
4	<i>Salmonella sp.</i>	negatif/25ml
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	$1 \times 10^2$ koloni/ml

Keterangan: Sumber BSN (2009). TPC: *Total Plate Count*, MPN: *Most Probable Number*.

Faktor-faktor yang harus diperhatikan untuk memperoleh susu yang berkualitas baik antara lain adalah kesehatan dan kebersihan sapi perah, kesehatan dan kebersihan kandang, kebersihan alat-alat pemerah, kesehatan dan kebersihan pemerah serta penyimpanan dan pengangkutan (Hadiwiyoto, 1994).

Sapi perah yang dapat dimanfaatkan susunya untuk konsumsi manusia sebaiknya memenuhi persyaratan yang diatur dalam Surat Keputusan Menteri Pertanian No. 69/Kpts/TN.120/1/1995 yaitu sapi perah tidak menderita atau diduga menderita penyakit zoonosis antara lain *salmonellosis*, *tuberculosiss*, *brucellosis*, penyakit mulut dan kuku, mastitis, endometritis, enteritis disertai diare hebat, luka-luka pada ambing disertai nanah/cairan. Sapi juga tidak boleh sedang dalam pengobatan antibiotika, hormon, dan farmasetik lainnya sampai selesai waktu henti obat dari obat tersebut yaitu waktu yang dihitung sejak saat pengobatan terakhir sampai saat hasil produksi ternak dapat dipergunakan untuk konsumsi (Deptan RI, 1995).

Usaha pertama yang paling penting adalah merawat kesehatan dan kebersihan sapi perah. Sapi yang tidak sehat dan tidak bersih pada waktu diperah

ikan menghasilkan susu yang mempunyai kandungan bakteri dalam jumlah banyak, terutama kesehatan dan kebersihan ambing harus benar-benar diperhatikan. Biasanya ambing yang tidak sehat menyebabkan susu banyak mengandung *Streptococcus* dan *Corynebacterium*. Ambing yang kotor menyebabkan susu banyak mengandung bakteri *Escherichia coli*. Setiap hari sapi perah dimandikan dan dicuci sampai bebas dari kotoran hewan dan sisa pakan yang menempel pada tubuhnya. Keadaan tubuh sapi harus bersih setiap kali akan diperah susunya (Hadiwiyoto, 1994).

Jumlah bakteri dalam susu dapat naik dengan cepat jika kandang hewan tidak bersih dan tidak sehat. Kandang yang kotor dapat menyebabkan banyak kontaminasi, baik bakteri maupun benda lain seperti debu, pasir, bulu, dll (Hadiwiyoto, 1994). Berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian No. 69/Kpts/TN.120/1/1995, syarat kandang untuk usaha peternakan sapi perah antara lain: Bersifat permanen dan atau semi permanen, berlantai beton atau kayu yang tidak licin, lantai miring ke arah saluran pembuangan, dan mudah dibersihkan, lantai kandang mempunyai ukuran sekurang-kurangnya 2x1,5 m<sup>2</sup> untuk setiap ekor sapi dewasa, tidak termasuk jalur jalan dan selokan, ventilasi dan pertukaran udara di dalam kandang menjamin bahwa udara segar dapat masuk leluasa ke dalam kandang dan sebaliknya udara kotor harus dapat keluar dari kandang, jumlah ternak yang dipelihara harus disesuaikan dengan luas lantai kandang yang ada, limbah atau air buangan dari kandang harus ditampung pada tempat khusus (Deptan, 1995).

Kontaminasi sering disebabkan karena peralatan pada waktu pemerahan, wadah susu, dan air pencuci alat yang kotor atau tidak terjaga kebersihannya. Pekerjaan sanitasi terhadap alat-alat dan wadah dapat dikerjakan dengan membersihkannya menggunakan air panas dengan suhu minimal 75°C dalam waktu paling sedikit 5 menit (Hadiwiyoto, 1994). Sanitasi alat dan wadah juga dapat dilakukan dengan bahan-bahan kimia, misalnya caustic soda (NaOH) sebanyak  $\pm 1/3$  kilogram yang dilarutkan dalam 1 galon ( $\pm 4$  liter) air. Kemudian dari larutan induk ini dibuat larutan 10% untuk membersihkan alat-alat tersebut (Rachmawan, 2001).

Pemerah merupakan orang yang pekerjaannya berhubungan langsung dengan pemeliharaan ternak perah dan produksi susu sehingga seorang pemerah harus berbadan sehat, berpakaian bersih, diperiksa kesehatannya secara berkala oleh Dinas Kesehatan Setempat, tidak berbuat hal-hal yang dapat mencemari susu, tidak mempunyai luka terbuka, dan tidak menderita penyakit kulit atau penyakit menular lainnya. Status kesehatan pemerah harus dinyatakan dengan Surat Keterangan Dokter yang diperbaharui setiap tahun (Deptan RI, 1995).

Susu segar mempunyai suhu penyimpanan terbaik pada 3-4°C. Suhu penyimpanan di bawah 1°C dapat mengakibatkan emulsi susu pecah sehingga lemaknya terpisah atau terjadi denaturasi susu yang menyebabkan penggumpalan (Hadiwiyoto, 1994).

Pengangkutan susu harus dilakukan dalam kendaraan pengangkut susu berinsulasi untuk mempertahankan susu tetap 3-4°C sampai di tempat tujuan. Jika

susu dalam milk can, maka harus diangkut dalam keadaan tertutup dan tidak boleh lebih dari dua jam (Deptan RI, 1995).

## 2.2 Sanitasi Susu

Sanitasi adalah semua upaya yang dilakukan dalam rangka memelihara dan meningkatkan derajat kesehatan dan keamanan, melalui kegiatan kebersihan dan faktor-faktor lingkungan yang dapat menimbulkan gangguan penyakit (Depkes RI, 1998). Sanitasi susu adalah usaha kesehatan masyarakat untuk memelihara mutu susu di dalam setiap tahap pengolahan susu untuk tidak merugikan masyarakat (Kusnoputranto, 1996).

Pokok terpenting dari sanitasi susu yaitu susu harus aman untuk kesehatan masyarakat dan susu harus bersih. Aspek yang juga sangat penting dari sanitasi susu adalah pencegahan infeksi melalui susu. Hal ini tidak hanya dalam rangka pencegahan *milk borne disease*, tetapi juga memperkuat kepercayaan masyarakat terhadap susu. Pengawasan susu sapi ditujukan pada proses produksi susu mulai dari pemerahan susu sampai pada hasil susu yang siap dikonsumsi (Kusnoputranto, 1996).

Susu sapi merupakan bahan makanan yang baik untuk manusia dan juga untuk bakteri. Bakteri yang mengkontaminasi susu dalam waktu singkat akan berkembang biak mencapai jumlah yang banyak sehingga jumlah kasus infeksi dengan perantara susu cukup banyak, selain manusia juga memiliki daya resisten yang rendah. Upaya sanitasi terhadap susu merupakan salah satu upaya kesehatan lingkungan yang sangat penting (Chandra, 2006).

### 2.2.1 Kontaminasi pada susu

Pada saat susu meninggalkan puting sapi yang sehat, susu tersebut mengandung beberapa bakteri yang tertahan dari pembuluh susu dan tempat cadangan air. Selama proses pemerahan susu, bakteri biasanya bertambah dari berbagai sumber (Lukman dan Isroin, 1986). Bakteri dalam susu akan meningkat jumlahnya disebabkan oleh beberapa faktor yaitu kulit sapi, pemerah, alat pemerah, kandang dan air yang digunakan

Kulit dan bulu sapi yang kotor akan menunjang peningkatan jumlah bakteri dalam susu. Kotoran yang terkandung dalam kulit ternak umumnya terdiri dari kotoran sapi, debu, dan partikel tanah (Lukman dan Isroin, 1986). Pada saat pemerah susu, pemerah harus menjaga kebersihan pakaian dan badan. Pemerah harus sehat dan tidak mempunyai luka serta mempunyai pengetahuan tentang higienis dan sanitasi untuk mencegah terjadinya kontaminasi selama pemerahan.

Alat-alat untuk pemerah yang digunakan harus bersih dan steril. Jika dalam alat pemerah terdapat residu susu, ini akan menyebabkan pertumbuhan bakteri pada peralatan. Alat pemerah juga harus disimpan secara baik dan diusahakan jangan sampai ada kotoran atau debu yang menempel pada alat (Lukman dan Isroin, 1986).

Kandang yang dibuat harus memenuhi syarat-syarat tertentu, antara lain: drainase dan ventilasi baik, lantai tidak licin, lantai miring, ada penampungan kotoran, dan ukuran kandang minimal 1,5 x 2,5 m<sup>2</sup>/ekor (Lukman dan Isroin, 1986). Air harus tersedia dalam jumlah cukup, jernih, dan bebas dari mikroorganisme. Air yang digunakan harus memenuhi standar fisik, kimia,

bakteriologis, dan radiologis. Air yang tidak memenuhi syarat di atas dapat mengakibatkan kontaminasi pada puting dan ambing sehingga menyebabkan kontaminasi pada air susu (Lukman dan Isroin, 1986).

### **2.2.2 Penanganan susu hasil pemerahan**

Susu hasil pemerahan diusahakan secepatnya mendapatkan penanganan agar tidak menurunkan mutu susu (Sumoprastowo dan Zein, 1990). Langkah pertama penanganan susu sesudah pemerahan adalah susu hasil pemerahan harus segera dikeluarkan dari kandang untuk menjaga susu tersebut tidak berbau sapi atau kandang. Keadaan ini penting terutama jika keadaan ventilasi kandang tidak baik. Susu tersebut kemudian harus disaring dengan saringan yang terbuat dari kapas atau kain penyaring dan ditampung dengan *milk can*. *Milk can* tersebut harus ditutup rapat segera setelah penyaringan. Kain penyaring harus dicuci bersih dan direbus, kemudian dijemur. Kain sebaiknya disetrika terlebih dahulu, jika kain penyaring tersebut hendak dipakai.

Susu perlu didinginkan secepat mungkin sesudah diperah dan disaring sekurang-kurangnya pada suhu 4°C sampai 7°C selama 2 atau 3 jam. Hal ini dilakukan untuk mencegah perkembangbiakan bakteri di dalam susu. Pendinginan dapat dilakukan dengan memakai balok es yaitu dengan memasukkan susu ke dalam bak yang berisi es balok dan ditutup rapat, apabila tidak memiliki alat pendingin (Sumoprastowo dan Zein, 1990).



### 2.3. *Escherichia coli*

Klasifikasi *Escherichia coli* adalah sebagai berikut (Vogt and Dippold, 2005)

- Kingdom : Plantae
- Filum : Thallophyta
- Klas : Schizomycetes
- Ordo : Eubacteriales
- Family : Eubacteriaceae
- Genus : *Escherichia*
- Spesies : *Escherichia coli*

Morfologi *Escherichia coli* berbentuk batang pendek, berukuran 0.5 x 1.0 – 3.0  $\mu\text{m}$ , dan tidak membentuk spora. Bakteri ini merupakan gram negatif dan fakultatif anaerob (Vogt and Dippold, 2005). Kedudukan satu sama lain umumnya sendiri-sendiri, tetapi dapat pula berpasangan atau rantai pendek. Sebagian besar motil karena mempunyai *flagella* dan ada yang tidak motil. Morfologi bakteri tersebut terlihat pada Gambar 2.1



**Gambar 2.1** Morfologi *Escherichia coli*. Sumber: Falkenstein (2010).

*Escherichia coli* mudah ditumbuhkan pada berbagai media perbenihan di laboratorium. Suhu optimal pertumbuhan bakteri tersebut yaitu pada 37,5°C

dengan pH 7 (Pelczar and Chan, 1988). Media padat yang sering digunakan adalah *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA). Media EMBA merupakan media selektif untuk pertumbuhan koloni bakteri *Escherichia coli*. Pada media ini bakteri *Escherichia coli* akan membentuk koloni hijau metalik dengan pusat koloni berwarna kehitaman dalam waktu 24-48 jam pada suhu 37°C (Iman dkk, 2003).

Pada media padat agar darah, *Escherichia coli* membentuk koloni bulat, licin, tidak berwarna, tepi rata dan konsistensi seperti mentega (Iman, 2006). Bakteri *Escherichia coli* yang memproduksi  $\alpha$ -hemolisin akan membentuk zona terang di sekitar koloni,  $\beta$ -hemolisin akan terlihat zona agak gelap di sekitar koloni dan kuman yang memproduksi kombinasi  $\alpha$  dan  $\beta$ -hemolisin akan tampak zona gelap dan terang di sekitar koloni (Pelczar and Chan, 1988).

Sebagian besar strain *Escherichia coli* memfermentasikan laktosa secara cepat pada media McConkey Agar yang ditunjukkan dengan koloni berwarna merah, halus, dan mengkilap (Mccurnin and Bassert, 2006).

*Escherichia coli* pertama kali dijelaskan oleh Dr. Theodor Escherich pada tahun 1885. Pada mulanya mikroba ini tidak dianggap sebagai organisme patogen karena bakteri ini ditemukan sebagai flora normal dalam usus manusia dan hewan berdarah panas, serta memainkan peranan yang penting dalam menjaga keadaan fisiologis usus. Tetapi, pada sekitar tahun 1940-an ditemukan bahwa bakteri ini dapat menyebabkan diare yang pada umumnya disebabkan oleh pengkonsumsian air dan makanan yang tercemar. Karena itulah, bakteri ini kemudian dinilai sebagai bakteri penting dalam bahan pangan karena dapat ditularkan melalui makanan (Nurairlyasti, 1999).

membentuk koloni pada saluran pencernaan sehingga mengakibatkan terjadinya atrofi dari mikrofil sel-sel epitel usus (Widyastika, 2008).

Bakteri EAEC adalah penyebab diare berlendir pada anak-anak. Faktor virulensi dari EAEC adalah menempel pada sel usus mamalia dan memproduksi sitotoksin (Widyastika, 2008).

Bakteri EIEC adalah penyebab diare yang sangat mirip dengan diare shigellosis berupa diare berair atau disentri. Faktor virulensi dari EIEC adalah melekat dan menginvasi epitel usus (Widyastika, 2008).

#### **2.4 *Escherichia coli* O157:H7**

*Escherichia coli* O157:H7 pertama kali diidentifikasi sebagai bakteri patogen pada tahun 1982. Sebelum tahun 1982, *Escherichia coli* O157:H7 hanya pernah diidentifikasi di Amerika Serikat oleh Pusat Kontrol Penyakit Amerika pada tahun 1975 dari seorang pasien yang menderita kejang perut yang parah diikuti dengan diare berdarah. Setelah itu, dari tahun 1978 sampai 1982 telah ditemukan 6 isolat sitotoksik yang semuanya diisolasi dari penderita diare. Tetapi, karena keterbatasan data-data dan informasi mengenai bakteri ini, maka belum dapat disimpulkan dari kejadian-kejadian tersebut bahwa *Escherichia coli* O157:H7 merupakan penyebab utama penyakit enterik. Baru pada tahun 1982, menyusul dua kejadian besar (outbreak) di Michigan dan Oregon, para ahli mikrobiologi benar-benar menghubungkan *Escherichia coli* O157:H7 dengan HC (Nurairlyasti, 1999)

*Escherichia coli* O157:H7 memiliki kemampuan menghasilkan *shiga toxin* seperti bakteri EHEC lainnya. *Shiga toxin* ini merupakan penyebab utama

*Haemorrhagic Colitis* (HC) serta sebagian besar kasus *Hemolytic Uremic Syndrome* (HUS) dan *Thrombocytopenic Purpura* (TPP) pada manusia

#### 2.4.1 Sifat pemupukan

Sel *Escherichia coli* dapat tumbuh dengan baik pada basal media, misalnya *Nutrient Agar* (NA) dengan waktu inkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Pada NA, *Escherichia coli* secara spesifik berbentuk koloni licin, tidak berwarna, bulat, dan agak cembung dengan diameter 1-3mm (Singleton and Salasbury, 1980)

Studi pertumbuhan *Escherichia coli* dalam medium Trypticase soy broth menunjukkan bahwa bakteri ini tumbuh secara cepat pada suhu antara 30°C sampai 42°C. Organisme ini tidak tumbuh dengan baik pada suhu 44-45°C dan tidak tumbuh sama sekali pada suhu 45,5°C dalam waktu 48 jam (Doyle and Schoeni, 1984).

#### 2.4.2 Sifat biokimia *Escherichia coli* O157:H7

*Escherichia coli* O157:H7 memiliki reaksi biokimia seperti *Escherichia coli* pada umumnya, dengan pengecualian yaitu *Escherichia coli* O157:H7 tidak memfermentasi sorbitol (sorbitol negatif) seperti 95% *Escherichia coli* lainnya yang dapat memfermentasi sorbitol dalam waktu 24 jam (Riley *et al.*, 1983). Selain itu, *Escherichia coli* O157:H7 juga tidak mempunyai kemampuan untuk mengubah substrat *4-metilumbeliferil-β-D-glukoronida* menjadi produk yang berfluoresens yang menunjukkan bahwa *Escherichia coli* O157:H7 tidak memiliki enzim β-glukoronidase seperti 96% *Escherichia coli* lainnya. Dengan karakteristik

seperti di atas, maka uji identifikasi *Escherichia coli* O157:H7 sedikit berbeda dengan *Escherichia coli* lainnya. Uji biokimia yang umum dilakukan untuk identifikasi *Escherichia coli* O157:H7 adalah uji koliform ditambah dengan uji fermentasi sorbitol yang umumnya menggunakan media *Mac Conkey Agar* ditambah sorbitol dan uji enzim  $\beta$ -glukoronidase (Doyle and Schoeni, 1984).

#### 2.4.3 Resistensi *Escherichia coli* O157:H7

Bakteri *Escherichia coli* O157:H7 mempunyai ketahanan yang cukup tinggi terhadap suhu pembekuan, seperti yang dilaporkan oleh Doyle dan Schoeni (1984) bahwa daging giling yang telah diinokulasi dengan *Escherichia coli* O157:H7 kemudian dibekukan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  dan setelah itu disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ , jumlahnya tidak berkurang setelah disimpan selama 9 bulan. Hal ini memperkuat bukti ditemukannya bakteri ini pada stok hamburger beku yang diimplikasikan dalam kasus keracunan pertama yang terjadi di Michigan pada tahun 1982.

Selain tahan terhadap suhu rendah, *Escherichia coli* O157:H7 mempunyai toleransi yang unik terhadap lingkungan asam. Studi inokulasi telah melaporkan bahwa bakteri ini dapat hidup pada asam sitrat, asam asetat, dan asam laktat pada konsentrasi 1,5% menunjukkan bahwa populasi *Escherichia coli* O157:H7 tidak banyak dipengaruhi oleh perlakuan-perlakuan tersebut. *Escherichia coli* O157:H7 yang diinokulasikan dalam jumlah tinggi dapat bertahan pada Mayonnaise (pH 3.6-3.9) dan pada *Apple cider vinegar* (pH 3.6-4.0). Ketahanan terhadap kondisi asam memungkinkan *Escherichia coli* O157:H7 untuk dapat menyebabkan infeksi

pada saluran gastrointestinal manusia karena bakteri ini dapat melewati lingkungan asam dari lambung (Law, 2000).

#### 2.4.4 Patogenitas *Escherichia coli* O157:H7

*Escherichia coli* O157:H7 merupakan patogen yang sangat penting karena dapat menyebabkan infeksi yang dapat berakibat fatal khususnya pada anak-anak. Dosis infeksi yang dapat menimbulkan sakit sangat rendah yaitu antara 10-100 sel. Patogenisitas *Escherichia coli* O157:H7 berhubungan dengan *shiga toxin* yang dihasilkan. Mekanisme patogenisitas strain ini melibatkan proses penempelan dan kolonisasi pada saluran pencernaan dan produksi toxin yang sangat kuat yang terjadi di usus besar (Andriani, 2005). Sebagai bakteri yang bersifat patogen, *Escherichia coli* O157:H7 memiliki beberapa faktor virulen yang membantu bakteri menyerang induk semangnya yaitu saluran pencernaan manusia. *Shiga like toxin* (SLT) atau *shiga toxin* yaitu *stx1* dan *stx2* adalah salah satu faktor virulen dari *Escherichia coli* O157: H7 yang utama. Toxin yang dihasilkan oleh *E. coli* O157: H7 dalam lumen usus manusia dapat masuk ke lapisan usus bagian lebih dalam, akibat adanya faktor virulen yang lain yaitu intimin. Faktor virulen intimin dapat menyebabkan munculnya *attaching* dan *effacing lesions* sehingga terjadi *locus of enterocyte effacement* (LEE) (Paton, 1998).

Bakteri EHEC menghasilkan faktor protein *Enterococcal Surface Protein* A (EspA) dan *Enterococcal Surface Protein* (EspB) yang dapat membantu terjadinya penempelan pada epitel usus, dengan dibantu adanya gene *eae* yang terdapat pada bakteri EHEC. Setelah bakteri EHEC berhasil menempel pada

epithel usus dan menimbulkan lesi maka bakteri dan toxin yang telah dihasilkan dalam lumen usus dapat menembus ke bagian lapisan yang lebih dalam dan menembus lapisan endothel sehingga masuk kedalam aliran darah. Faktor virulen hemolysin (hlyA) dikode oleh adanya faktor plasmid yang terdapat di dalam bakteri EHEC (Paton, 1998).

Proses penempelan bakteri enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) pada permukaan lumen usus. EHEC yang menempel pada sel epithel akhirnya menyebabkan terjadinya *attaching* dan *effacing* lesion yang diikuti dengan lepasnya microvilli serta terjadinya bentuk perlekatan “pedestal”. Kemudian *shiga toxin* yang telah dihasilkan akan masuk ke bagian yang lebih dalam dan meninggalkan lumen sehingga menyebabkan efek sistemik (Paton, 1998).

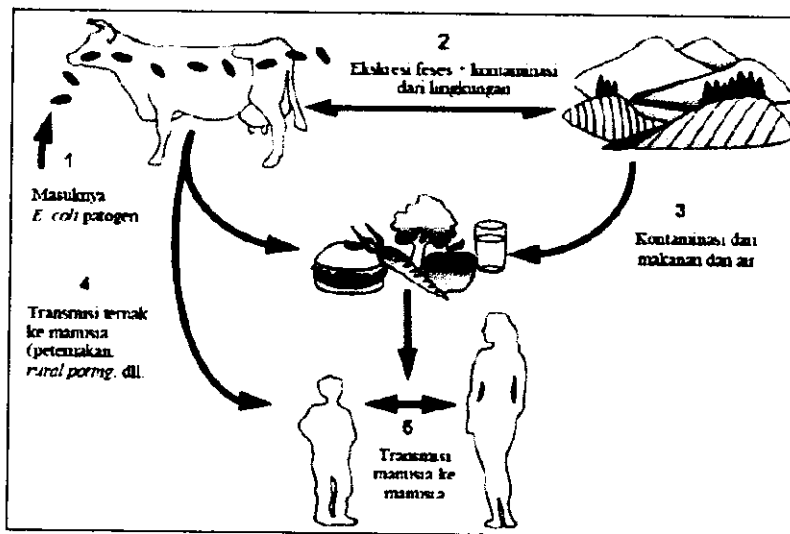
#### **2.4.5 Transmisi ke manusia *Escherichia coli***

Bakteri *Escherichia coli* terdapat dalam lumen saluran pencernaan ternak sapi yang sehat. Proses pemotongan hewan yang kurang higienis di rumah potong dapat menyebabkan terjadinya kontaminasi bakteri pada daging. Sedangkan kontaminasi pada susu dapat terjadi akibat ambing sapi perah telah terinfeksi oleh bakteri, atau kontaminasi berasal dari alat-alat pemerahan yang digunakan (Andriani, 2005). Daging dan susu yang telah terkontaminasi oleh *Escherichia coli* dan tidak dimasak secara sempurna dapat menyebabkan infeksi *Escherichia coli* pada manusia yang mengkonsumsi. Daging dan susu yang telah terkontaminasi bakteri *Escherichia coli* tidak memperlihatkan perubahan organoleptik baik warna, rasa, maupun bau. Manusia yang tempat tinggalnya

berdekatan dengan peternakan juga dapat terinfeksi bakteri *Escherichia coli* yang berada dalam peternakan tersebut (Andriani, 2005).

Selain disebarkan oleh ternak sapi melalui daging dan susunya, bakteri *Escherichia coli* juga dapat ditularkan dari manusia yang telah terinfeksi ke manusia yang lainnya. Penyebaran bakteri *Escherichia coli* dari manusia ke manusia yang lain terjadi secara peroral. Pernah dilaporkan terjadi infeksi secara waterborne pada kolam renang yang terkontaminasi (Andriani, 2005).

Pada tahun 2001 di Ohio juga telah dilaporkan kejadian *airborne infection* yang berasal dari dinding dan debu sebuah bangunan dimana manusia yang disekitar bangunan tersebut terinfeksi oleh bakteri *Escherichia coli* (Andriani, 2005).



**Gambar2.2** Food borne disease *Escherichia coli*. Sumber: Suwito (2009).

## 2.5 Shiga toxin

*Shiga toxin* merupakan antigenik yang dihasilkan dari *Escherichia coli* O157:H7. *Shiga toxin* (*stx*) terdiri dari dua macam yaitu *stx1* dan *stx2*. Struktur antigenik *shiga toxin 1* (*stx1*) sama dengan *Shigella dysenteriae* tipe 1 dan sifat



antigenik serta daya toksisitasnya lebih kecil bila dibandingkan dengan *stx2*. *Shiga toxin 2 (stx 2)* lebih bersifat antigenik serta toksisitasnya lebih tinggi. Toksin tersebut pada manusia menyebabkan diare dan terjadinya lendir di dalam usus (Mainil, 1999).

### 2.5.1 Perkembangan *Shiga toxin*

Dari studi beberapa literatur disebutkan bahwa asal mula *shiga toxin* dapat dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama *shiga toxin* dilaporkan oleh bahwa toksin dari *Escherichia coli* yang diisolasi dari manusia penderita diare dan anak babi penderita *edema disease* secara *in vitro* dapat mematikan sel *Vero* atau bersifat sitotoksin, sehingga toksin ini disebut dengan verotoksin. Beberapa tahun kemudian, *Escherichia coli* yang diisolasi dari manusia penderita diare tersebut juga dilaporkan memiliki sifat sitotoksin terhadap sel *HeLa* dan toksin ini dapat dinetralisasi oleh serum yang dihasilkan oleh *Shigella dysenteriae* tipe 1 (*stx*), sehingga toksin ini disebut juga dengan *shiga toxin* (O'brien *et al.*, 1982).

Bagian kedua tentang perkembangan *shiga toxin* yaitu setelah dilaporkan bahwa *Escherichia coli* serotipe O157:H7 menyebabkan terjadinya *Haemorrhagic Colitis* (HC) pada manusia dengan gejala spesifik terjadinya diare berdarah (Riley *et al.*, 1983). Pada beberapa pasien selain menyebabkan *Haemorrhagic Colitis* (HC), *Escherichia coli* serotipe O157:H7 dapat juga menyebabkan terjadinya *Haemolytic Uremic Syndrome* (HUS), *Thrombocytopenia Purpura* (TPP) yang menyerang syaraf pusat. Kasus HUS lebih banyak terjadi pada anak-anak usia kurang dari 14 tahun. Pada tahun 1996 bulan Juni di kota Hiroshima Jepang sebanyak 65 orang anak menderita HUS dan pada bulan Agustus ditemukan

sebanyak 9.578 kasus dengan 11 orang meninggal dunia dan 90 anak mengalami HUS (Bettelheim, 1997). Di Indonesia telah dilaporkan sembilan kasus HUS dan empat diantaranya meninggal dunia (Tambunan *et al.*, 2001).

Dari kejadian tersebut, kelompok *Escherichia coli* yang menyebabkan terjadinya *Haemorrhagic Colitis* (HC) disebut dengan EHEC dan salah satunya *Escherichia coli* O157:H7. Kemudian secara berturut-turut dilaporkan *Escherichia coli* serotipe O26:H11, O103:H2, O111:H-, O145:H7, dan O157:H- yang dapat menyebabkan terjadinya HC, HUS dan TPP. Walaupun beberapa *Escherichia coli* dengan berbagai serotipe tersebut dapat menimbulkan gejala klinis yang sama, tetapi mekanisme infeksiya tidak diketahui dengan jelas (Tambunan *et al.*, 2001).

### 2.5.2 Struktur dan Aktivitas *Shiga toxin*

*Shiga toxin* adalah suatu protein yang terdiri dari satu bagian sub-unit A dan lima sub-unit B. Berat molekul sub-unit A 30-35 kDA dan sub-unit B 7-11 kDA (Chart, 2000). Sub-unit A merupakan bagian yang penting dari aktivitas toksin, sedangkan sub-unit B merupakan bagian yang berikatan antara toksin dengan reseptor membran *glycolipid* yang disebut *globotriaosylceramide* (Gb3) (Mainil, 1999).

Subunit A terdiri dari polipeptida tunggal, sedangkan subunit B terdiri dari beberapa buah polipeptida yang berbeda. Sedangkan menurut Chart (2000) sel target dari *stx* adalah reseptor di sel membran atau *glycolipid* membran Gb3 (gal $\alpha$ 1-4Gal) dan Gb4 (galNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-4Gal). Reseptor untuk *stx1* dan *stx2* di dalam sel Vero dan HeLa adalah *glycolipid* membran Gb3 (gal $\alpha$ 1-4Gal). Semua

*stx* bersifat sitotoksik terhadap sel Vero, tetapi kurang toksik terhadap sel HeLa (Chart, 2000).

Secara *in vivo*, *stx* diproduksi oleh EHEC setelah berkolonisasi di dalam usus dan *stx2* lebih potensial untuk menimbulkan terjadinya toksemia dari pada *stx1*. Sel target dari *stx* pada manusia antara lain pembuluh darah atau arteri-arteri kecil di dalam sel endotelial di usus, ginjal dan otak terutama pada anak babi. Sel target *stx* di otak pada manusia lebih sedikit bila dibandingkan dengan anak babi. Sel target *stx* juga terdapat pada mukosa gastro intestinal manusia dan anak babi dan beberapa jaringan lainnya (Mainil, 1999).

Nefrotoksik pada manusia terjadi sekitar 10% setelah adanya infeksi pada usus oleh EHEC. *Shiga toxin (stx)* pada manusia menyebabkan terjadinya kerusakan ginjal sehingga manusia harus melakukan cuci darah atau transplantasi ginjal untuk melanjutkan hidupnya. Kejadian HUS mempunyai gejala yang khas antara lain ditandai oleh pembentukan microtrombus, thrombocytopenia dan anemia hemolitik. Meskipun infeksi EHEC dapat menyebabkan HUS pada manusia tetapi pada anak-anak sapi tidak dijumpai gejala tersebut karena reseptor toksin tersebut tidak dapat berkembang pada sel-sel endotelial dan pembuluh darah sapi (Pruimboom-Bress *et al.*, 2000). Gejala neurotoksik pertama kali dilaporkan pada anak-anak babi penderita *edema disease (ED)*. Akibat dari ED cairan yang dihasilkan akan menyebabkan otak menjadi tertekan dan akibatnya kehilangan koordinasi, kelumpuhan, paralisis dan mati mendadak. Gangguan syaraf pada manusia dapat terjadi setelah terjadi infeksi EHEC yang berkolonisasi di dalam usus dan gejala tersebut lebih umum disebut dengan TPP. Gejala yang

menyertai TPP antara lain terjadi hemolisis, *trombocytopenia*, gagal ginjal dan demam yang naik turun (Duffy *et al.*, 2000).

Sejumlah peneliti juga melaporkan bahwa *stx1* dan *stx2* termasuk dalam enterotoksigenik karena menyebabkan terjadinya akumulasi cairan di dalam usus kelinci dan menyebabkan diare. Diare pada anak babi yang menimbulkan kematian dan infeksi EHEC pada manusia disebabkan lesi AE pada usus dan *stx* yang dihasilkan, tetapi hal ini tidak terjadi pada anak sapi. Pada anak sapi, reseptor *stx* tidak berkembang sehingga diare pada anak sapi terjadi akibat lesi AE pada usus halus (Pruimboom-Bress *et al.*, 2000).

## **2.6 Multiplex Polymerase Chain Reaction**

*Polymerase Chain Reaction* ini merupakan teknik perbanyakan DNA secara *in vitro*. Multiplex Polymerase Chain Reaction merupakan teknik perbanyakan lebih dari satu jenis untai DNA. Teknik ini memungkinkan adanya amplifikasi antara dua region DNA yang diketahui, hanya di dalam tabung reaksi, tanpa perlu memasukkannya ke dalam sel (*in vivo*). Dalam sistem kerjanya, PCR dilandasi oleh struktur DNA. Dalam keadaan natifnya, DNA merupakan *double helix*, yang terdiri dari dua buah pita yang berpasangan antiparalel antara satu dengan yang lain dan berikatan dengan ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen terbentuk antara basa-basa yang komplementer, yaitu antara basa Adenine (A) dengan Thymine (T), dan Guanine (G) dengan Cytosine (C). Basa-basa itu terikat dengan molekul gula, deoksiribosa, dan setiap satu molekul gula berikatan dengan molekul gula melalui ikatan fosfat (Gaffar, 2007).

## 2.6.1. Tahapan PCR

Terdapat tiga tahap utama di dalam setiap siklusnya (Gaffar, 2007), yaitu:

### 2.6.1.1 Denaturasi

Selama proses denaturasi, *double stranded* DNA akan membuka menjadi *single stranded* DNA. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusannya ikatan hidrogen diantara basa-basa yang komplemen. Pada tahap ini, seluruh reaksi enzim tidak berjalan, misalnya reaksi polimerisasi pada siklus yang sebelumnya (Gaffar, 2007).

### 2.6.1.2 Annealing

*Primer* akan menuju daerah yang spesifik, dimana daerah tersebut memiliki komplemen dengan *primer*. Pada proses *annealing* ini, ikatan hidrogen akan terbentuk. Selanjutnya, DNA polymerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya, misalnya pada 72°C (Gaffar, 2007).

### 2.6.1.3 Reaksi polimerisasi (Ekstensi)

Umumnya, reaksi polimerisasi atau perpanjangan rantai ini, terjadi pada suhu 72°C. *Primer* yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan dengan dNTP yang komplemen pada sisi 3'nya. Jadi, seandainya ada 1 *copy gene* sebelum siklus berlangsung, setelah satu siklus, akan menjadi 2 *copy*, sesudah 2 siklus akan menjadi 4, sesudah 3 siklus akan menjadi 8 kopi dan seterusnya. Sehingga perubahan ini akan berlangsung secara eksponensial (Gaffar, 2007).

## 2.6.2 Komponen PCR

### 2.6.2.1 Enzim DNA *Polymerase*

Dalam sejarahnya, PCR dilakukan dengan menggunakan *Klenow fragment* DNA polymerase I selama reaksi polimerisasinya. Enzyme ini ternyata tidak aktif secara termal selama proses denaturasi, sehingga peneliti harus menambahkan enzyme di setiap siklusnya. Selain itu, enzim ini hanya bisa dipakai untuk perpanjangan 200 bp. Selain itu, oleh karena suhu annealing yang rendah dan ekstensi yang hanya bisa dilakukan pada 37°C (suhu kerja *Klenow fragment*), hasilnya menjadi kurang spesifik (Gaffar, 2007).

Untuk mengatasi kekurangan tersebut, dalam perkembangannya kemudian dipakai enzim *Taq polymerase* yang memiliki keaktifan dalam suhu tinggi. Oleh karenanya, penambahan enzim tidak perlu dilakukan di setiap siklusnya, dan proses PCR dapat dilakukan dalam satu mesin (Gaffar, 2007).

Pemakaian *Taq polymerase* dalam konsentrasi yang terlalu besar akan mengakibatkan munculnya background produk non-spesifik. Sebaliknya, bila konsentrasi *Taq polymerase* terlalu rendah, maka proses amplifikasi berlangsung secara inefisien, dan produk amplifikasi yang diperoleh akan mempunyai konsentrasi yang relatif rendah (Gaffar, 2007).

### 2.6.2.2 *Primer*

Apabila memungkinkan *primer* yang dipilih adalah yang mengandung G+C sekitar 50%. Apabila memungkinkan, dihindari adanya polipurin atau polipirimidin. Selain itu, juga dihindari adanya struktur sekunder dan adanya komplementari antara *primer-dimer* (Gaffar, 2007).

### 2.6.2.3 Reagen lainnya

Selain enzim dan *primer*, terdapat juga komponen lain yang ikut menentukan keberhasilan reaksi PCR. Komponen tersebut adalah dNTP untuk reaksi polimerisasi, dan buffer yang mengandung  $MgCl_2$ . Konsentrasi ion  $Mg^{2+}$  dalam campuran reaksi merupakan hal yang sangat kritis. Konsentrasi ion  $Mg^{2+}$  ini sangat mempengaruhi proses *primer* annealing, denaturasi, spesifisitas produk, aktivitas enzim dan fidelitas reaksi. Oleh sebab itu, penambahan berbagai pereaksi harus selalu diperhatikan, jangan sampai ada ion-ion lain maupun *chelating agent* yang dapat mengganggu konsentrasi ion  $Mg^{2+}$  dalam larutan. Secara umum, sebaiknya konsentrasi ion  $Mg^{2+}$  bebas yang terdapat dalam larutan adalah sekitar 2 mM (Gaffar, 2007).

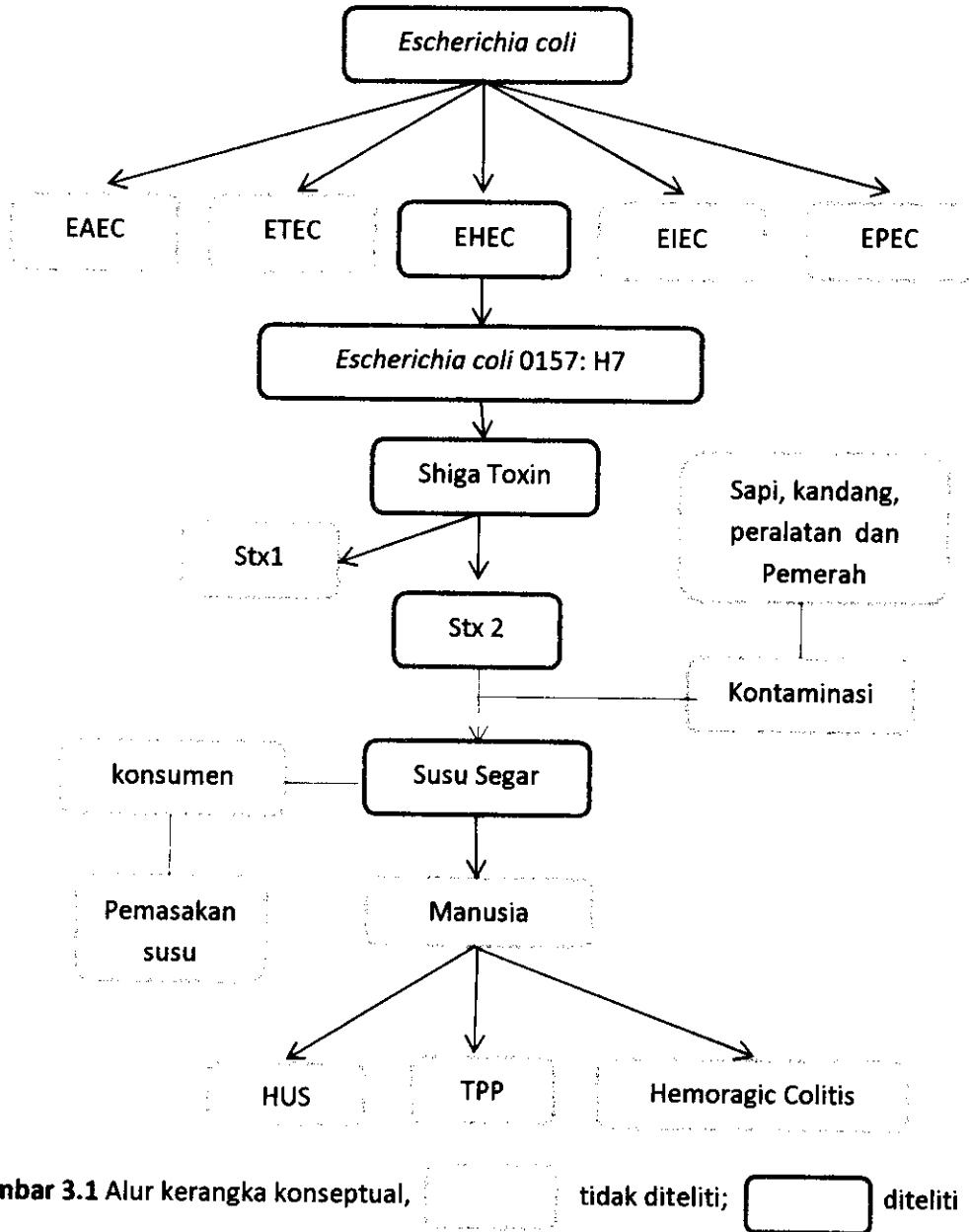
## **BAB 3**

# **KERANGKA KONSEPTUAL**



### BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL

#### 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



*Escherichia coli* merupakan bakteri *fecal contaminant* dan termasuk bakteri berbahaya karena dapat menyebabkan diare. *Escherichia coli* yang menyebabkan diare dikelompokkan menjadi lima berdasarkan sifat-sifat virulensinya, yaitu *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) yang mengakibatkan diare pada anak-anak, *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) yang mengakibatkan diare pada wisatawan, *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) yang mengakibatkan diare berdarah, *Enteraggregative Escherichia coli* (EAEC) yang mengakibatkan diare berlendir pada anak-anak, dan *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC) yang mengakibatkan diare berair.

Diantara kelompok patogenik, EHEC yang paling banyak tersebar luas di antara kita. EHEC memiliki beberapa serotype, salah satunya adalah *Escherichia coli* O157:H7 yang merupakan serotype dari EHEC yang sering mengkontaminasi susu. *Escherichia coli* O157:H7 memiliki kemampuan menghasilkan *shiga toxin* seperti bakteri EHEC lainnya. *Shiga toxin* yang dihasilkan terdapat dua jenis yaitu *shiga toxin 1* dan *Shiga toxin 2*. *Shiga toxin* disandi oleh gen spesifik yaitu gen *stx1* dan *stx2* yang hanya bisa dideteksi secara molekular. Struktur antigenik *shiga toxin 1* (*stx1*), sifat antigenik serta daya toksisitasnya lebih kecil dari pada *Shiga toxin 2* (*stx2*). Hal ini menyebabkan *stx2* lebih mudah dikarakterisasi dari pada *shiga toxin 1*.

Susu memiliki kandungan gizi dan pH yang disukai oleh bakteri, sehingga bakteri yang mengkontaminasi susu dapat tetap hidup dan berkembang di dalam susu. Kontaminasi bakteri pada susu terjadi apabila

penanganan susu di peternakan tidak higienis. Kontaminasi bisa berasal dari badan sapi yang kotor, pemerah yg tidak menjaga kebersihan badannya pada saat melakukan pemerahan, kandang yang kotor, serta pencucian dan penyimpanan peralatan pemerahan yang tidak baik.

Jika bakteri *Escherichia coli* O157:H7 yang dapat menghasilkan *shiga toxin* megkotaminasi susu dan susu tersebut dikonsumsi oleh manusia tanpa dilakukan pemasakan dengan benar maka dapat menyebabkan *Haemorrhagic Colitis* (HC) serta sebagian besar kasus *Hemolytic Uremic Syndrom* (HUS) dan *Thrombocytopenic Purpura* (TPP) pada manusia yang mengkonsumsi susu tersebut.

## **BAB 4**

# **MATERI DAN METODE**

## **BAB 4**

### **MATERI DAN METODE**

#### **4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini termasuk penelitian eksploratif laboratorik yaitu penelitian yang bertujuan untuk memperdalam pengetahuan mengenai gejala tertentu atau dugaan yang sifatnya masih baru dengan memanfaatkan alat-alat laboratorik (Alfiasari, 2012)

#### **4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2014 hingga Agustus 2014 di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Laboratorium Biologi Molekular Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan *Institute Tropical Disease* Universitas Airlangga.

#### **4.3 Definisi operasional variabel**

- 1) Susu segar adalah cairan yang berasal dari ambing sapi yang sehat dan diperoleh dengan cara pemerahan yang benar tanpa mengurangi atau menambah sesuatu komponen atau bahan lain dan tidak mengalami proses pemanasan.
- 2) *Escherichia coli* adalah salah satu bakteri koliform fekal dan merupakan bakteri gram negatif yang yang dapat mencemari susu. Bakteri *Escherichia coli* dapat menyebabkan *foodborne disease*.

- 3) Gen penyandi *Escherichia coli* O157:H7 adalah gen *flicH7* yang dimiliki bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7.
- 4) Gen penyandi *shiga toxin* adalah gen *stx2* yang dimiliki oleh bakteri *Escherichia coli* kelompok virulen EHEC.

#### 4.4 Materi Penelitian

##### 4.4.1 Bahan penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu yang diambil dari 4 peternakan sapi perah di Surabaya sebanyak 40 sampel. Bahan lainnya adalah bahan yang digunakan dalam identifikasi *Escherichia coli*, ekstraksi DNA, amplifikasi dengan *Multiplex Polymerase Chain Reaction*, dan elektroforesis: EMBA, aquadest, *Pepton Water* 1%, *kovach*, *tripton*, *bacteriological ox bile*, laktosa, *brilliant green*, *DNAzol® Direct* (Molecular Research Center), TE buffer, primer *flicH7* (Macro Gen), primer *stx2* (Macro Gen), dNTP (GeNet Bio), 10X *thermophilic buffer* (GeNet Bio),  $MgCl_2$ , *Taq polymerase* (GeNet Bio), *loading dye* (Fermentus), gel agarosa (Vivantis), dan marker.

##### 4.4.2 Alat penelitian

Peralatan yang digunakan untuk pengambilan sampel meliputi tabung reaksi, kapas, pipet hisap, termos (*ice box*). Peralatan yang digunakan untuk identifikasi *Escherichia coli*, ekstraksi DNA, amplifikasi dengan *Multiplex Polymerase Chain Reaction*, dan elektroforesis meliputi cawan Petri, Erlenmeyer, tabung reaksi, kapas, kompor, ose, bunsen, tabung Durham, micropipet

(Nichipet), tabung eppendorf, microtube, *white tip*, *yellow tip*, *thermal cycler* PCR (eppendorf), transluminator-UV, vortex, gel electrophoresis apparatus (Biorad), inkubator, autoklaf, dan erlenmeyer.

#### **4.5 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data**

##### **4.5.1 Pengambilan sampel**

Pengambilan sampel menggunakan metode *Purposive Sampling* yaitu cara penarikan sampel yang dilakukan dengan memilih subjek berdasarkan kriteria spesifik yang ditetapkan peneliti (Kuntjojo, 2009). Sampel susu diambil dari 4 peternakan sapi perah di Surabaya yang memiliki sanitasi yang buruk dengan kriteria (Lukman dan Isroin, 1986) antara lain: (a). kulit dan bulu sapi yang kotor, (b) Pemerah tidak menjaga kebersihan pakaian dan badan, (c) Alat pemerah yang tidak bersih dan tidak disimpan dengan baik, dan (d) kandang tidak benar-benar terjaga kebersihannya. Pengambilan sampel susu pada saat pemerahan pagi hari yaitu pukul 04.00–06.00 WIB. Setiap peternakan diambil satu buah sampel susu sebanyak 10 ml yang diambil dari milk can setelah pemerahan selesai. Tiap sampel susu ditempatkan pada tabung reaksi steril dan ditutup dengan kapas steril, kemudian dimasukkan ke dalam termos (*ice box*).

##### **4.5.2 Identifikasi *Escherichia coli***

Masing-masing sampel susu ditanam pada media BGGB kemudian ditanam pada media EMBA dengan cara streak dan diinkubasi pada 37°C selama 18-24 jam. Koloni khas *Escherichia coli* termasuk *Escherichia coli* O157:H7 pada media EMBA berwarna hijau metalik. Koloni khas *Escherichia coli* yang tumbuh

di EMBA ditanam lagi di *Pepton Water* 1 % dan diinkubasi selama 24 jam pada 37°C. *Pepton Water* 1 % yang sudah diinkubasi selanjutnya ditetesi dengan reagen *Kovach* sebanyak dua atau tiga tetes. Uji positif *Escherichia coli* ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan *Peptone Water* 1 % (Prawesthirini dkk., 2009)

#### 4.5.3 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA *Escherichia coli* diawali dengan mengambil 2 µl DNAzol® Direct dan masukkan ke dalam *microtube*. Tambahkan ke dalamnya ±2 mg (± 1-2 koloni bakteri), lalu diamkan selama 15 menit (Molecular Research Centre, 2010). Koloni bakteri yg digunakan disini adalah koloni pada media EMBA yang berwarna hijau metalik dan indol positif. Larutan ini siap untuk digunakan sebagai DNA template.

#### 4.5.4 Amplifikasi dengan *Multiplex Polymerase Chain Reaction*

Reagen untuk MPCR terdiri dari masing-masing 1,25 µl untuk masing-masing primer; 0,5 µl dNTP, 2,5 µl 10X thermophilic buffer, 1 µl Mg Cl<sub>2</sub>, 0,2 µl Taq polymerase dan 13,8 µl air suling steril (Brenjchi et al., 2011) dimasukkan ke dalam dalam tabung *microtube* yang berisi 2 µl DNA template. Campuran reagen PCR tersebut kemudian dimasukkan dalam thermocycler dengan inkubasi awal 94°C selama 5 menit diikuti dengan 35 siklus yang terdiri dari 94°C untuk denaturasi selama 1 menit, annealing pada 52°C selama 30 detik, dan elongasi 72°C selama 1 menit. Diikuti dengan ekstensi akhir pada 72°C selama 10 menit (Brenjchi et al., 2011).



#### 4.5.5 Elektroforesis

Masing-masing 3  $\mu$ l produk amplifikasi dicampur dengan 3  $\mu$ l larutan loading sampai tercampur dengan baik. Masing-masing dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 1,5% yang terendam dalam tanki yang berisi TE buffer. Dimasukkan juga marker ke dalam sumur gel agarosa untuk mengetahui ukuran DNA produk PCR, kemudian elektroforesis dijalankan selama 40 menit dengan tegangan konstan 100 volt. Elektroforesis dihentikan dan gel diangkat untuk diamati di bawah sinar Ultra Violet (UV) setelah 40 menit. Hasil yang diperoleh berupa pola pita DNA (band DNA) yang menunjukkan jumlah dan pola yang berbeda (Brenjchi *et al.*, 2011).

**Tabel 3.1** Primer yang Digunakan dalam Penelitian

Target Gen	Primer Sequence	Size (bp)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ( <i>fliC</i> H7)	F: 5'- GCG CTG TCG AGT TCT ATC GAG-3'	624
	R: 5'- CAA CGG TGA CTT TAT CGC CAT TCC-3'	
Stx 2	F: 5'- CCA TGA CAA CGG ACA GCA GTT-3'	779
	R: 5'- CCT GTC AAC TGA GCA CTT TG-3'	

Sumber Brenjchi *et al.*, (2011)

#### 4.6 Sekuensing DNA

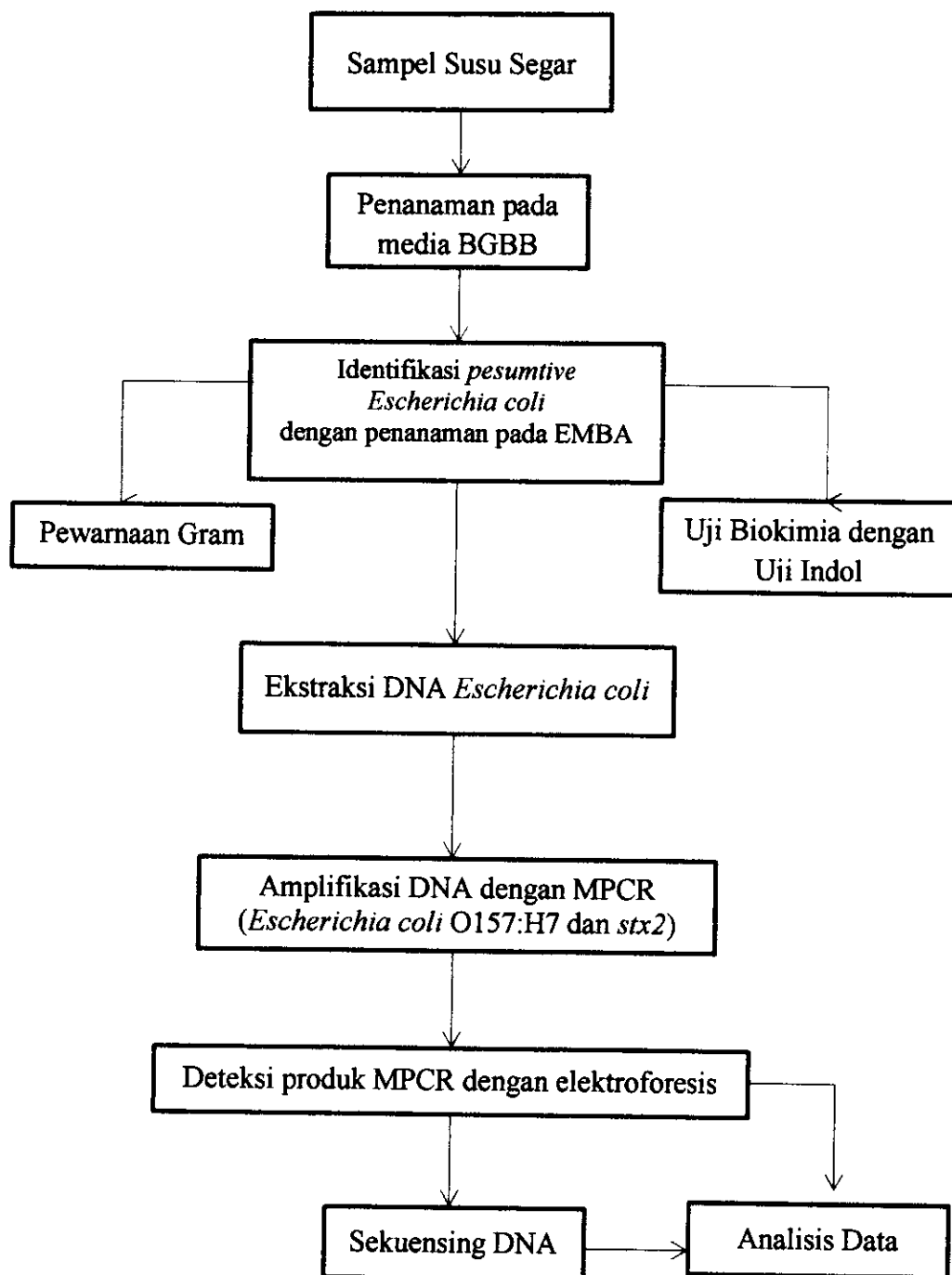
Sekuensing DNA merupakan proses untuk menentukan urutan basa nukleotida, ukuran DNA, jumlah fragmen DNA, dan profil DNA. Metode yang sering digunakan dalam sekuensing adalah cycle sequencing. Hasil sekuensing berupa grafik chromatogram dengan indikator warna yang berbeda pada setiap

basa nitrogen yang menyusun DNA. Berdasarkan hasil sekuensing yang diperoleh kita dapat menentukan homologi, filogenetik, mutasi atau evolusi, karakter protein seperti jumlah epitop, pH, dan berat molekul.

#### **4.7 Analisis Data**

Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan membandingkan urutan basa nukleotida dari sampel yang digunakan dengan urutan basa nukleotida standar yang diperoleh dari *Genbank* dengan menggunakan program *ClustalW2*, program ini dapat mengurutkan basa nukleotida sampel yang digunakan dengan basa nukleotida standar dan program ini dapat menandai basa nukleotida tertentu yang berbeda. Pada penelitian ini hanya satu sampel yang dilakukan analisa dengan software tersebut, namun dari satu sampel yang dianalisa sudah bisa mencari homologinya.

#### 4.8 Kerangka Operasional



**Gambar 4.1** Bagan kerangka operasional penelitian.

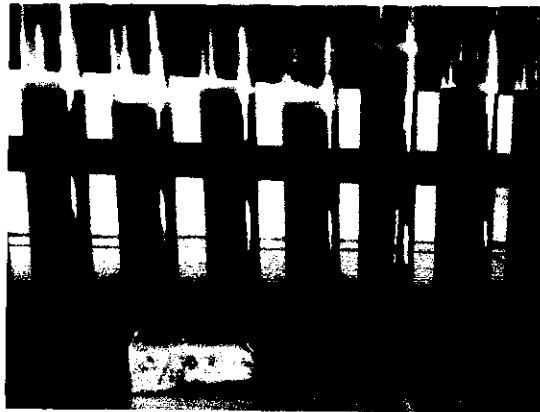
## **BAB 5**

# HASIL PENELITIAN

## BAB 5 HASIL PENELITIAN

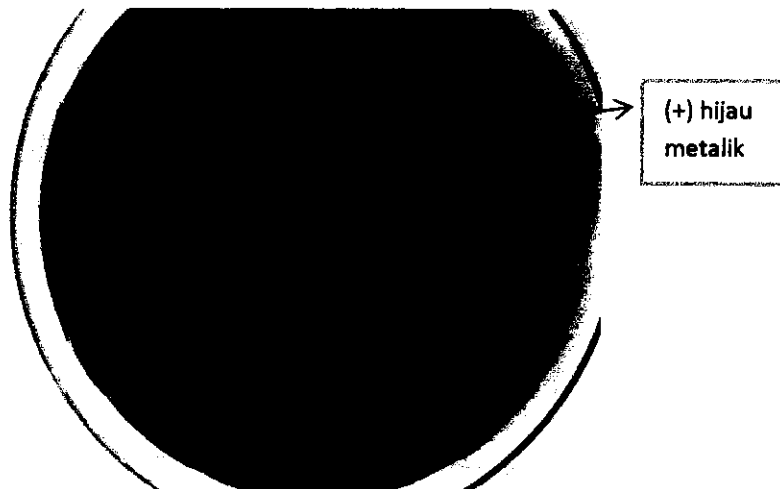
### 5.1 Hasil Identifikasi *Escherichia coli*

Sampel susu yang dibiakan berwarna hijau keruh dan menghasilkan gas pada media BGGB dapat dikatakan terdapat bakteri koliform. Kemudian bakteri yang ada di media BGGB ditanamkan pada media EMBA. Gambaran media BGGB yang mengalami perubahan warna hijau keruh dapat dilihat pada Gambar 5.1.



**Gambar 5.1** Media BGGB berwarna hijau keruh dan terdapat gas.

Pada media EMBA terdapat koloni terpisah berwarna hijau metalik, dapat dikatakan bahwa adanya dugaan bakteri *Escherichia coli*. Bakteri tersebut dapat membentuk warna hijau metalik karena adanya reaksi dengan *methylene blue*. Gambaran warna hijau metalik dapat dilihat pada Gambar 5.2.



**Gambar 5.2** Media EMBA yang ditumbuhi *Escherichia coli*.

Koloni terpisah tersebut kemudian dikonfirmasi lagi dengan menggunakan uji Indol, yaitu dengan cara menanamkan pada media *Pepton Water* 1% pada suhu  $37.5^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Uji indol positif terlihat dari adanya cincin warna merah pada permukaan media *Pepton Water* 1% setelah ditetesi dengan reagen *Kovach*.

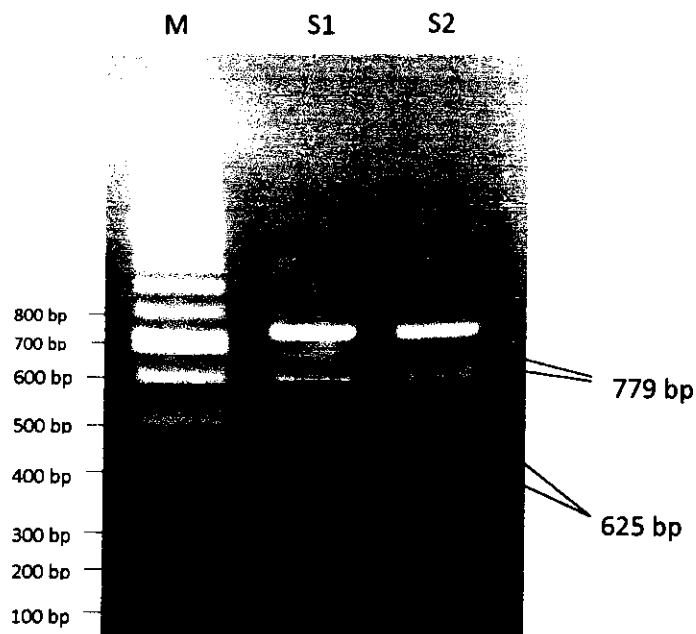


**Gambar 5.3** Uji Indol positif pada *pepton water* 1%.

Pada Gambar 5.3 menunjukkan bahwa terdapat cincin indol berwarna merah muda. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat biakan dari bakteri *Escherichia coli*.

## 5.2 Hasil Electroforesis Produk *Multiplex Polymerase Chain Reaction*

Ekstraksi DNA menggunakan reagen DNAzol® Direct, kemudian dilakukan amplifikasi dengan menggunakan dua pasang primer yaitu primer *flicH7* dan *stx2*. Produk dari amplifikasi kemudian dielektroforesis dan didapatkan hasil seperti pada Gambar 5.4.



**Gambar 5.4** Hasil Electroforesis DNA sampel isolat *Escherichia coli*

Pada Gambar 5.4. menunjukkan hasil dari Multiplex PCR dari penelitian ini. Hal ini menunjukkan bahwa dari 24 sampel yang positif terdapat bakteri *Escherichia coli* hanya terdapat 3 sampel yang positif menunjukkan bakteri *Escherichia coli* O157:H7 yang menghasilkan *stx2* ditandai dengan tampaknya *band* DNA hasil amplifikasi tersebut.

## 5.3 Hasil Analisa Homologi Bakteri

Pada sampel yang positif *Escherichia coli* setelah dilakukan elektroforesis kemudian 3 sampel dilakukan sekuensing untuk melihat nuklotida tersebut. Hasil

dari sekuensing (Lampiran7) tersebut menunjukkan bahwa adanya homologi antara *Escherichia coli* pada sampel yang diisolasi dengan *Escherichia coli* O157:H7. Hal ini dapat dibuktikan melalui bioedit yang dilakukan dengan cara memasukan data salah satu sampel pada software *clustalW2* yang dibandingkan dengan data sekuensing *Escherichia coli* lainnya yang diperoleh dari *genbank*. Hasil data dapat ditunjukkan pada Tabel 5.1 berikut ini

**Tabel 5.1** Hasil Analisis Bioedit dengan Menggunakan *Clustalw2*

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	sampel_satu	467	2	Escherichiacoli_O26_1	14093	91.86
1	sampel_satu	467	3	Escherichiacoli_O103_2	3283	85.65
1	sampel_satu	467	4	Escherichiacoli_O111_4	3144	88.01
1	sampel_satu	467	5	Escherichia_coli_K1_5	2747	86.94
1	sampel_satu	467	6	Escherichiacoli_O157_H7_1	4427	89.72
1	sampel_satu	467	7	Escherichiacoli_O157_H7~_2	10078	90.36
1	sampel_satu	467	8	Escherichiacoli_O157_H7~_3	10078	90.36
1	sampel_satu	467	9	Escherichiacoli_O157_H7~_4	20499	91.86
1	sampel_satu	467	10	stx2_Escherichia_coli_genes_str ainS7_1	1242	76.45
1	sampel_satu	467	11	stx2_Escherichia_coli_genes_str ainH11_2	1242	71.52
1	sampel_satu	467	12	stx2_Escherichia_coli_strain_	1176	73.88
1	sampel_satu	467	13	stx2_Escherichia_coli_O63_H6_ 4	1236	65.95
1	sampel_satu	467	14	stx2_Escherichia_coli_O157_H7 5	1220	69.59

Pada tabel tersebut seqA (sampel satu penelitian) dicari homologi dari beberapa macam bakteri *Escherichia coli* dan *shiga toxin* lainnya yang terdapat pada kolom seqB. Nilai dari homologi tersebut tertera pada baris table *score*. Semakin tinggi hasil nilai yang didapatkan maka menunjukkan homologi yang semakin besar begitu juga dengan sebaliknya jika semakin kecil nilai yang



didapatkan maka semakin kecil pula hubungan homologinya. Sampel yang dilakukan analisa *bioedit* dengan software ini hanya salah satu sampel yang digunakan, namun dari salah satu sampel tersebut menunjukkan adanya homologi dengan *Escherichia coli* O157:H7 yang dapat menyebabkan diare berdarah pada manusia.

# **BAB 6**

## **PEMBAHASAN**

## BAB 6 PEMBAHASAN

### 6.1 Identifikasi *Escherichia coli*

Pada penelitian ini 24 dari 40 sampel susu terdapat bakteri *Escherichia coli*. Adanya bakteri tersebut pada susu segar dapat membuat susu segar tidak memenuhi persyaratan yang ditetapkan oleh SNI 7388-2009. Adanya bakteri ini menunjukkan bahwa susu tersebut terkena cemaran oleh feses sapi pada saat penanganan susu di sebuah peternakan. *Escherichia coli* merupakan indikator adanya kontaminasi fekal.

Pada penelitian ini, tingkat terjadinya pencemaran bakteri *Escherichia coli* tergolong sangat tinggi yaitu 60%. Dari 40 sampel yang diujikan terdapat 24 pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yang ditunjukkan oleh adanya koloni berwarna hijau metalik dan kemudian terdapat cincin indol ada pengujian dengan reagen *kovac*.

Tingginya keberadaan *Escherichia coli* pada sampel dikarenakan peternakan yang diambil sampelnya masih terlihat kotor, sehingga memungkinkan terjadinya kontaminasi pada *milk can*. Tingginya *Escherichia coli* pada sampel bisa juga dikarenakan faktor musim. Pada saat pengambilan sampel susu disekitar tempat peternakan sedang dalam kondisi yang sangat panas. Menurut Brenjchi (2011) menyatakan bahwa prevalensi tertinggi terjadi pada musim panas dan menurun pada musim dingin. Penelitian serupa yang dilakukan di Swedia dilaporkan bahwa selama musim panas dan awal musim gugur lebih banyak diisolasi dibandingkan dengan musim yang lainnya (Albihin *et al.*, 2003). Secara

umum penyebab dari banyaknya bakteri *Escherichia coli* yang ditemukan dapat dikarenakan oleh beberapa faktor.

Faktor pertama terjadinya cemaran adalah sapi yang sedang diperah tidak dijaga kebersihannya, peternak sangat kurang memperhatikan kondisi kebersihan sapi. Terkadang ekor sapi yang dikibas-kibaskan oleh sapi sendiri dapat menyebabkan kotoran pada ekor tersebut jatuh pada tempat penampungan susu sementara (Hadiwiyoto, 1994)

Faktor yang kedua adalah kondisi kebersihan dari pemerah susu itu sendiri. Terkadang pemerah susu memakai pakaian yang kotor, bahkan menggunakan pakaian yang sudah lama tidak dibersihkan atau dicuci. Susu dapat berfungsi sebagai sarana penyebaran penyakit sehingga orang yang bertugas pemerah susu harus selalu menjaga kebersihan (Lukman, 1986).

Kurang bersihnya peralatan dan penampung susu merupakan faktor kontaminasi yang ketiga. Buruknya sanitasi ini dikarenakan pencucian alat yang kurang bersih dan penyimpanan peralatan perah yang sembarangan. Alat-alat tersebut hanya dicuci dengan air biasa yang seharusnya dicuci dengan air panas atau dengan bahan kimia. Kontaminasi sering disebabkan karena peralatan pada waktu pemerahan dan air pencuci alat yang kotor tidak terjaga kebersihannya (handiwiyoto, 1994).

Faktor yang terakhir adalah sanitasi kandang yang buruk. Sanitasi kandang yang baik dapat meminimaliskan adanya cemaran yaitu dengan cara membersihkan kandang secara rutin pada saat sebelum atau sesudah pemerahan. Kondisi kandang yang kotor seperti adanya sisa dari pakan sapi serta kotoran sapi

yang tidak dibersihkan dapat mengundang adanya lalat di kandang. Bakteri yang berada di sekitar kandang dapat mencemari susu serta bau dari kandang dapat mengundang lalat dimana hal ini dapat mengkontaminasi susu yang dihasilkan (Lukman dan Isroin, 1986).

## 6.2. Hasil Karakterisasi Gen *shiga toxin 2* dengan M-PCR

Dari 24 sampel yang diuji dengan metode M-PCR menunjukkan bahwa 3 sampel tersebut terdapat bakteri *Escherichia coli* O157:H7 penghasil *shiga toxin 2*. Sampel tersebut menunjukkan adanya *band* hasil amplifikasi primer *stx2* yang memiliki ukuran 779bp dan *fliC<sub>H7</sub>* yang memiliki ukuran 625bp. Hal ini membuktikan bahwa sampel tersebut adalah bakteri *Escherichia coli* O157:H7 penghasil *shiga toxin*. Pada penelitian hasil karakterisasi gen *shiga toxin 2* yang ditunjukkan dapat dinyatakan bahwa susu yang tercemar merupakan sumber adanya *Escherichia coli* O157:H7 yang dapat menghasilkan *shiga toxin 2*.

Menurut Mainil and Daube (2005), semua *Escherichia coli* golongan EHEC yang diisolasi dari hewan, manusia, dan makanan dapat memproduksi *shiga toxin* dan menghasilkan lesi AE atau secara genetik dapat memproduksi keduanya. Ditemukannya gen penyandi *shiga toxin* pada susu harus mendapatkan perhatian yang serius karena toxin ini patogen bagi manusia yang dapat mengakibatkan HC dengan gejala spesifik seperti diare berdarah, HUS yang merupakan gangguan pada ginjal dan TPP yang menyerang saraf pusat. Makanan atau minuman yang mengandung EHEC 10 cfu/ml atau kurang dari 10 cfu/g dengan masa inkubasi 2-8 hari dan gejala akan muncul setelah 3-4 hari pascainfeksi pada manusia (Mainil and Daube, 2005).

### 6.3 Hasil Sekuensing dan Homologi *Escherichia coli* pada Isolat Susu

Sekuensing DNA pada sampel yang ditunjukkan positif dengan teknik M-PCR kemudian dilakukan analisa homologi dengan menggunakan *software* yang terdapat pada *ClustalW2*.

Pada Table 5.1 analisa dilakukan dengan membandingkan sekuensing dari beberapa *Escherichia coli* dan beberapa *shiga toxin* yang dihasilkan oleh *Escherichia coli* lainnya. Pada analisa tersebut didapatkan bahwa homologi antara *Escherichia coli* yang diperoleh pada isolat sampel memiliki nilai homologi sebesar 91.68 dengan bakteri *Escherichia coli* O157:H7, dimana data sekuensing tersebut diperoleh dari *Genbank*. Karena terdapat adanya homologi tersebut dapat dikatakan bahwa pada beberapa sampel yang diteliti terdapat bakteri *Escherichia coli* yang patogen yaitu bakteri *Escherichia coli* O157:H7.

Namun pada analisa *shiga toxin* menunjukkan nilai atau *score* homologi sebesar 76.45. dari hasil analisa dapat dinyatakan bahwa sampel tersebut memiliki homologi dengan bakteri *Escherichia coli* O157:H7 akan tetapi bakteri pada sampel diduga sedikit berbeda dengan *Escherichia coli* yang menyebabkan diare berdarah pada manusia. Hal ini dikarenakan nilai presentase untuk *shiga toxin* masih tergolong rendah. Namun dari analisa homologi secara keseluruhan yang telah dilakukan dapat dinyatakan bahwa susu segar merupakan salah satu sumber adanya bakteri *Escherichia coli* O157:H7.

Hasil tersebut meunjukkan perlunya adanya kewaspadaan dalam mengkonsumsi susu segar. Adanya infeksi *Escherichia coli* O157:H7 pada manusia yang dikarenakan meminum susu dapat dihindari dengan mengkonsumsi

susu yang telah dimasak atau dipasteurisasi dengan sempurna. Mengonsumsi susu yang telah dipanaskan atau pasteurisasi dapat mengurangi resiko terjadinya infeksi *shiga toxin* pada manusia karena shiga toksin bersifat tidak tahan panas atau *heat labile toxin* (Albihin *et al*, 2003). Sifat dari *shiga toxin* antara lain inaktif pada suhu 70°C selama 2 menit.

## **BAB 7**

# **KESIMPULAN DAN SARAN**



## **BAB 7**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **7.1 Kesimpulan**

Kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian pencarian sumber dan karakteristik gen penyandi *shiga toxin* dari isolate *Escherichia coli* patogen dari susu segar dengan menggunakan *Multiplex Polymerase Chain Reaction* dan *Squencing* adalah:

- 1) Sebanyak 24 dari 40 sampel susu segar yang diambil dari peternak terdapat bakteri *Escherichia coli* yang diduga berasal dari *fecal contamination*.
- 2) Hasil karakterisasi gen yang diperoleh dari elektroforesis dengan metode *Multiplex Polymerase Chain Reaction* menunjukkan bahwa 3 dari 24 sampel yang positif *Escherichia coli* terdapat *band* dari *shiga toxin 2* yang memiliki ukuran 779 bp dan *band* dari *fliC<sub>H7</sub>* yang memiliki ukuran 625bp.
- 3) Hasil dari sekuensing menunjukkan adanya homologi bakteri *Escherichia coli* yang menghasilkan *stx 2* pada penelitian ini dengan bakteri *Escherichia coli* O157:H7

#### **7.2 Saran**

Berdasarkan hasil penelitian dapat diajukan saran sebagai berikut:

- 1) Bagi peternak sapi sebaiknya melakukan peningkatan sanitasi pada peternakannya mulai dari kebersihan ternak, peralatan pemerahan susu hingga kebersihan pemerah
- 2) Bagi konsumen untuk selalu memasak susu yang akan dikonsumsi

- 3) Bagi peneliti selanjutnya untuk lebih selektif dalam mengambil sampel yang akan diteliti dan lebih banyak lagi mengetahui bakteri lainnya penghasil *shiga toxin 2*.

# DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Albihin, A., E. Eriksson. C. Wallen and A. Aspen. 2003. Verotoxinogenic *Escherichia coli* (VTEC) O157:H7 a Nationwide Swedish Survey of Bovine Faeces. *Acta Vet. Scand.* 44: 43-52.
- Alfiasari. 2012. *Metode Penulisan dan Penyajian Ilmiah*. Departemen ilmu Keluarga dan Konsumen, FEMA Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Andriani. 2005. *Escherichia coli* O157:H7 sebagai Penyebab Penyakit Zoonosis. Balai penelitian Veteriner Bogor. Bogor.
- Badan Standardisasi Nasional. 1998. *Susu Segar*. Pusat Standardisasi-LIPI. Jakarta.
- Badan Standardisasi Nasional. 2009. *Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Pangan*. Pusat standardisasi-LIPI. Jakarta.
- Bettelheim, K.A. 1997. *Escherichia coli* O157 Outbreak in Japan: Lessons for Australia. *Aust. Vet. J.* 75(2):108.
- Brenjchi, M., A. Jamshidi, N. Farzaneh, and M. R. Bassami. 2011. Identification of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* O157:H7 in Raw Milk Samples from Dairy Farms in Mashhad using Multiplex PCR Assay. *Iranian. Vet. Res.* 12(2): 35.
- Chandra, B. 2006. *Pengantar Kesehatan Lingkungan*. Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 96-97.
- Chart, H. 2000. VTEC Enteropatogenicity. *J. Appl. Microb. Symposium Supplement.* 88: 12S – 23S.
- Depkes RI. 1998. *Pedoman Pembinaan dan Pengawasan Sanitasi Makanan*. Dirjen PPM & PLP. Jakarta.
- Deptan RI. 1983. *Air Susu Murni*. Direktorat Jenderal Peternakan. Jakarta.
- Deptan RI. 1995. *Petunjuk Teknis Pengawasan dan Pengujian Kualitas Susu*. Direktorat Jenderal Peternakan. Jakarta.
- Doyle, M. P. and J. L. Schoeni. 1984. Survival and Growth Characteristics of *Escherichia coli* Associated with Hemorrhagic Collitis. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 48: 855-856.

- Duffy, G., P. Garvey, J. Mainil, and J. Coia. 2000. Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe: Pathogenicity and Virulence. Castlenock, Dublin, Ireland. The National Food Centre. pp. 447 – 452.
- Falkenstein, D. 2010. 1.636.000 Pounds of Beef Recalled Since November due to *E. coli* O157:H7. [http://www. Foodborne-illness-outbreaks/1636000](http://www.Foodborne-illness-outbreaks/1636000). 16 februari 2013.
- Gaffar, S. 2007. Penggunaan PCR (Polymerase Chain Reaction) untuk Deteksi Retrovirus HTLV. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Hadiwiyoto, S. 1994. Teori dan Prosedur Pengujian Mutu Susu dan Hasil Olahannya. Liberty. 2: 160-169.
- Iman, E. R. S.,D. Handijatno, dan W. Tyasningsih. 2003. Penuntun Praktikum Mikrobiologi Veteriner I. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Kusnoputranto, H. 1996. Kesehatan Lingkungan. Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Airlangga. Surabaya.
- Kuntjojo. 2009. Metodologi Penelitian. Universitas Nusantara PGRI. Kediri
- Law, D. 2000. Virulence Factors of *Escherichia coli* O157:H7 and Others Shigatoxin Producing *E.coli*. *J. Appl. Microbiol.* 88: 729-745.
- Lukman dan S. Isroin. 1986. Pengantar Sanitasi Makanan. Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Mainil, J.G. 1999. Shiga/Verocytotoxins and Shiga/Verotoxigenic *Escherichia coli* in Animals. *Vet. Res.* 30(2-3): 235–257.
- Mainil, J.G. and G. Daube. 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from Animal, Humans and Foods. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1332 – 1344.
- Marlina, E. T., Y. A. Hidayati, dan W. Juanda. 2007. Kualitas Mikroba pada Ruang Penampungan Susu dan Pengaruhnya terhadap Jumlah Bakteri dalam Air Susu. Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Moccurrin, D. M. and J. M. Bassert. 2006. Clinical Textbook for Veterinary Technicians. 6th Edition. Elsevier Saunders.

- Nurairlyasti. 1999. Skrining *Escherichia coli* O157:H7 pada Isolat Lokal *E. coli* dengan Menggunakan Uji Aglutinasi. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- O'brien, A.D., G.D. Laveck, M.R. Thompson, and S.B. Formol. 1982. Production of *Shigella dysenteriae* Type 1 Like Cytotoxin by *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 146: 763 – 769.
- Paton, J.C. dan Paton, A. W. 1998. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Review.* 11(3):450-479.
- Pelczar, J. M. and E. C. S. Chan. 1988. Dasar-Dasar Mikrobiology 2. UI Press. Jakarta.
- Prawesthirini, S., H.P. Siswanto, A.T.S. Estoepangestie, M.H. Effendi, N.Harijani, G.C.de Vries, Budiarto, E.K. Sabdoningrum. 2009. Analisa Kualitas Susu, Daging dan Telur. Cetakan kelima. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya
- Pruimboom-Bress, I., T. Morgan, M.R. Achermann, and H.W. Moon. 2000. Cattle Lack Vascular Receptors for *E. coli* O157:H7 Shiga Toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 10325 – 10329.
- Purnomo, H. dan Adiono. 1997. Ilmu Pangan. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Rachmawan, O. 2001. Penanganan Susu Segar. Direktorat Pendidikan. Jakarta.
- Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, and J. G. Wells, 1983. Hemorrhagic Collitis Associated with Rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308: 681-685.
- Singleton, P. and D. Salasbury. 1980. Dictionary of Microbiology. Jhon Willey and Sons Ltd. New York.
- Sumoprastowo dan Zein. 1990. Ternak Perah. Yasaguna. Jakarta. 53-55, 99-101.
- Suwito, W. 2010. Bakteri yang Sering Mencemari Susu: Deteksi, Patogenesis, Epidemiologi, dan Cara Pengendaliannya. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Yogyakarta. Yogyakarta.
- Tambunan, T.P.P., Trihono, dan S.O. Paradede. 2001. Sindrom Hemolitik di Bagian Ilmu Kesehatan Anak FKUI-RSCM Jakarta. *Bull. Penelitian Kesehatan.* 29(2): 68 – 75.

Vogt, R. L and L. Dippold. 2005. *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak Associated with Consumption of Ground Beef June-July 2002. *Public Health Rep.* 120 (2): 174-8.

Widyastika, D. M. 2008. *Deteksi Bakteri Gram Negatif pada Susu Bubuk Skim Impor.* Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Bogor.

# LAMPIRAN



## Lampiran 1. Daftar Sampel

No Sampel	Media BGRB	Media EMBA	uji Indol	PCR	
				<i>flhA7</i>	<i>str2</i>
A1	+++	--	Tidak terdapat cincin indol	negatif (-)	negatif (-)
A2	+++	--	Tidak terdapat cincin indol	negatif (-)	negatif (-)
A3	+++	--	Tidak terdapat cincin indol	negatif (-)	negatif (-)
A4	+++	--	Tidak terdapat cincin indol	negatif (-)	negatif (-)
A5	+++	--	Tidak terdapat cincin indol	negatif (-)	negatif (-)
A6	+++	--	Tidak terdapat cincin indol	negatif (-)	negatif (-)
A7	+++	--	Tidak terdapat cincin indol	negatif (-)	negatif (-)
A8	+++	--	Tidak terdapat cincin indol	negatif (-)	negatif (-)
A9	+++	--	Tidak terdapat cincin indol	negatif (-)	negatif (-)
A10	+++	--	Tidak terdapat cincin indol	negatif (-)	negatif (-)
B1	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
B2	+++	--	Tidak terdapat cincin indol	negatif (-)	negatif (-)
B3	+++	--	Tidak terdapat cincin indol	negatif (-)	negatif (-)
B4	+++	--	Tidak terdapat cincin indol	negatif (-)	negatif (-)
B5	+++	--	Tidak terdapat cincin indol	negatif (-)	negatif (-)
B6	+++	--	Tidak terdapat cincin indol	negatif (-)	negatif (-)
B7	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
B8	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
B9	+++	--	Tidak terdapat cincin indol	negatif (-)	negatif (-)
B10	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
C1	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
C2	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
C3	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
C4	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
C5	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
C6	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
C7	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
C8	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
C9	+++	++	+	negatif (-)	Positif (+)
C10	+++	++	+	negatif (-)	Positif (+)
D1	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
D2	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
D3	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
D4	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
D5	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
D6	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
D7	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
D8	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
D9	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)
D10	+++	++	+	negatif (-)	negatif (-)

Keterangan:

+++ : berwarna keruh dan terdapat gelembung gas.

++ : terdapat koloni hijau metalik. -- : tidak terdapat koloni hijau metalik

+ : terdapat cincin indol

**Lampiran 2. Komposisi *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA) untuk 1 liter media**

- *Bacto pepton* ..... : 10.0 gram
- *Laktosa* ..... : 10.0 gram
- *Dipotassium fosfat* ..... : 2.0 gram
- *Bacto Eosin* ..... : 0.40 gram
- *Methylen Blue* ..... : 0.0050 gram
- *Bacto Agar* ..... : 15.0 gram

**Lampiran 3. Komposisi *Nutrient Agar* (NA) untuk 1 liter media**

- *Peptone* ..... : 5.0 gram
- *Beef Extract* ..... : 3.0 gram
- *Sodium Chloride* ..... : 8.0 gram
- *Agar* ..... : 15.0 gram

**Lampiran 4. Komposisi *Brilliant Green Bile Broth* (BGBB) untuk 1 liter media**

- *Trypton* ..... : 10.0 gram
- *Bacteriological ox bile* ..... : 20.0 gram
- *Lactose* ..... : 10.0 gram
- *Brilliant Green* ..... : 13.3 gram

**Lampiran 5. Sekuensing Gen *Escherichia coli* O157:H7 *flicH7***

1 atggcacaag tcattaatac caacagcctc tcgctgatca ctcaaaataa tatcaacaag  
 61 aaccagtctg cgctgtcgag ttctatcgag cgtctgtctt ctggcttgcg tattaacagc  
 121 gcgaaggatg acgccgcagg tcaggcgatt gctaacgggt ttacttctaa cattaaggc  
 181 ctgactcagg cggcccgtaa cgccaacgac ggtatttctg ttgctgcagac caccgaaggc  
 241 gcgctgtccg aaatcaacaa caacttacag cgtattcgtg aactgacggg tcaggccact  
 301 acagggacta actccgattc tgacctggac tccatccagg acgaaatcaa atctcgtctt  
 361 gatgaaattg accgcgtatc cggccagacc cagttcaacg gcgtgaacgt gctggcgaaa  
 421 gacggttcaa tgaataatca ggttgggtcg aatgacggcg aaaccatcac gatcgacctg  
 481 aaaaaaatcg attctgatac tctgggtctg aatggcttta acgtaaatgg taaaggtact  
 541 attaccaaca aagctgcaac ggtaagtgat ttaacttctg ctggcgcgaa gttaaacacc  
 601 acgacaggtc ttatgatctt gaaaaccgaa aataccttgt taactaccga tgctgcattc  
 661 gataaattag ggaatggcga taaagtcaaa gttggcggcg tagattatac ttacaacgct  
 721 aaatctgggtg attttactac cactaaatct actgctggta cgggtgtaga cgccgcggcg  
 781 caggctgctg attcagcttc aaaacgtgat gcgtagctg ccaccctca tgctgatgtg  
 841 ggtaaatctg ttaatggttc ttacaccaca aaagatggta ctgtttcttt cgaaacggat  
 901 tcagcaggta atatcaccat cgggtgaagc caggcatacg tagacgatgc aggcaacttg  
 961 acgactaaca acgctggtag cgcagctaaa gctgatatga aagcgtgct caaagcagcg  
 1021 agcgaaggta gtgacgggtg ctccttgaca tcaatggca cagaatatac catcgcaaaa  
 1081 gcaactcctg cgacaaccac tccagtagct ccgttaatcc ctgggtgggat tacttatcag  
 1141 gctacagtga gtaaagatgt agtattgagc gaaaccaaaag cggctgcccgc gacatcttca  
 1201 attaccttta attccggtgt actgagcaaa actattgggt ttaccgcggg tgaatccagt  
 1261 gatgctgcga agtcttatgt ggatgataaa ggtggatatca ctaacgttgc cgactataca  
 1321 gtctcttaca gcgttaacaa ggataacggc tctgtgactg ttgccgggta tgcttcagcg  
 1381 actgatacca ataaagatta tgctccagca attgggtactg ctgtaaatgt gaactccgcg  
 1441 ggtaaaatca ctactgagac taccagtgt ggttctgcaa cgaccaaccg gcttgcctgc  
 1501 ctggacgacg caatcagctc catcgacaaa ttccgttctt ccctgggtgc tatccagaac  
 1561 cgtctggatt ccgcagtcac caacctgaac aacaccacta ccaacctgtc cgaagcgcag  
 1621 tcccgattc aggacgccga ctatcgacc gaagtgtcca acatgtcgaa agcgcagatc  
 1681 attcagcagg ccggtaacct cgtgctggca aaagtaacc aggtaccgca gcaggttctg  
**1741 tctctgctgc agggtaa**

**Lampiran 6. Sekuensing Gen *Shiga toxin 2 Escherichia coli* O157:H7 *flicH7***

1 atgaagtgta tattatttaa atgggtactg tgectgttac tgggttttc ttcggtatcc  
 61 tattcccggg agtttacgat agacttttcg acccaacaaa gttatgtctc ttcgtaaata  
 121 agtatacggg cagagatata gacccctctt gaacatata ctcaggggac cacatcggtg  
 181 tctgttatta accacacccc accgggcagt tattttgctg tggatatac agggccttgat  
 241 gtctatcagg cgcgttttga ccatcttcgt ctgattattg agcaaaataa tttatatgtg  
 301 gccgggttcg ttaatacggc aacaaatact ttctaccgtt tttcagattt tacacatata  
 361 tcagtgccg gtgtgacaac ggtttccatg acaacggaca gcagttatac cactctgcaa  
 421 cgtgtcgcag cgctggaacg ttccggaatg caaatcagtc gtcactcact ggtttcatca  
 481 tatctggcgt taatggagtt cagtggtaat acaatgacca gagatgcatc cagagcagtt  
 541 ctgcgttttg tcaactgtcac agcagaagcc ttacgcttca ggcagataca gagagaattt  
 601 cgtcaggcac tgtctgaaac tgctcctgtg tatacagatga cgccgggaga cgtggaccte  
 661 actctgaact gggggcgaat cagcaatgtg cttccggagt atcggggaga ggatgggtgc  
 721 agagtgggga gaatatcctt taataatata tcagcgatac tggggactgt ggccgttata  
 781 ctgaattgcc atcatcaggg ggcgcgttct gttcgcgccg tgaatggaga gactcaacca  
 841 gaatgtcaga taactggcga caggcctgtt ataaaaataa acaatacatt atgggaaagt  
 901 aatacagctg cagcgtttct gaacagaaag tcacagtttt tatatacaac gggtaaataa  
 961 aggagttaag catgaagaag atgtttatgg cggttttatt tgcattagct tctgttaatg  
 1021 caatggcggc ggattgtgct aaaggtaaaa ttgagttttc caagtataat gaggatgaca  
 1081 catttacagt gaaggttgac gggaaagaat actggaccag tcgctggaat ctgcaaccgt  
 1141 tactgcaaag tgctcagttg acaggaatga ctgtcacaat caaatccagt acctgtgaat  
 1201 caggctccgg atttgctgaa gtcagttta ataatactg a

Lampiran 7. Grafik sekuensing

