

SKRIPSI

**DETEKSI *SHIGA TOXIN – PRODUCING Escherichia coli*
(STEC) PADA FESES SAPI DAN BABI
DENGAN TEKNIK HIBRIDISASI KOLONI**



Oleh :

LAKSYUDHA PRASETYO
MAGELANG – JAWA TENGAH

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

**DETEKSI SHIGA TOXIN – PRODUCING *Escherichia coli* (STEC) PADA
FESES SAPI DAN BABI DENGAN TEKNIK HIBRIDISASI KOLONI**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

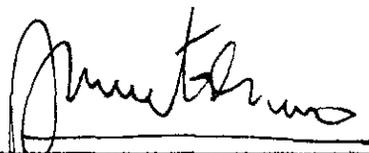
oleh

LAKSYUDHA PRASETYO

NIM 069912643

Menyetujui,

Komisi Pembimbing,



Dr. Hario P. Siswanto, M.App.Sc., Drh.
Pembimbing Pertama

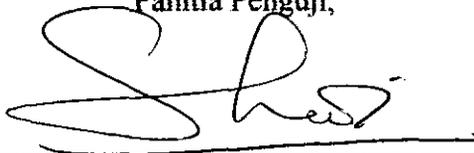


Benjamin CHR Tehupuring, M.S., Drh.
Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh – sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar **SARJANA KEDOKTERAN HEWAN**.

Menyetujui,

Panitia Penguji,

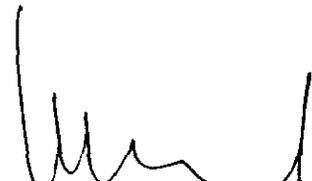


Dr. Susilohadi Widjajanto, M.S., Drh.

Ketua

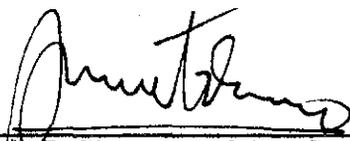


Hasutji Endah Narumi, M.P., Drh.



Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.

Sekretaris



Dr. Hario P. Siswanto, M.App.Sc., Drh.

Anggota



Benjamin CHR Tehupuring, M.S., Drh.

Anggota

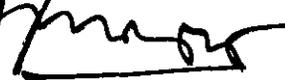
Anggota

Surabaya, 26 Mei 2004

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh.

NIP 130 687 297

**DETEKSI SHIGA TOXIN – PRODUCING *Escherichia coli* (STEC)
PADA FESES SAPI DAN BABI DENGAN TEKNIK
HIBRIDISASI KOLONI**

LAKSYUDHA PRASETYO

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri *Escherichia coli* dengan metoda MPN (Most Probable Number) dan untuk mendeteksi adanya strain STEC (*Shiga Toxin – Producing Escherichia coli*) diantara flora normal yang ada di dalam feses.

Penelitian yang dilakukan mulai bulan April sampai dengan Desember 2003 ini menggunakan sampel feses yang berasal dari sapi dan babi. Sebanyak 30 sampel feses sapi dan 30 sampel feses babi dilakukan pengujian terhadap bakteri Coliform dan *Escherichia coli* dengan metoda MPN. Deteksi terhadap STEC menggunakan teknik hibridisasi koloni dengan probe non radioaktif. Probe berasal dari kontrol positif, yaitu isolat DNA dari STEC Stx_{1,2} Jepang.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 30 sampel feses sapi kesemuanya adalah bakteri Coliform dan 25 diantaranya adalah bakteri *Escherichia coli*. Diantara 25 bakteri *Escherichia coli* tersebut, 11 adalah positif strain STEC. Sedangkan pada feses babi, 29 sampel adalah bakteri Coliform dan 27 diantara Coliform tersebut adalah bakteri *Escherichia coli*. Sejumlah 12 sampel dari bakteri *Escherichia coli* tersebut merupakan positif STEC.

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa dengan menggunakan teknik hibridisasi koloni dapat terdeteksi strain STEC pada feses sapi yang diambil dari peternakan sapi perah dan feses babi yang diambil dari rumah potong hewan. Hal ini berarti bahwa aspek kesehatan lingkungan harus lebih ditingkatkan lagi untuk pencegahan penyebaran dari strain STEC ini.

Kata kunci: STEC/VTEC, probe, hibridisasi koloni

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, atas berkat dan rahmat-Nya skripsi yang berjudul “Deteksi *Shiga Toxin – Producing Escherichia coli* (STEC) pada Feses Sapi dan Babi dengan Teknik Hibridisasi Koloni” dapat tersusun dan terlaksana.

Serangkaian penelitian telah penulis lakukan untuk mendeteksi adanya strain STEC (*Shiga Toxin – Producing Escherichia coli*) pada feses sapi dan babi. Manfaat dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi tentang keberadaan *Escherichia coli* strain STEC di RPH Pegirian Surabaya dan lokasi peternakan sapi perah di Sepanjang yang dapat digunakan sebagai peringatan bagi kita untuk selalu menjaga aspek higiene pada makanan terutama hasil ternak seperti daging dan susu. Materi skripsi ini disusun secara sistematis dengan harapan akan memudahkan bagi pembaca.

Penulis menyadari bahwa apa yang telah dilakukan dalam penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang berguna bagi penyempurnaan skripsi ini di masa yang akan datang. Penulis berharap semoga hasil yang telah dicapai dapat bermanfaat bagi pembaca dan dunia ilmu pengetahuan.

Surabaya, Mei 2004

Penulis

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini, dengan rasa hormat dan rasa tulus ikhlas penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.
2. Bapak Dr. Hario Puntodewo Siswanto, M.App.Sc., drh. selaku Dosen Pembimbing Pertama dan Bapak Benjamin CHR Tehupuring, M.S., drh. selaku Dosen Pembimbing Kedua yang selalu bersedia memberikan bimbingan, koreksi, saran dan nasehat yang sangat berguna.
3. Bapak Dr. Garry Cores de Vries, M.S., M.Sc., drh. selaku Dosen Pembimbing Penelitian yang telah memberikan kesabaran yang besar, waktu, ilmu serta pemahaman yang baik atas penelitian yang dilakukan.
4. Ibu, Bapak dan Kakak tercinta serta saudara – saudaraku atas dorongan semangat, motivasi, nasehat dan doa restunya yang selalu menyertai selama pendidikan sampai berakhir.
5. Keluarga besar Bapak Drs. Harsono Poespo Asmoro terutama yang tercinta, Ari, yang selalu tidak pernah lelah memberikan nasihat, kritik serta dukungan moral yang besar.
6. Teman penelitianku, Suharjono, yang selalu membantu dan menemani dalam suka dan duka selama kegiatan penelitian, seluruh dosen serta karyawan Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan atas saran dan kesempatan yang diberikan untuk melaksanakan penelitian ini.

7. Anggota ICI (Ahnu, Analis, Bobi, Ida, Kurniawan, Toni, Yongky), teman Band KKN yang selalu menghibur, Rianti, Sri Rejeki, Andre, Satrio, Sri Endah dan seluruh rekan mahasiswa FKH terutama angkatan 99, serta semua pihak yang tidak sempat penulis sebutkan yang telah memberikan bantuan serta perhatiannya.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Landasan Teori.....	3
1.3. Perumusan Masalah.....	4
1.4. Tujuan Penelitian.....	5
1.5. Manfaat Hasil Penelitian.....	5
1.6. Definisi Operasional.....	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Bakteri Coliform.....	7
2.2. Etiologi <i>Escherichia coli</i>	8
2.2.1. <i>Shiga Toxin – Producing Escherichia coli</i> (STEC).....	11
2.2.2. Patogenitas <i>Shiga Toxin – Producing</i> <i>Escherichia coli</i> (STEC).....	13
2.2.3. Metoda Diagnosa <i>Shiga Toxin – Producing</i> <i>Escherichia coli</i> (STEC).....	15

III. MATERI DAN METODA	
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	19
3.2. Bahan dan Alat Penelitian.....	19
3.2.1. Bahan Penelitian.....	19
3.2.2. Alat Penelitian.....	20
3.3. Metoda Penelitian.....	21
3.3.1. Persiapan Sampel.....	21
3.3.2. Pengujian Terhadap Bakteri Coliform.....	22
3.3.3. Pengujian Terhadap Bakteri <i>Escherichia coli</i>	22
3.3.4. Deteksi <i>Shiga Toxin – Producing Escherichia coli</i>	23
3.3.4.a. Tahap Inokulasi atau Penanaman Bakteri.....	23
3.3.4.b. Tahap Pra Hibridisasi.....	24
3.3.4.c. Tahap <i>Labeling</i> Probe DNA.....	25
3.3.4.d. Proses Hibridisasi.....	25
3.3.4.e. Tahap Pencucian dan Deteksi (<i>Post hybridization</i>).....	25
3.3.5. Perubahan Yang Diamati.....	26
3.3.6. Metoda Pencatatan Hasil Penelitian.....	26
IV. HASIL PENELITIAN.....	28
V. PEMBAHASAN.....	34
VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	39
RINGKASAN.....	40
DAFTAR PUSTAKA.....	42

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Nomenclature Dari Anggota Shiga Toxin.....	12
2. Model Pencatatan Hasil Pengamatan.....	27
3. Jumlah dan Rata – Rata Nilai MPN Coliform Pada Feses Babi dan Sapi.....	28
4. Jumlah dan Rata – Rata Nilai MPN <i>E. coli</i> Pada Feses Babi dan Sapi.....	28
5. Hasil Positif STEC Pada <i>E. coli</i> Babi.....	29
6. Hasil Positif STEC Pada <i>E. coli</i> Sapi.....	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Mekanisme Patogenitas Dari <i>E. coli</i>	15
2. Proses DNA DIG <i>labeling</i>	17
3. Petak – Petak Pada Plate Agar Untuk Penanaman Bakteri.....	24
4. Hasil Positif STEC Stx1 Pada sampel feses babi.....	30
5. Hasil Positif STEC Stx2 Pada sampel feses babi.....	31
6. Hasil Positif STEC Stx1 Pada sampel feses Sapi.....	32
7. Hasil Positif STEC Stx2 Pada sampel feses Sapi.....	33
8. Bagan Untuk Diagnosa STEC Secara Mikrobiologi Molekular.....	38

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Persiapan Sampel dan Pembuatan Media.....	45
2. Skema MPN.....	47
3. Tabel Mc Crady's.....	48
4. Data Hasil MPN Dari Feses Sapi.....	49
5. Data Hasil Deteksi STEC Pada <i>Escherichia coli</i> Isolat Feses Sapi...	51
6. Data Hasil MPN Dari Feses Babi.....	53
7. Data Hasil Deteksi STEC Pada <i>Escherichia coli</i> Isolat Feses Sapi...	55
8. Prosedur Hibridisasi Koloni.....	57
9. Foto Kegiatan Penelitian.....	62

BAB I
PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Escherichia coli, adalah salah satu spesies bakteri yang hidup di usus hewan dan manusia. Strain patogenik atau klon dari *Escherichia coli* telah bertambah banyak dan mengalami peningkatan kemampuan untuk dapat menyebabkan bermacam – macam penyakit pada manusia dan hewan (Nataro dan Kaper, 1998). Selama 20 tahun terakhir, kelompok baru dari *Escherichia coli* muncul dan diketahui dapat menyebabkan penyakit yang menyebabkan tingginya angka morbiditas pada manusia dan hewan dan bahkan pada beberapa kasus dapat menyebabkan mortalitas.

Salah satu kelompok baru tersebut adalah *Escherichia coli* yang dapat memproduksi toksin yang mirip dengan toksin yang dihasilkan *Shigella sp.* yaitu STEC (Shiga Toxin – Producing *Escherichia coli*) yang merupakan tipe lain dari EHEC (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*). STEC memproduksi toksin Stx1, Stx2 dan Stx₁₋₂. Stx dapat merusak sel endothelial yang terlihat pada H.C (Haemorrhagic colitic) (Tesh, 1991). Secara umum dapat menyebabkan penyakit yang mencakup diare berair, diare berdarah, dan sindrom urin berdarah (H.U.S = Haemolytic Uremic Syndrom). Sapi diyakini sebagai reservoir dari STEC dan dengan mengkonsumsi daging sapi yang tercemar dengan feses sapi dari tempat penyembelihan dan tidak dimasak secara sempurna dapat menjadi suatu faktor resiko terinfeksi yang sangat penting bagi manusia (Le Saux N *et al.*, 1993).

Satu contoh kasus yang terjadi di Spanyol pada tahun 2000 yaitu lima sekolah utama (satu di kota Barcelona dan empat lainnya berada di sekitar kota Barcelona). Total 158 orang (kebanyakan anak – anak usia dibawah 5 tahun) mempunyai gejala pada gastrointestinal dan 53 diantaranya positif STEC setelah didiagnosa fesesnya. Enam anak teridentifikasi penyakit H.U.S. Diyakini bahwa sosis yang terbuat dari daging babi dan disajikan oleh catering yang sama di sekolah tersebut tercemar dan bertanggungjawab atas kasus ini (Blanco *et al.*, 2003).

Menurut Miguel Blanco (1997), strain STEC dapat diidentifikasi dengan mendeteksi gen yang mengkode produksi toksin Stx menggunakan teknik hibridisasi DNA atau PCR (Polymerase Chain Reaction). Tetapi belum ada penelitian yang membandingkan nilai sensitivitas dan spesivitas dari teknik PCR dan hibridisasi DNA yang digunakan untuk mendeteksi Toksin Stx. Teknik PCR memerlukan waktu yang lebih singkat untuk mengidentifikasi daripada hibridisasi koloni namun penulis yang sebelumnya telah melakukan deteksi menggunakan teknik PCR, mengalami hambatan pada saat ekstraksi DNA *Escherichia coli* yang diduga positif STEC. Ekstraksi DNA memerlukan keahlian yang tinggi dan didukung oleh peralatan dan laboratorium yang memadai. Penggunaan teknik hibridisasi koloni ini menjadi pilihan peneliti karena membutuhkan keahlian yang sedikit lebih mudah dari pada PCR.

Melihat contoh kasus diatas, maka sangatlah penting untuk dilakukan suatu diagnosa atau melakukan pendeteksian dini terhadap STEC mengingat efek yang diakibatkan oleh infeksi STEC pada manusia maupun hewan sangat berbahaya.

Kesadaran masyarakat yang sangat kurang terhadap aspek higiene makanan serta kesehatan lingkungan juga merupakan faktor pendukung dari penyebaran STEC baik dari hewan ke hewan, hewan ke manusia dan manusia ke manusia.

1.2. Landasan Teori

Shiga Toxin – Producing *Escherichia coli* (STEC) adalah salah satu golongan strain dari *Escherichia coli* yaitu Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) yang memproduksi toksin seperti *Shigella sp.* (O`Brein *et al.*, 1983). Shiga Toxin – Producing *Escherichia coli* (STEC) adalah agen penting dari penyebab penyakit gastrointestinal pada manusia dan juga STEC dapat menyebabkan penyakit seperti Hemolytic Uremic Syndrom (HUS) (Nataro dan Kaper 1998). STEC adalah sebuah tipe dari EHEC yang dapat menyebabkan penyakit yang berhubungan dengan usus halus sampai dengan penyakit ginjal. Gejala klinis yang timbul adalah kejang perut, diare cair, sering berdarah dan demam.

E. coli diklasifikasikan berdasarkan hasil modifikasi serotype secara skematik dari Kauffman. Ada sejumlah antigen yang telah ditemukan yaitu antigen O (somatik), H (flagellar) dan K (kapsular). Serotype ini dirumuskan atas dasar kombinasi antigen O:H. Bagian yang unik dan membedakan ciri – ciri serotype STEC (O157:H7), jika dibandingkan dengan *E. coli* yang patogen lain adalah kemampuan memproduksi Shiga toksin (Stx) (Kaplan, 1998). Perbandingan rangkaian asam amino antara STEC dan *Shigella dysenteriae* type 1 adalah STEC membagi gen Stx menjadi Stx1 dan Stx2. Stx1 berbeda satu asam amino dan secara antigen tidak dapat dibedakan dengan shiga toksin dari *Shigella dysenteriae*

tipe 1 dan rangkaian gen Stx2 mempunyai 50% - 60% persamaan dengan Stx1 dengan shiga toksin dari *Shigella dysenteriae* tipe 1. STEC dapat memproduksi Stx1, Stx2, Stx1 dan Stx2 atau varian Stx2 lainnya. Struktur dari Stx adalah A-B toksin dapat yang menghambat sintesa protein. Subunit A berperan sebagai ribosomal RNA N-glycosidase, membelah adenin dari ribosomal RNA (28s rRNA) pada tempat dimana faktor pemanjangan (elongation factor) dari aminoacyl tRNA berada.

Menurut Beutin (1993), sapi dan domba adalah reservoir utama dari STEC, tetapi STEC pernah dapat diisolasi dari rusa, kuda, babi, anjing dan burung. Feses dari hewan – hewan tersebut dapat bertindak sebagai media penyebaran STEC.

Escherichia coli yang mempunyai rentangan DNA (*genomic DNA*) sebesar $4,2 \times 10^6$ bp ini memungkinkan didiagnosa menggunakan teknik hibridisasi koloni. Diketahui bahwa dua rantai nukleotide yang komplementer (pasangan) dapat membentuk bentukan heliks ganda jika diinkubasi pada suhu 65°C , dan peristiwa ini dikenal sebagai hibridisasi. Reaksi hibridisasi ini dapat terjadi antara dua rantai nukleotide tunggal yang komplementer sehingga membentuk suatu *homodupleks* (DNA dengan DNA atau RNA dengan RNA) (Safitri, 1999).

1.3. Perumusan Masalah

Apakah diantara flora normal coliform dan *Escherichia coli* di dalam feses terdapat *Escherichia coli* yang memproduksi toksin Shiga / STEC (Shiga Toxin – Producing *Escherichia coli*)?

1.4. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

- Mengisolasi, identifikasi dan menghitung jumlah bakteri *Escherichia coli* dengan metoda MPN (Most Probable Number)
- Mendeteksi adanya strain STEC (Shiga Toxin – Producing *Escherichia coli*) diantara flora normal yang ada di dalam feses dengan teknik hibridisasi koloni yang non radioaktif.

1.5. Manfaat Hasil Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang keberadaan *Escherichia coli* golongan STEC (*Shiga Toxin – producing Escherichia coli*) di RPH Pegirian Surabaya dan lokasi peternakan sapi perah di Sepanjang – Sidoarjo yang dapat digunakan sebagai peringatan bagi kita untuk selalu menjaga aspek hygiene pada makanan terutama daging dan susu yang akan dikonsumsi. Juga menginformasikan bahwa semakin bertambahnya strain bakteri yang dapat menginfeksi manusia (bersifat zoonosis).

1.6. Hipotesis

Berdasarkan hal – hal tersebut diatas, maka peneliti menyusun beberapa hipotesis, yaitu:

- 1) Adanya bakteri Coliform dan *Escherichia coli* pada isolasi sampel feses sapi dan babi dengan metoda MPN.

- 2) Strain STEC dapat diidentifikasi dengan menggunakan metoda hibridisasi koloni.

1.7. Definisi Operasional

Probe dalam hibridisasi koloni adalah rantai tunggal dari asam nukleat (DNA) dengan suatu urutan nukleotid yang sudah diketahui dan diberi *label* secara non radioaktif dan digunakan untuk menemukan dan menandai urutan DNA (komplemen dari DNA tersebut) tertentu yang ingin dicari (Hyperdictionary, 2002). Probe ini berisi DNA sampel positif STEC (*DNA template*). Digoxigenin (DIG) adalah senyawa steroid haptent¹ yang berfungsi sebagai *label* non radiokatif. DIG dihubungkan dengan uridine – nukleotide (dUTP) melalui ikatan alkali – labile ester. Enzim Klenow berfungsi untuk mensintesis rantai DNA baru sebagai komplemen dari *DNA template* yang telah didenaturasi menjadi rantai tunggal. Tugas enzim Klenow dalam mensintesis rantai DNA komplemen dibantu oleh DIG.

Larutan warna NBT/ BCIP (*nitroblue tetrazolium/ 5-Bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate*) akan berikatan dengan anti-DIG-AP pada probe yang telah di *label* oleh DIG dan akan memberikan reaksi warna biru gelap/ hitam pada membran filter.

¹ Antigen tidak lengkap yang tidak dapat menimbulkan zat anti tapi dapat menetralsasi zat anti spesifik.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri Coliform

Jawetz *et al.*, (1980) menyatakan bahwa bakteri coliform adalah kelompok bakteri yang hidup aerob atau fakultatif anaerob, bersifat Gram negatif, berbentuk batang yang pendek, tidak berspora dan pada lingkungan yang tidak cocok akan membentuk filamen yang panjang. Bakteri Coliform umumnya tidak menimbulkan penyakit dan merupakan flora normal pada usus manusia dan hewan bahkan dapat membantu fungsi pencernaan dalam usus. Bakteri ini menjadi patogen bila mencapai jaringan diluar saluran pencernaan dan berada pada organ tubuh lainnya; seperti paru – paru, peritonium, saluran perkemihan dan selaput otak; maka akan menyebabkan peradangan pada organ tersebut, terutama pada individu yang berdaya tahan tubuh rendah, misalnya pada bayi, pada usia lanjut, dan pada orang yang baru sembuh dari sakit.

Bakteri Coliform dibedakan dari dua kelompok yang dibedakan dari kecepatannya memfermentasi laktosa. Kelompok yang memfermentasi laktosa dengan cepat terdiri dari tiga genera, yaitu : *Escherichia*, *Klebsiella*, dan *Enterobakter*. Kelompok yang memfermentasi laktosa dengan lambat terdiri dari lima genera, yaitu : *Edwardsiella*, *Serratia*, *Citobacter*, *Erwinia*, dan *Paracolon* atau *Arizona*.

2.2. Etiologi *Escherichia coli*

Nama bakteri *Escherichia coli* adalah diambil dari nama seorang doktor dari Austria, Theodor von Escherich (1857 – 1911), yang pertamakali mengisolasi bakteri yang hidup normal pada saluran pencernaan manusia dan hewan yang termasuk famili enterobacteriaceae. *Escherichia coli* adalah bakteri golongan Gram negatif, berbentuk batang, fakultatif anaerob, mempunyai flagella untuk alat gerak dan tidak membentuk endospora.

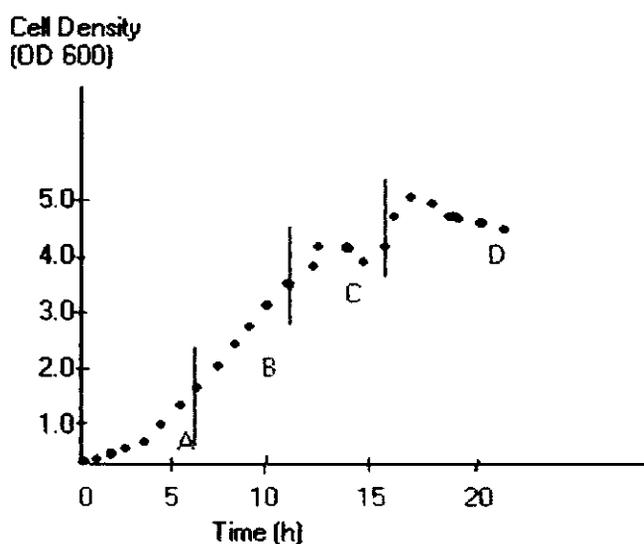
Taksonomi dari *Escherichia coli* (Prescott dan Klein, 1999) adalah:

Kingdom	: Eubacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: γ - proteobacteria
Order	: Enterobacteriales
Family	: <i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

Menurut Buckle *et al.*, (1979), *Escherichia coli* dapat tumbuh pada media yang hanya mengandung sumber nitrogen seperti $(\text{NH}_3)\text{SO}_4$ dengan mineral lainnya dan pertumbuhannya dapat dilihat pada suhu 37^0 C selama 24 – 48 jam. Pada media Eosin Methylen Blue Agar (EMBA) membentuk koloni berwarna hijau metalik dengan pusat koloni kehitam – hitaman, berdiameter dua sampai empat milimikron (Hofstad *et al.*, 1980).

Pertumbuhan *Escherichia coli* pada media *in vitro* dapat dibagi menjadi beberapa fase yang digambarkan pada sebuah kurva pertumbuhan. Fase Lag

terjadi setelah pencampuran dilakukan antara koloni bakteri dengan media yang masih baru. Pembelahan sel terjadi lambat karena bakteri masih menyesuaikan diri dengan media yang baru. Setelah empat sampai lima jam bakteri memasuki masa Logaritmik, dimana bakteri tumbuh secara eksponensial. Ketika bahan - bahan nutrisi pada media sudah habis, bakteri akan memasuki fase Stasioner setelah 16 jam. Kemudian bakteri memasuki tahap deklinasi (penurunan), ketika sel mulai lisis dan jumlah bakteri yang sehat akan turun, dan DNA sebagian mengalami degradasi. (grafik 1).



Grafik 1. Pertumbuhan *E coli* pada LB broth. (A) Fase Lag, (B) Fase Logaritmik, (C) Fase Stasioner, (D) Fase Deklinasi. (Bench Guide, 2001).

Menurut Todar (2002), pada *Escherichia coli*, terdapat pembagian sesuai dengan infeksi yang terjadi. Saat ini, terdapat kelompok *Escherichia coli* yang dibedakan menurut karakteristik dan infeksinya terhadap gastrointestinal, antara lain:

- Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC): EPEC dapat menyebabkan diare berair yang serupa dengan ETEC, tetapi tempat kolonisasinya berbeda dan tidak menghasilkan ST (Heat – Stable Toxin) atau LT (Heat – Labile Toxin) toksin. Walaupun tidak menghasilkan LT atau ST toksin, EPEC menghasilkan suatu enterotoksin serupa dengan *Shigella*.
- Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): Sering terjadi pada turis yang datang pada suatu daerah baru (Travellers diarrhoea), bayi, remaja atau pada negara – negara yang belum berkembang. ETEC diperoleh akibat mengkonsumsi makanan yang tercemar. Bakteri ini akan bertahan pada mucosa usus, dapat menghasilkan toksin. Ada toksin yang tahan atau stabil pada suhu panas (ST) dan tidak stabil terhadap pemanasan (LT). LT enterotoksin mempunyai struktur dan infeksi yang hampir serupa dengan toksin pada kolera. Gejala infeksi dari ETEC adalah diare tanpa adanya demam. ETEC menyerang saluran pencernaan dengan pertolongan fimbriae dan memproduksi LT maupun ST toksin.
- Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC): Mempunyai mekanisme patogenik dan gejala klinis seperti *Shigella spp.* EIEC menembus sel epitel colon dan dapat menyebabkan kerusakan yang meluas. Gejala klinis yang timbul hampir serupa dengan disentri *Shigella* yang disertai dengan demam. EIEC tidak menghasilkan LT atau ST toksin.
- Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): EHEC merupakan strain tunggal (O157:H7 serotype) yang menyebabkan sindrom diare yang berbeda dari EIEC yaitu diare berdarah yang banyak dan tidak menimbulkan demam.

EHEC sering mengancam pada organ ginjal seperti gagal ginjal akut, dapat memproduksi Shiga Toxin. Pernah menjadi wabah pada tahun 1992 di Amerika (pencemaran pada hamburger dan minuman sari buah apel).

- Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): *Traveller's diarrhoea*, mekanisme patogeniknya menyebabkan pencegahan penyerapan cairan pada lumen usus. Bersifat non invasif, menghasilkan ST toksin, menyebabkan inflamasi dan tanpa gejala demam.

Bettelheim (1999) menyatakan bahwa pembagian serotype didasarkan pada tiga kelas antigen yang digambarkan sebagai berikut:

- Antigen O: Adalah antigen somatik yang masih stabil pada suhu 100⁰C.
- Antigen H: Adalah antigen flagella yang inaktif pada suhu 100⁰C.
- Antigen K: Adalah antigen somatik yang dapat membentuk amplop, lapisan pelindung atau kapsul. Antigen ini bertindak sebagai penutup untuk antigen O.

E. coli O157:H7 adalah salah satu dari ratusan strain *E. coli*. Walaupun sebagian besar dari strain tersebut tidak berbahaya dan menjadi flora normal pada hewan dan manusia yang sehat, strain *E. coli* O157:H7 ini menghasilkan suatu toksin yang kuat dan dapat menyebabkan penyakit yang parah. *E. coli* O157:H7 pertama kali di ketahui pada tahun 1982, yaitu saat terjangkitnya wabah diare berdarah yang dikarenakan hamburger yang terkontaminasi yaitu daging sapi yang tidak sempurna pemanasannya atau tidak matang.

2.2.1. Shiga Toxin – Producing *Escherichia coli* (STEC)

Istilah verotoxin menunjuk pada kemampuan toxin untuk menyebabkan kerusakan pada sel Vero (sel ginjal pada *American Green Monkey*). Kemudian oleh O'Brien (1987) melakukan purifikasi dan karakterisasi verotoxin menemukan bahwa struktur dan aktivitas biologi dari verotoxin serupa dengan Shiga Toxin (Stx) yang diproduksi oleh *Shigella dysenteriae* tipe 1 sehingga menghasilkan tata nama yang baru yaitu *Shiga – like Toxin* (SLT). Penemuan subsequent dari jenis utama SLT atau VT yaitu SLT-1 dan SLT-2 (VT-1 dan VT-2) menyebabkan Calderwood *et al.*, (1996) membuat suatu tata nama (nomenklatur) dalam sebuah tabel.

Nomenklatur Lama	Nomenklatur Baru	
	Gen	Protein
Shiga toxin (Stx)	<i>Stx</i>	Stx
Shiga-like toxin I (SLT-1) or Verotoxin1 (VT1)	<i>Stx₁</i>	Stx1
SLT – II or VT2	<i>Stx₂</i>	Stx2
SLT – IIc or VT2c	<i>Stx_{2c}</i>	Stx2c

Tabel 1. Nomenclatur dari anggota Shiga Toxin (Calderwood *et al.*, 1996)

Toksin yang diproduksi oleh STEC dapat berubah – ubah. STEC dapat memproduksi Stx1, Stx2 atau kedua Stx1 dan Stx2.

Stx1 terdiri dari suatu subunit A dengan berat molekul 33 kDa dan lima subunit B dengan berat molekul masing – masing 7,5 kDa. Subunit B berbentuk seperti donat dengan pori –pori di pusatnya. Proteolisis dan reduksi dari subunit A

menghasilkan suatu fragmen N-terminal A1 yang besar dimana aktivitas enzimatis terjadi dan suatu fragement C-terminal A2. Subunit B mengenali sel reseptor yang spesifik sebagai sel target. Sel yang peka untuk Stx1 adalah globotriasyleramide (gb3). Sel ini terdapat banyak dalam sel epitel ginjal manusia dan hewan, eritrosit dan mungkin tempat lain. Peran gb3 pada keadaan normal belum banyak diketahui.

Stx2 adalah toksin yang hampir mirip dengan Stx1 dalam struktur, *mode of action* (m.o.a) dan karakteristik biokimia secara umum. Hanya saja terdapat perbedaan pada rangkaian asam aminonya. Reseptor untuk Stx2 juga gb3 tetapi daya mengikat dari Stx2 kurang dari Stx1 (Tsuji. *et al.*, 1995).

2.2.2. Patogenitas Shiga Toxin – Producing *Escherichia coli*

STEC O157:H7 mempunyai 35 – 34 kb bagian patogenisitas yang antara lain *Locus of Enterocyte Effacement* (L.E.E) yang menyandi sistem sekresi tipe III, *Translocated Intimin Receptor* (TIR) dan *Outer Membrane Protein* (OMP). Ketiganya berpengaruh dalam pengikatan pada sel epitel usus (Perna *et al.*, 1998).

Gen *eae*, yang terletak pada L.E.E, menyandi 94 – 97 kDa Intimin yang membantu dalam perlekatan bakteri pada sel epitel mukosal hingga disebut mempunyai efek AE (*attaching and effacing*). AE dikarakterisasi dengan melihat kemampuan dalam merusak sel epitel usus dan menandai sel mukosa cytoskeletal sebagai tempat untuk perlekatan bakteri. Ketika STEC menempel pada membran sel target, molekul toksin akan masuk melalui mekanisme reseptor endositosis (Sandvig dan Van Deurs, 1996). Dalam waktu yang singkat, STEC terlapisi oleh

pelindung yang disekresikan dari gen Stx. Jalur – jalur yang dilewati oleh STEC (intracellular) akan mengalami perubahan biologis (struktur maupun fungsinya) dari Stx.

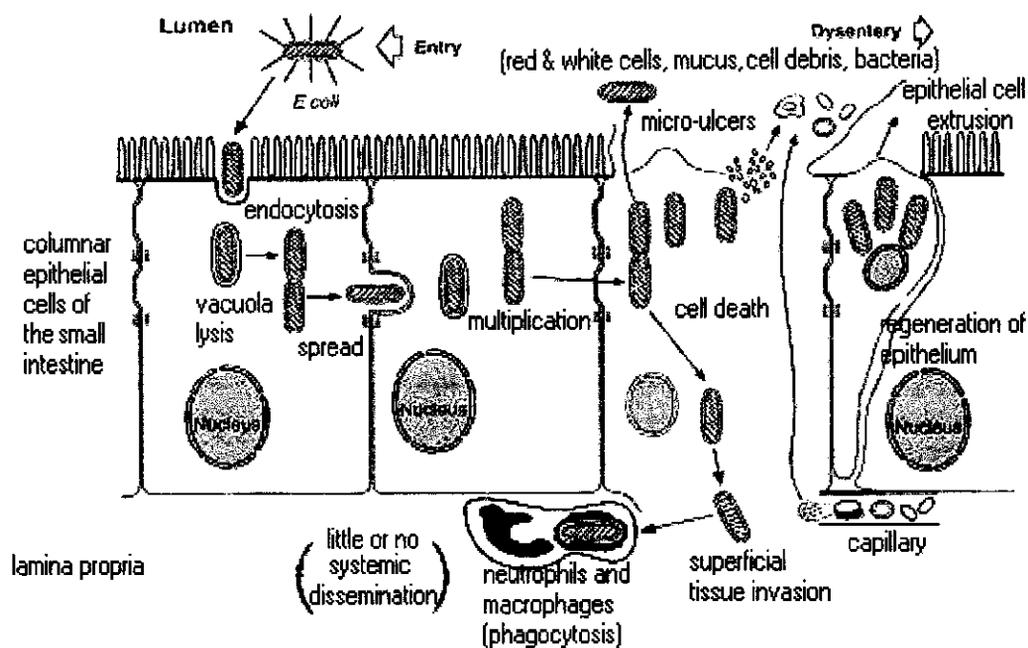
Menurut Leyer (1995), salah satu keistimewaan dari strain STEC adalah mempunyai resistensi pada kadar keasaman perut. Telah diketahui bahwa beberapa bakteri usus, termasuk *E coli*, pada pH rendah berpengaruh pada respon terhadap toleransi asam dan hal ini menunjukkan terjadinya peningkatan STEC yang dapat hidup dalam makanan yang asam.

Secara umum STEC mempunyai efek luka secara histopatologi yaitu karena interaksi Stx dengan sel endothelial dan berhubungan dengan penyakit *Hemorrhagic colitis* (HC) dan *Hemolytic Uremic Syndrome* (HUS). Penampakan yang khas dari HUS meliputi kebengkakan dan pelepasan sel endothelial glomerular, juga terjadi pengendapan fibrin pada mikro vaskular dari ginjal (terutama pada glomerulus). Aliran darah yang tidak lancar ke arah ginjal dan juga aliran darah di dalam ginjal dapat menyebabkan kerusakan pada sel darah merah. *Thrombotic Thrombocytopenic Purpura* (TTP)² juga dapat terjadi pada mikro vaskular saluran usus, otak dan pankreas (Paton dan Paton, 1998).

Manusia dapat terinfeksi dengan STEC jika mengkonsumsi makanan yang tercemar atau transmisi langsung dari hewan atau manusia yang terinfeksi STEC. Daging sapi yang kurang matang dan susu mentah dapat juga sebagai media transfer infeksi (foodborne infection). Patogenitas dari STEC secara umum dipengaruhi oleh beberapa faktor (multi factorial) dan melibatkan level interaksi

² Penyakit yang ditandai dengan trombositopenia, anemia, manifestasi neurologis, azotemia, demam dan trombosis pada pembuluh kapiler serta arterial terminalis.

antara bakteri dan host. Hal ini termasuk keadaan flora dalam usus, tingkat diare dan luka pada usus, penyerapan STEC dan interaksi antara toksin dengan jaringan pada host, respon inflamasi dan gangguan fungsi pada sel endotelial (Paton dan Paton, 1998).



Gambar 1. Mekanisme patogenitas dari *E. coli* (Doyle dan Dolores, 1995)

2.2.3. Metoda Diagnosa Shiga Toxin – Producing *Escherichia coli*

Ada berbagai kesulitan yang berhubungan dengan cara diagnosa infeksi dari STEC. Pada awal infeksi, kemungkinan terdapat banyak STEC dalam feses dan hampir 90% dari flora dalam feses. Prosedur diagnosa didasarkan pada pendeteksian keberadaan gen *Stx* atau *Stx* dalam feses. Karena setiap prosedur berbeda dalam kompleksitas, kecepatan, kepekaan dan biaya maka strategi

diagnostik harus dikhususkan kepada keadaan klinis dan tersedianya sampel yang ada (Paton, 1996).

Koloni Hibridisasi Dengan Probe Nonradioaktif

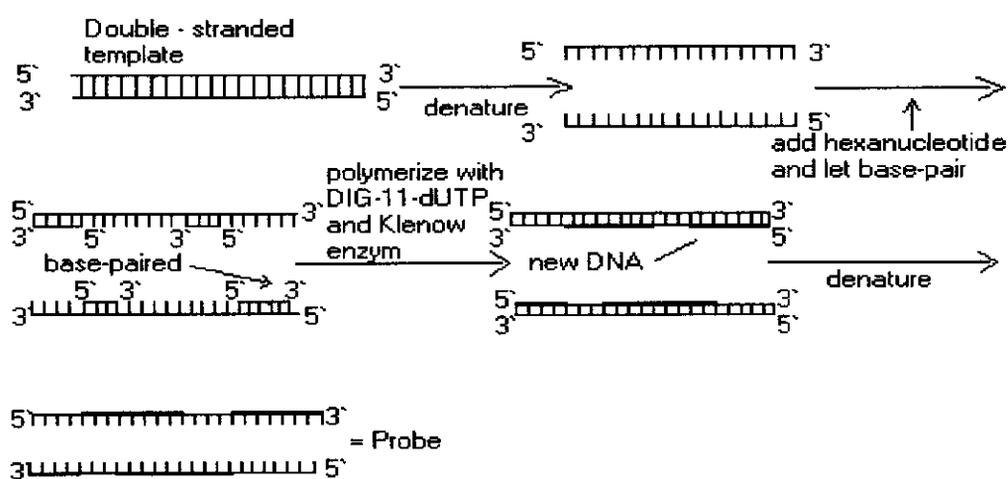
Adanya gen *Stx1* dan *Stx2* memungkinkan pengembangan pemeriksaan DNA untuk pendeteksian STEC. Pada awalnya, pemeriksaan dengan probe berlabel 32P dan 35S telah digunakan untuk menguji feses yang mengandung *E. coli* atau pemeriksaan screening gen *Stx* dengan koloni hibridisasi. Prosedur ini mempunyai tingkat sensitivitas dan spesifitas yang tinggi sehingga gen *Stx1* dan *Stx 2* dapat dibedakan. Bagaimanapun, pemeriksaan yang menggunakan probe yang berlabel radioaktif mempunyai kerugian laboratorium, antara lain waktu paruh dari probe yang pendek dan bermasalah dengan penanganan dan pembuangan dari radioisotopnya. Sekarang, permasalahan ini bisa di atasi dengan pengenalan probe yang berlabel nonradioaktif seperti digoxigenin dan biotin, dan *Stx* probe nonradioaktif telah digunakan untuk pendeteksian STEC tanpa berkurangnya nilai sensitivitas atau spesivitas (Thomas *et al.*, 1991).

Brown *et al.*, (1989) mengatakan oligonukleotid buatan dapat dibuat dengan tersedianya data dari rangkaian nukleotid untuk gen *Stx* dan dapat digunakan untuk pendeteksian STEC. Beberapa dari probe oligonukleotid didasarkan atas sekuensing beberapa gen penyandi toksin sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi berbagai tipe toksin.

Koloni hibridisasi adalah suatu teknik laboratorium genetika yang digunakan untuk mengidentifikasi atau mendeteksi suatu koloni bakteri pada permukaan agar yang mengandung rantai DNA tertentu atau gen tertentu. Teknik ini memerlukan

membran nitroselulosa yang diletakkan di permukaan Agar sehingga setiap koloni dapat menembus membran, kemudian membran tersebut mendapatkan perlakuan pemberian bahan kimia dan pemanasan, pemberian probe yang telah dilabel untuk menemukan rangkaian DNA yang cocok. Teknik ini sering digunakan untuk pembuatan kumpulan data tentang suatu gen (HyperDictionary, 2000).

Prinsip dasar dari teknik ini adalah pencarian secara random rantai DNA tertentu dengan probe (pelacak) DNA yang terlebih dahulu sudah dilakukan labeling (pemberian tanda atau identitas pada probe yang bersifat komplementer). Teknik ini mempunyai lima tahap utama, yaitu tahap inokulasi atau penanaman bakteri, tahap pra hibridisasi, tahap labeling probe DNA, tahap hibridisasi dan tahap post hibridisasi (pencucian dan deteksi). Tahap *labeling* sangat menentukan keberhasilan dari teknik ini. DNA pelacak di denaturasi menjadi rantai tunggal (single strand) dan direkatkan dengan hexanucleotid secara random. Kemudian digunakan Klenow enzyme untuk mensintesis pasangan rantai baru dari DNA pelacak.



Gambar 2. Proses DNA DIG Labeling (MIT Hypertextbook, 2000).

Proses di atas diawali dengan melakukan proses denaturasi pada rantai oligonukleotid (rantai pendek) dari DNA sampel positif STEC. Pemanasan pada suhu $95^{\circ}\text{C} - 98^{\circ}\text{C}$ selama 1 sampai 2 menit akan menyebabkan rantai ganda DNA menjadi rantai tunggal yang kemudian harus difiksasi dengan cepat pada suhu dingin agar rantai tidak kembali menjadi ganda. Penambahan hexanukleotid dan enzim Klenow akan mensintesis rantai baru sebagai komplemen dari rantai DNA yang telah didenaturasi menjadi rantai tunggal. Pada proses sintesa rantai baru ini penambahan DIG adalah sebagai *label* yang akan menandai masing – masing rantai DNA yang baru yang akan berikatan dengan zat warna pada saat proses pencucian dan pembacaan hasil positif. Proses *labeling* ini akan berlangsung selama satu jam sehingga akan didapatkan rantai tunggal oligonukleotid yang sudah di *label* dalam jumlah yang besar.

BAB III
MATERI DAN METODE

BAB 3

MATERI DAN METODA

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel feses dilakukan di RPH Pegirian Surabaya pada kandang babi dan feses sapi di peternakan sapi perah Sepanjang - Sidoarjo. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekular Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya untuk tingkat molekular dan Bagian Kesmavet (Kesehatan Masyarakat Veteriner) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya untuk tingkat selluler.

Waktu pelaksanaan penelitian ini dimulai 17 April 2003 sampai dengan 31 Desember 2003.

3.2. Bahan dan Materi Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu untuk pengambilan dan penanaman sampel digunakan media LB (Luria Bertani) broth 1% sebagai media *enrichment*. Kemudian untuk media selektif digunakan media BGGB (*Briliant Green Bile Broth*) untuk menseleksi hanya bakteri coliform yang akan membentuk gas dan merubah warna media. EMBA (*Eosin Methylen Blue Agar*) digunakan untuk melihat bentuk spesifik atau khusus yang berwarna hijau metalik dari koloni *E. coli*. Reagen Kovack's untuk Indol Test. Glycerin 1% digunakan untuk pembuatan stock *E. coli* yang akan disimpan dalam *freezer*.

Bahan untuk proses koloni hibridisasi yaitu untuk mendeteksi *Shiga Toxin – producing Escherichia coli* (STEC) digunakan membran filter (Hybond-N+, Amersham) yang digunakan untuk penanaman koloni bakteri. SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 10% digunakan untuk proses melisiskan sel – sel bakteri setelah proses inkubasi 24 jam. 1,5M NaCl dan 0,5 NaOH untuk proses denaturasi. Tris-HCl (Hydroxymethyl) 0,5M dan 1,5M NaCl berfungsi untuk proses netralisasi. Berbagai konsentrasi dari SSC (Sodium Sahlin Citrat) yaitu 20M, 5M, 2M, dan 0,1M untuk proses pencucian membran filter.

Untuk proses *labelling*, probe yang digunakan yaitu oligonucleotid dari GIBCO BRL 5' - ACCAgAgATgCATCAAg – 3' untuk deteksi Shiga Toxin 1 (ST1) dan 5' - TTTACgATAgACTTTTCgAC – 3' untuk deteksi Shiga Toxin 2 (ST2). dNTP *labelling mixture* (dari Boehringer Mannheim) yang berisi dATP, dCTP, dGTP dan DIG-dUTP yang dibantu oleh enzim Klenow akan menggabungkan antara nukleotide pada DNA sampel yang telah di denaturasi menjadi *single stranded* (ss) dengan probe yang sudah dilabel ST1 dan ST2.

Larutan warna NBT/BCIP (*nitroblue tetrazolium/ 5-bromo 4-cloro 3-indoly phosphate*) berfungsi untuk *colorimetric detection*. Jadi hasil positif akan terlihat dengan adanya warna biru gelap. Bahan yang lain yaitu aquadest dan alkohol 70% dan 96%.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *cotton bud* yang sudah disterilisasi dengan autoclave untuk pengambilan sampel. Cawan Petri untuk

media agar dan tabung reaksi untuk BGGB dan indol test. Tabung microtube dengan kapasitas 2cc dan 1,5cc digunakan untuk penyimpanan stock bakteri *E. coli* dan untuk melakukan proses DNA *labelling*. *Microcentrifuge* untuk sentrifugasi probe dengan kecepatan 10.000 rpm. Mikropipet untuk menambahkan bahan – bahan dengan volume yang sangat kecil dan untuk melakukan pengenceran. Kertas Whatman 3MM untuk proses penjuhan membran filter. Stirrer plate dengan suhu yang dapat dirubah berfungsi sebagai homogenizer bahan – bahan yang sedikit sulit untuk tercampur dan memerlukan suhu untuk mempercepat prosesnya. Ose untuk melakukan streak pada permukaan media. *Waterbath* untuk melakukan proses koloni hibridisasi dengan suhu 62⁰C. Inkubator untuk melakukan proses inkubasi bakteri.

3.3. Metoda Penelitian

3.3.1. Persiapan Sampel

Sampel feses babi diambil dari RPH Pegirian Surabaya dan feses sapi dari peternakan sapi perah Sepanjang dan diambil dengan sistim *fecal drop* (mengambil sampel pada saat defekasi atau saat feses baru dikeluarkan) dan feses yang diambil dari hewan dengan cara random.

Jumlah sampel dengan berat masing – masing 1gram yang diambil yaitu 30 dari sapi dan 30 buah dari babi. Pengambilan sampel menggunakan *cotton bud* yang sudah distreril. Kemudian sampel diinkubasi pada media LB Broth selama satu hari dengan suhu 37⁰C. Sampel yang berasal dari babi selanjutnya akan diberi kode “P” (*pig*) dan sampel dari sapi diberi kode “C” (*cow*).

3.3.2. Pengujian Terhadap Bakteri Coliform

Pengujian ini menggunakan prosedur MPN (*Most Probable Number*) dengan tabel Mc Crady's. MPN dilakukan untuk menseleksi bakteri koliform dari feses sampel. Prinsip dari metoda ini yaitu menggunakan media cair dalam tabung reaksi, perhitungan dan pemilihan dilakukan berdasarkan jumlah tabung positif yaitu yang terlihat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu.

Untuk setiap pengenceran digunakan lima tabung reaksi. Dalam metoda MPN ini, pengenceran diawali dengan 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} hingga 10^{-7} (lampiran 2). Setiap pengenceran diinokulasikan kedalam lima tabung reaksi berisi 5ml BGGB. Kemudian masing – masing tabung reaksi dimasukkan tabung Durham secara terbalik untuk menangkap gas yang diproduksi oleh bakteri. Tabung reaksi tersebut diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Jika setelah inkubasi terdapat produksi gas maka diperkirakan positif Coliform. Diperlukan pengujian selanjutnya yaitu dengan menginokulasikan tabung yang positif pada media EMBA (Eosin Methylen Blue Agar), kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam. Koloni khas dari koliform adalah bagian tengah berwarna merah gelap dengan bagian tepi transparan.

3.3.3. Pengujian Terhadap Bakteri *Escherichia coli*

Pengujian ini sama dengan metoda MPN, hanya saja setelah inkubasi pada media BGGB suhu 37°C selama 24 jam diteruskan dengan menginokulasi tabung

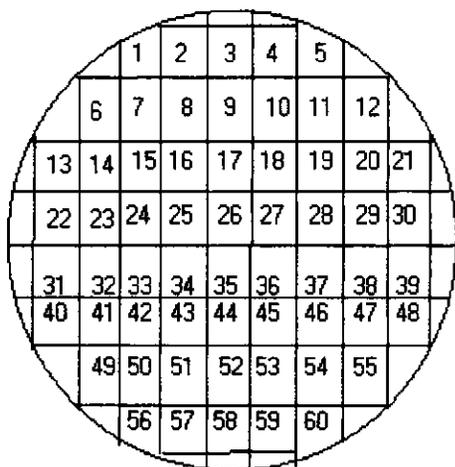
yang positif (terdapat gelembung gas) pada media BGGB dengan suhu 44,5°C selama 24 jam. Setiap tabung yang menunjukkan produksi gas, diduga positif *E. coli*. Inokulasi dengan cara streak dari tabung yang positif pada media EMBA, inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni khas akan terlihat yaitu koloni berwarna hijau metalik. Untuk meyakinkan bahwa koloni tersebut benar – benar *E. coli*, dilakukan inokulasi koloni khas tersebut pada Tryptone water, inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu dilakukan Indol Test dengan meneteskan reagen Kovack, hasil positif akan terlihat bila terdapat cincin merah muda pada permukaan media.

3.3.4. Deteksi Shiga Toxin - producing *Escherichia coli*

Deteksi Shiga Toxin - producing *Escherichia coli* (STEC) menggunakan metoda koloni hibridisasi. Metoda ini secara garis besar dibagi menjadi lima tahap, yaitu tahap inokulasi atau penanaman bakteri, tahap pra hibridisasi, tahap labeling probe DNA, tahap hibridisasi dan tahap post hibridisasi (pencucian dan deteksi).

3.3.4.a. Tahap Inokulasi atau Penanaman Bakteri

Membran filter (Hybond-N+) diletakkan diatas permukaan media LB agar dan harus dihindarkan dari gelembung udara. Kemudian dilakukan penanaman bakteri di atas permukaan membran filter. Penanaman sesuai dengan urutan petak – petak pada permukaan membran filter. (gambar 3.). Kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.



Gambar 3. Petak – petak pada plate agar untuk penanaman bakteri

3.3.4.b. Tahap Pra Hibridisasi

Filter yang sudah di tumbuh koloni diambil dan diletakkan pada permukaan kertas Whatman 3MM yang sudah dibasahi dengan 10% SDS selama 3 menit. Kemudian filter dipindahkan ke kertas Whatman kedua yang dibasahi 0,5M NaOH dan 1,5M NaCl selama 5 menit. Pindah filter ke kertas Whatman ketiga yang sudah dibasahi 1,5M NaCl dan 0,5M Tris-HCl selama 5 menit. Yang terakhir yaitu filter dipindahkan pada kertas Whatman dengan 2x SSC selama 5 menit. Setelah itu, filter dikeringkan pada suhu kamar selama 30 menit. Proses fiksasi DNA dilakukan dengan memanaskan filter pada suhu 80°C selama 2 jam.

Kemudian filter direndam ke dalam 2x SSC selama 5 menit. Pindahkan filter pada baki yang berisi 50 ml larutan *pre washing* (5x SSC; 0,5% SDS; 1mM EDTA, pH 8,0), inkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Sisa – sisa sel bakteri yang masih menempel dibersihkan dengan larutan *pre washing*. Pindahkan filter

ke dalam kantong plastik, tambahkan 15ml larutan Hyb-mix, inkubasi pada suhu 62⁰C pada waterbath selama 1 – 2 jam dengan digoyang pelan.

3.3.4.c. Tahap *Labeling* Probe DNA

Proses *labeling* diawali dengan pemanasan DNA template pada suhu 95⁰C selama 10 menit untuk proses denaturasi kemudian cepat dipindahkan ke baki es. Kemudian ditambah probe dengan label non radioaktif (Digoxigenin-11-dUTP) dan enzim Klenow, inkubasi selama 1 jam pada suhu 37⁰C, tambahkan 0,2M EDTA. Presipitasi DNA yang sudah di label dengan 4M LiCl dan ethanol dingin, inkubasi pada suhu -20⁰C selama 2 jam. Sentrifus dengan kecepatan 11.000 rpm selama 15 menit kemudian bilas pelet DNA dengan ethanol 70%. Pelet DNA dikeringkan dan dilarutkan dengan bufer TE (Boehringer Mannheim, 2000).

3.3.4.d. Proses Hibridisasi

Probe yang sudah siap dipakai ditambahkan ke dalam filter yang sedang direndam dalam larutan Hyb-mix. Proses ini berlangsung selama 1 hari dan di inkubasi pada penangas air dengan suhu 62⁰C, dengan goyangan pelan.

3.3.4.e. Tahap Pencucian dan Deteksi (*Post hybridization*)

Setelah proses hibridisasi selesai, filter dikeluarkan dari kantong plastik. Filter dicuci dengan larutan pencuci 1 (2x SSC; 0,1% SDS) selama 5 menit, dilakukan dua kali. Kemudian dicuci dengan larutan pencuci 2 (0,1% SSC; 0,1% SDS) sebanyak dua kali pada suhu 60⁰C selama 5 menit digoyang pelan. Bilas

dengan buffer 1 (Tris 2M; NaCl 5M) pada suhu kamar. Filter direndam dalam buffer 2 (0,5% *blocking reagen*) pada suhu kamar selama 30 menit. Kembali dibilas dengan buffer 1. Ditambahkan konjugat *anti-digoxigenin-alkaline phosphate* selama 30 menit pada suhu kamar. Dicuci dengan buffer 1 selama 2 kali 15 menit pada suhu kamar. Kemudian dicuci dengan buffer 3 selama 2 kali 15 menit.

Filter dipindahkan kedalam cawan Petri, beri larutan warna NBT/ BCIP dan 20 ml buffer 3. Disimpan dalam tempat yang gelap selama satu hari. Setelah tampak terbentuknya warna pada koloni, filter dikeluarkan dan reaksi pewarna harus dihentikan dengan mencuci filter selama 5 menit dengan aquadest.

3.3.5. Perubahan Yang Diamati

Setelah proses hibridisasi selesai, maka akan terlihat lingkaran (dot) yang berwarna gelap pada permukaan filter. Dot yang tampak menandakan bahwa sampel tersebut positif *Eshcherichia coli* golongan Shiga Toxin.

3.3.6. Metoda Pencatatan Hasil Penelitian

Hasil penelitian akan dicatat pada tabel dibawah ini dengan kolom – kolom berisi kode sampel, asal isolat, BGGB (terdapat gas), warna koloni pada EMBA, hasil test Indol dan positif ST1 dan ST2.

Tabel 2. Model Pencatatan Hasil Pengamatan

K.S	Asal Isolat	BGGB (gas)	EMBA (hijau metalik)	Indol	ST1	ST2

Keterangan :

- K.S : Kode Sampel (contoh: P1, P12, C2, C4)
- Asal Isolat : Menjelaskan isolat berasal dari sapi atau babi
- BGGB (gas) : Sampel terbentuk gas atau tidak pada media BGGB
- EMBA : Pada media EMBA terbentuk koloni berwarna hijau metalik
- Indol : Hasil reaksi indol pada media trypton water
- ST1 : Positif memproduksi Shiga Toxin 1
- ST2 : Positif memproduksi Shiga Toxin 2

BAB IV

HASIL PENELITIAN

BAB IV**HASIL PENELITIAN**

Hasil pemeriksaan dari 30 sampel dari feses babi dan sapi dengan metoda MPN menunjukkan jumlah Coliform dan *E. coli* adalah sebagai berikut:

Tabel 3. Jumlah dan rata – rata nilai MPN Coliform pada feses babi dan sapi.

Sampel	Σ Sampel	Positif Coliform (sampel)	Total MPN Coliform	Rata – rata Nilai MPN Coliform/ gram feses
Babi	30	29	$97,8 \times 10^5$	$3,37 \times 10^5$
Sapi	30	30	275×10^4	$9,18 \times 10^4$

Setelah identifikasi *E. coli* dengan cara menginokulasi tabung BGGB yang positif coliform pada tabung BGGB suhu 44,7 – 47 °C dilanjutkan dengan EMBA dan test Indol ternyata jumlah *E. coli* per gram sampel feses babi dan sapi adalah sebagai berikut:

Tabel 4. Jumlah dan rata – rata nilai MPN *E. coli* pada feses babi dan sapi.

Sampel	Σ Sampel Positif Coliform	Positif <i>E. coli</i> (sampel)	Total MPN <i>E. coli</i>	Rata – rata Nilai MPN <i>E. coli</i> / gram feses
Babi	29	27	$29,8 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
Sapi	30	25	$87,3 \times 10^3$	$3,49 \times 10^3$

Kemudian dari jumlah *E. coli* diatas, dilakukan deteksi terhadap STEC (Shiga Toxin – Producing *Escherichia coli*) dengan menggunakan teknik hibridisasi koloni dengan probe non radioaktif. Berikut adalah data hasil deteksi dari masing – masing sampel yang positif STEC dengan melihat penampakan spot hitam pada membran filter (Hybond-N+).

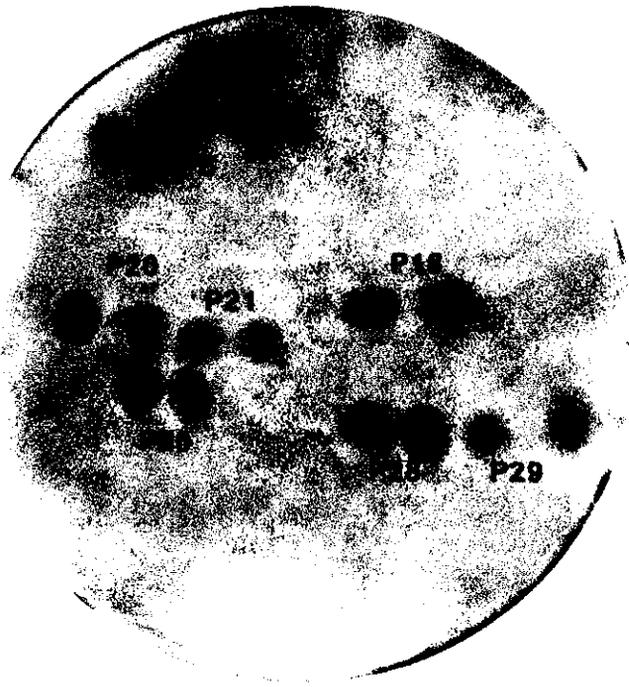
Tabel 5. Hasil positif STEC pada *E. coli* babi.

K.S	Asal Isolat	BGGB (gas)	EMBA (hijau metalik)	Indol	Stx1	Stx2
STx1,2	Jepang	+	+	+	+	+
P1	Babi	+	+	+	-	+
P3	Babi	+	+	+	+	-
P5	Babi	+	+	+	-	+
P6	Babi	+	+	+	+	+
P7	Babi	+	+	+	-	+
P11	Babi	+	+	+	-	+
P18	Babi	+	+	+	+	+
P20	Babi	+	+	+	+	+
P21	Babi	+	+	+	+	-
P25	Babi	+	+	+	+	-
P28	Babi	+	+	+	+	-
P29	Babi	+	+	+	+	-

(Tabel selengkapnya pada lampiran 7)

Pada feses babi, 96,6% dari sampel adalah bakteri golongan Coliform. Dari 96,6% tersebut, 93,1% adalah bakteri *Escherichia coli*. Diantara bakteri *Escherichia coli* tersebut, 48,14% adalah STEC atau *Escherichia coli* yang memproduksi Shiga toksin. *Escherichia coli* yang memproduksi Shiga toksin tersebut, dapat dibedakan lagi dengan STEC yang memproduksi Stx1 dan Stx1.

(Gambar 4).



Gambar 4. Hasil positif STEC Stx1 pada sampel feses babi. Terlihat spot gelap pada membran filter.

BAB V

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian pada feses sapi, dapat diketahui bahwa dari seluruh jumlah sampel yaitu 30 sampel, semuanya adalah bakteri golongan Coliform. Secara normal, bakteri ini berada pada saluran pencernaan hewan dan manusia terutama pada colon. Pada jumlah yang normal pula, bakteri golongan ini secara tidak langsung akan membantu dalam proses pencernaan karena ada beberapa zat atau nutrisi yang sudah tidak diperlukan oleh colon host, dapat di cerna oleh bakteri ini, sehingga dapat memperkecil volume buangan dari sisa metabolisme yang tidak tercerna atau sisa hasil pencernaan.

Bakteri *Escherichia coli* adalah salah satu golongan dari bakteri Coliform. Dalam penelitian ini, dari 30 sampel yang positif Coliform, 25 sampel adalah bakteri *Escherichia coli* pada sampel feses sapi. Sedangkan pada sampel feses babi, dari 29 sampel yang positif Coliform, 27 sampel positif Bakteri *Escherichia coli*. Pendeteksian bakteri *Escherichia coli* menggunakan metoda MPN. Pada penelitian ini, awal pendeteksian bakteri Coliform yang menggunakan pengenceran awal 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3} selalu menghasilkan lima tabung positif pada setiap pengenceran. Sehingga perlu dilakukan pengenceran selanjutnya, sampai ditemukan ada tabung BGBB yang negatif pada pengenceran yang terakhir. Penghitungan jumlah bakteri Coliform dan bakteri *Escherichia coli* mempunyai acuan pada literatur James L Oblinger dan John A Koburger dari *American Public Health Association*, Washington D. C (1984) yang menerangkan cara

penghitungan MPN dengan pengenceran sampel lebih dari 10^{-3} , yaitu dengan

$$\text{rumus: } \frac{\text{MPN from Table}}{100} \times \frac{1}{\text{dilution factor of middle tube}}$$

Sehingga dapat dihitung rata – rata jumlah bakteri Coliform pada sampel feses sapi adalah $9,18 \times 10^4$ per gram sampel. Pada sampel feses babi mempunyai rata – rata jumlah bakteri Coliform adalah $3,3 \times 10^5$ per gram sampel. Jumlah yang sangat besar, mengingat pada pengetesan MPN Coliform pengenceran dilakukan antara 10^{-4} sampai dengan 10^{-7} yang berarti pengenceran tabung tengah antara 10^{-5} sampai dengan 10^{-6} . Pada penghitungan MPN untuk bakteri *Escherichia coli*, angka MPN merupakan hasil dari uji Indol yang positif. Hasil uji Indol merupakan pencerminan dari tabung positif pada BGGB yang diinkubasi pada suhu $44,5^{\circ}\text{C}$ sampai dengan 45°C . Rata – rata jumlah bakteri *Escherichia coli* pada sampel feses sapi adalah $3,49 \times 10^3$ per gram sampel. Secara keseluruhan dari sampel sapi, persentase jumlah sampel yang mengandung bakteri *Escherichia coli* adalah:

$$\frac{25 \text{ sampel (Escherichia coli)}}{30 \text{ sampel (Coliform)}} \times 100\% = 83,3\%$$

Pada feses babi, rata – rata jumlah bakteri *Escherichia coli* adalah $1,1 \times 10^4$ per gram sampel dan persentase jumlah sampel yang mengandung bakteri *Escherichia coli* adalah:

$$\frac{27 \text{ sampel (Escherichia coli)}}{29 \text{ sampel (Coliform)}} \times 100\% = 93,1\%$$

Setelah mengalami proses *screening* terhadap bakteri *Escherichia coli*, maka dilakukan pendeteksian terhadap strain STEC. Peneliti sebelumnya sudah melakukan pendeteksian menggunakan teknik PCR dan melihat hasilnya melalui

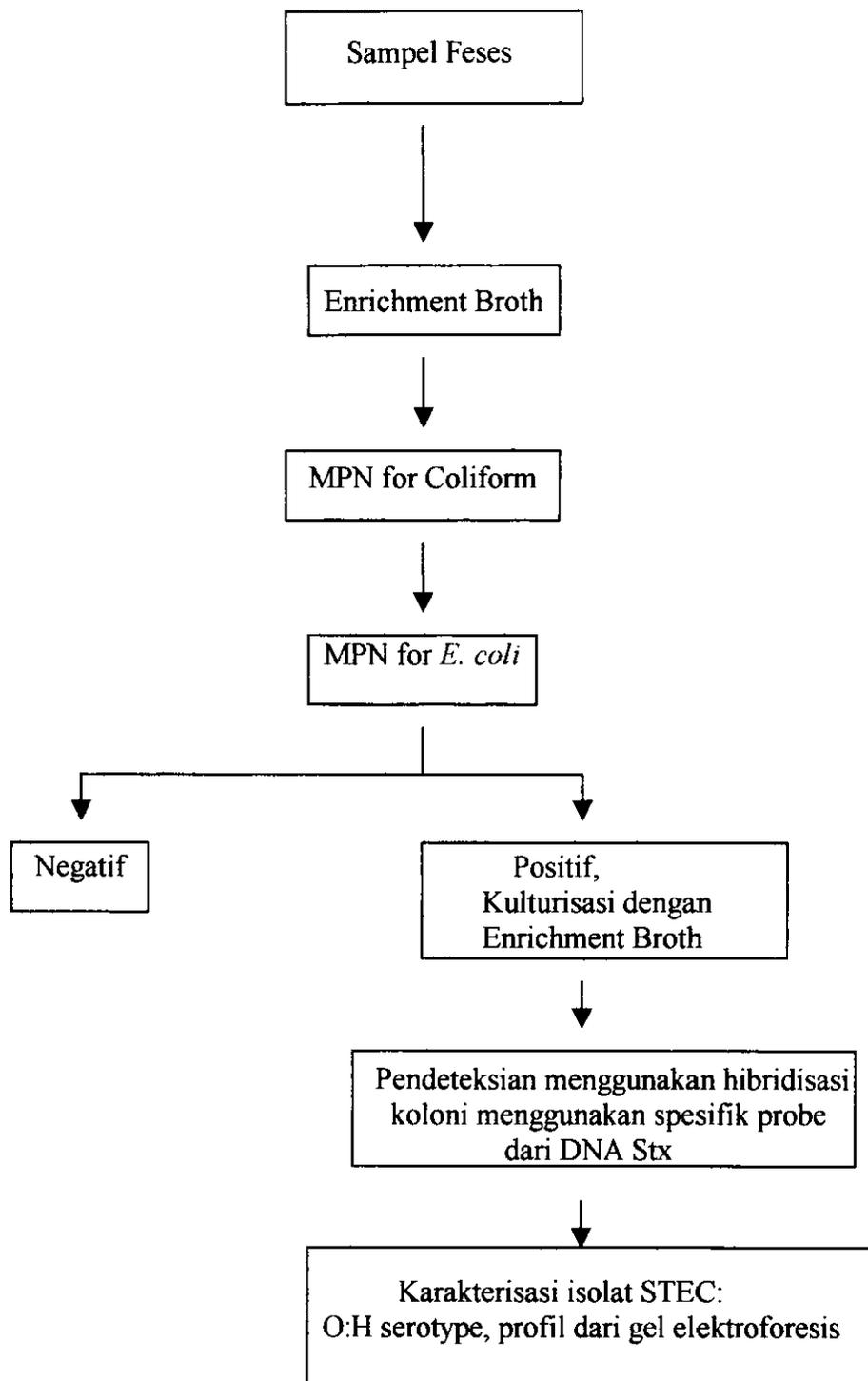
gel elektroforesis. Tetapi yang menjadi hambatan adalah ekstraksi DNA sampel *Escherichia coli*. Proses ekstraksi DNA memerlukan keahlian atau skill yang tinggi karena kita bekerja dengan bahan – bahan kimia termasuk enzim yang berbahaya dan salah sedikit dalam perhitungan akan sangat mempengaruhi hasil. Ekstraksi DNA juga dibutuhkan tingkat sterilitas yang tinggi baik pribadi maupun lingkungan laboratorium. Penggunaan teknik PCR memang lebih cepat dan memerlukan waktu antara 3 sampai 4 hari. Hasil PCR pada waktu itu sangat meragukan karena peneliti merasa ekstraksi yang dilakukan kurang murni sehingga pada penampakan gel elektroforesis masih banyak ditemukan *smear* atau band DNA yang terlihat kotor yang disebabkan oleh masih adanya RNA atau tercemar oleh benda asing lain. Akhirnya hibridisasi koloni menjadi pilihan karena sedikit lebih mudah namun tetap memerlukan skill yang tinggi.

Diantara tahap proses hibridisasi, tahap *labeling* dan post hibridisasi adalah tahap yang memerlukan ketelitian yang tinggi. Tahap *labeling* menggunakan probe dari GIBCO BRL yaitu sampel positif STEC Stx1 dan Stx2. Setelah DNA *template* di denaturasi dengan pemanasan 95⁰C selama 10 menit secepatnya di letakkan pada bongkahan es agar rantai DNA yang semula rantai ganda (*double stranded*) didenaturasi menjadi rantai tunggal tidak kembali lagi menjadi rantai ganda. Kemudian penambahan dNTP *mixture* dan enzim Klenow akan memberikan label non radioaktif pada DNA *template* dan mensintesis rantai tunggal tadi menjadi rantai ganda. Setelah itu diinkubasi lagi untuk membuat rantai ganda menjadi tunggal lagi, sehingga probe dengan rantai tunggal ini akan siap mencari secara random pasangannya pada sampel dari feses sapi dan babi

yang positif STEC. Pada post hibridisasi, proses pencucian dengan buffer harus dilakukan sesuai dengan waktu yang ditentukan karena jika terlalu cepat atau terlalu lambat dapat mempengaruhi pada saat pemberian zat warna NBT/ BCIP. Pencucian yang terlalu lama dapat menyebabkan anti-DIG-AP yang berfungsi sebagai pengikat zat warna pada sampel yang positif hilang sehingga zat warna tidak dapat melekat pada sampel yang positif. Begitu juga pada saat pemberian zat warna tidak boleh lebih dari 18 jam, karena jika terlalu lama dapat menyebabkan spot positif akan semakin melebar dan akan mengaburkan dalam diagnosa sampel positif.

Hasil dari deteksi STEC menggunakan teknik hibridisasi koloni adalah pada sampel dari sapi 11 sampel positif STEC dengan yang terdiri dari 3 STEC Stx1, 5 STEC Stx2 dan 3 STEC Stx₁₋₂. Pada sampel babi terdapat 12 sampel positif STEC yang terdiri dari 5 STEC Stx1, 4 STEC Stx2 dan 3 STEC Stx₁₋₂. Dilihat dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa dalam flora normal bakteri dalam feses hewan sapi dan babi yang secara fisik terlihat sehat dapat menjadi reservoir dari STEC. Adanya STEC ini yang dilihat dari presentase dari setiap hewan sangat kecil, jadi tidak setiap hewan terdapat strain STEC dan kemungkinan untuk jangka waktu yang panjang dapat menjadi wabah kalau dari pemilik peternakan atau pengelola dari rumah potong hewan tidak menjaga sanitasi lingkungan sekitar seperti saluran pembuangan feses karena dapat menyebarkan agen penyakit.

Hasil penelitian selama lebih kurang delapan bulan ini, peneliti mempunyai sebuah konsep atau bagan untuk pendeteksian STEC dari sampel feses hewan yang diduga sebagai reservoir agen penyakit.



Gambar 8. Bagan untuk diagnosa STEC secara mikrobiologi molekular.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian pendeteksian keberadaan STEC maka dapat ditarik kesimpulan bahwa:

1. Sejumlah 25 sampel feses sapi dan 27 sampel feses babi adalah bakteri *Escherichia coli*.
2. Terdapat 11 sampel positif STEC pada feses sapi dan 12 sampel positif STEC pada feses babi yang dapat terdeteksi dengan menggunakan teknik hibridisasi koloni yang non radioaktif.

6.2. Saran

Berdasarkan hasil yang diperoleh, maka melalui penelitian ini dapat disarankan untuk:

1. Peningkatan kesadaran akan aspek higiene pada pengkonsumsian produk – produk hasil hewan seperti daging, susu dan produk olahan asal hewan lain.
2. Perlunya peningkatan kesehatan lingkungan dan sanitasi lingkungan di sekitar rumah potong hewan atau peternakan untuk pencegahan penyebaran bakteri patogen terutama STEC.
3. Perlu melakukan penelitian lanjut tentang sifat – sifat, karakteristik serta cara pencegahan terhadap infeksi STEC.

RINGKASAN

LAKSYUDHA PRASETYO. Deteksi *Shiga Toxin – Producing Escherichia coli* (STEC) pada Feses Sapi dan Babi dengan Teknik Hibridisasi Koloni dibawah bimbingan Dr. Hario Puntodewo Siswanto, M.App.Sc., drh. sebagai pembimbing pertama dan Benjamin CHR Tehupuring, M.S., drh. sebagai pembimbing kedua.

Shiga Toxin – Producing Escherichia coli (STEC) adalah salah satu strain dari *E. coli* yang mempunyai efek patogen pada hewan terutama manusia seperti Haemorrhagic colitic dan sindrom urin berdarah. Hewan sapi diyakini sebagai resevoir utama dari STEC setelah hewan rusa, babi, kuda dan anjing. STEC dapat diidentifikasi dengan cara mendeteksi gen penyandi toksin Stx dengan teknik hibridisasi koloni.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri *Escherichia coli* dengan metoda MPN dan mendeteksi adanya strain STEC diantara flora normal yang ada di dalam feses sapi dan babi.

Penelitian ini menggunakan sampel dari feses babi yang berasal dari RPH Pegirikan Surabaya dan sampel feses sapi dari peternakan sapi perah Sepanjang. Sampel positif STEC Stx₁₋₂ yang berasal dari Jepang. Pendeteksian dilakukan dengan metoda hibridisasi koloni yang menggunakan probe non radioaktif.

Sampel feses sapi dan babi diencerkan dalam berbagai pengenceran yang dimulai dari 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} . Sampel diinkubasi dalam BGGB selama sehari suhu 37°C . Karena pada pengenceran awal masih ditemukan tabung yang positif (terdapat gas dalam tabung Durham) maka dilakukan pengenceran sampai dengan

10^{-7} . Sampel pada tabung yang positif di inokulasikan pada media EMBA untuk melihat dan memastikan koloni yang tumbuh adalah bakteri Coliform. Sampel sapi sejumlah 30 buah keseluruhannya adalah bakteri Coliform dengan jumlah rata – rata bakteri Coliform per gram feses adalah $9,18 \times 10^4$. Pada sampel feses babi, ditemukan 29 sampel bakteri Coliform dari 30 sampel sebelumnya dengan rata – rata bakteri Coliform per gram feses adalah $3,37 \times 10^5$.

Semua tabung yang positif Coliform, dilakukan uji terhadap bakteri *E. coli*. Sebanyak 25 sampel dari 30 sampel feses sapi adalah bakteri *E. coli* dengan jumlah rata – rata bakteri per gram feses adalah $3,49 \times 10^3$. Pada sampel babi, sejumlah 27 sampel dari 29 sampel Coliform adalah bakteri *E. coli* dengan jumlah rata – rata bakteri per gram feses adalah $1,1 \times 10^4$.

Kemudian dengan hibridisasi koloni dilakukan deteksi terhadap strain STEC yang menghasilkan dari 25 sampel feses sapi positif *E. coli* dinyatakan 3 sampel adalah *E. coli* yang memproduksi Shiga toksin Stx1, Stx2 sebanyak 5 sampel dan STEC yang memproduksi Stx1 dan Stx2 sebanyak 3 sampel. Pada babi, 5 sampel adalah positif STEC Stx1, 4 sampel STEC Stx2 dan 3 sampel STEC Stx₁₋₂.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa diantara bakteri *E. coli* pada flora normal terdapat sejumlah kecil STEC yang terdeteksi dengan metoda hibridisasi koloni. Dengan adanya strain ini maka perlu adanya peningkatan kesadaran akan aspek higiene pada pengkonsumsian produk – produk asal hewan.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Bettelheim, K.A. 1999. The Genus *Escherichia*, (Online), (<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaprender/jsp/showchap.jsp>, diakses 5 Februari 2004).
- Beutin, L., D. Geier, H. Steinrück, S. Zimmermann, and F. Scheutz. 1993. Prevalence and Some Properties of Verotoxin (Shiga-like toxin)-Producing *Escherichia coli* in Seven Different Species of Healthy Domestic Animals. *Journal of Clinical Microbiology*. 31:2483-2488.
- Blanco, J., M. Blanco, J.E. Blanco, A. Mora, E.A. Gonzalez, M.I. Bernardez, M.P. Alonso, A. Coira, A. Rodriguez, J. Rey, J.M. Alonso, M.A. Usera. 2003. Verotoxin-Producing E coli (VTEC) in Spain: Prevalence, Serotypes, and Virulence Genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in Ruminants, Raw Beef Products, and Humans. *Experimental Biology and Medicine*. 228: 345-351.
- Blanco, M., J.E. Blanco, E.A. Gonzalez, A. Mora, W. Jansen, A.T. Gomes, L. Fernando Zerbini. 1997. Genes Coding For Enterotoxins and Verotoxins In Porcine *Escherichia coli* Strains Belonging To Different O:K:H Serotypes. Relationship With Toxic Phenotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 2958-2963.
- Brown, J. E., O. Sethabutr, M. P. Jackson, S. Lolekha, and P. Echeverria. 1989. Hybridization of *Escherichia coli* Producing Shiga-Like toxin I, Shiga-Like Toxin II, and A Variant Shiga-like Toxin II With Synthetic Oligonucleotide Probes. *Infect. Immun.* 57:2811–2814.
- Buckle, K.A., G.R. Davey, M.J. Eyles, G.H. Fleet, and Murrell. 1979^a. Food Borne Microorganism of Public Health Significance. Fourth Edition. School of Food Technology. Kensington: University of New South Wales, Australia. vol 1. 6.2. – 6.27.
- Buckle, K.A., G.R. Davey, M.J. Eyles, G.H. Fleet, and Murrell. 1979^b. Food Borne Microorganism of Public Health Significance. School of Food Technology. Kensington: University of New South Wales, Australia. Vol 2. 2.3 – 2.9.
- Calderwood, S. B., D. W. K. Acheson, G. T. Keusch, T. J. Barrett, P. M. Griffin, N. A. Strockbine, B. Swaminathan, J. B. Kaper, M. M. Levine, B. S. Kaplan, H. Karch, A. D. O'Brien, T. G. Obrig, Y. Takeda, P. I. Tarr, and I. K. Wachsmuth. 1996. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* 62:118–119.

- Davis, L.G., W. M. Kuchl, J.F. Battey. 1997. *Molecular Biology*. 2nd Edition. Connecticut: Appleton & Lange.
- Evans, D.J., and Dolores G. Evans. 1995. *Escherichia Coli* in Diarrheal Disease. Medmicro Chapter 25.
- Guide, Bench. 2001. (Online), ([www. qiagen.com/ literature/ BenchGuide/ pdf/1017778_BenchGuide_Chap_1.pdf](http://www.qiagen.com/literature/BenchGuide/pdf/1017778_BenchGuide_Chap_1.pdf), diakses 25 Agustus 2003).
- Hofstad, M.S., H.J. Barnes, B.W. Calnek, W.M. Reid and H.W. Yoder. 1984. *Diseases of Poultry*. Eight Edition. Iowa: State University Press Ames. 270-277.
- Jawetz, E., J.L. Melnick, and E.A. Adelberg. 1980. *Review of Medical Microbiology*. Fourteen edition. Lange Medical Publication. Los Altos, California. 118-122 and 293-294.
- Kaplan, B. S., K. E. Meyers, and S. L. Schulman. 1998. The Pathogenesis and Treatment of Hemolytic Uremic Syndrome. *J.Am.Soc.Nephrol.* 9:1126-1133.
- Leyer, G. J., L. Wang, and E. A. Johnson. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3752-3755.
- Le Saux, N, Spika J.S, Friesen B. *et al.* 1993. Ground Beef Consumption in non-commercial Settings is A Risk Factor For Sporadic *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Canada. *J Infect Dis.* 167:500-2.
- Mehlem, I.J. 1984. Coliform, Fecal Coliform, *Escherichia coli*, and Enteropathogenic *E. coli*. Dalam Marvin L. Speck (Ed), *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Food*. Second Edition. Chap 25: 265-284. Washington, D.C: American Public Health Association.
- Nataro, J. P. and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142-201.
- Oblinger, J.L. and John A. Koburger. 1984. The Most Probable Number. Dalam Marvin L. Speck (Ed), *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Food*. Second Edition. Chap 6: 99-111. Washington, D.C.: American Public Health Association.
- O'Brien, A. D., and R. K. Holmes. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51:206-220.

- Paton, A. W., R. Ratcliff, R. M. Doyle, J. Seymour-Murray, D. Davos, J. A. Lanser, and J. C. Paton. 1996. Molecular Microbiological Investigation of An Outbreak of Hemolytic Uremic Syndrome Caused by Dry Fermented Sausage Contaminated With Shiga-like Toxin-Producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34:1622–1627.
- Paton, J.C. and Adrienne W. Paton. 1998. Clinical Microbiology Reviews. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections p. 450–479.
- Pelczar, M.J., dan E.C.S. Chan. 1986. Dasar – Dasar Mikrobiologi. Terjemahan oleh Ratna Siri Hadioetomo, Teja Imas, S. Sutarmi Tjitrosomo, Sri Lestari Angka. 1986. Jakarta: UI Press.
- Perna, N. T., G. F. Mayhew, G. Posfai, S. Elliott, M. S. Sonnenberg, J. B. Kaper, and F. R. Blattner. 1998. Molecular Evolution of A Pathogenicity Island From Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 66:3810-3817.
- Safitri, I. 1999. Hibridisasi Asam Nukleat. Dalam Suhartono Taat P (Ed), *Biologi Molekular Kedokteran.* 16:168-172. Surabaya: Airlangga University Press.
- Sandvig, K., and B. van Deurs. 1996. Endocytosis, Intracellular Transport, and Cytotoxic Action of Shiga Toxin and Ricin. *Physiol. Rev.* 76:949–966.
- Soetji, P. 2001. Pengujian Mikrobiologis. Dalam Hario P. Siswanto (Ed), *Analisis Kualitas Susu dan Daging.* 29-38. Surabaya: Bagian Kesmavet FKH UNAIR Surabaya.
- Tesh, V. L., J. E. Samuel, L. P. Perera, J. B. Sharefkin, and A. D. O'Brien. 1991. Evaluation of The Role of Shiga and Shiga-like Toxins in Mediating Direct Damage to Human Vascular Endothelial Cells. *J. Infect. Dis.* 164:344–352.
- Thomas, A., H. R. Smith, G. A. Willshaw, and B. Rowe. 1991. Non-radioactively Labelled Polynucleotide and Oligonucleotide DNA Probes, for Selectively Detecting *Escherichia coli* Strains Producing Vero Cytotoxins VT1, VT2, and VT2 Variant. *Mol. Cell. Probes* 5:129–135.
- Todar, K. 2002. Pathogenic *E. coli*. University of Wisconsin Madison Department of Bacteriology, (Online), (www.bact.wisc.edu/Bact330/lectureecoli, diakses 5 Februari 2004).

Tsuji, T. et al. 1995. Monomer of the B subunit of the heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli* has little ability to bind to GM1 ganglioside compared to its coligenoid. *Microbiology and Immunology*. 39:817-819.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Persiapan Sampel dan Pembuatan Media

Pembuatan sampel dalam berbagai pengenceran. Sampel diambil seberat 1 gram kemudian diinokulasikan pada 9 ml media LB broth. Setelah diinkubasi selama satu hari, dilakukan pengenceran yaitu dengan mengambil 1 ml sampel dicampurkan dengan 9 ml aquades steril adalah sampel dengan pengenceran 10^{-1} . Sampel pengenceran 10^{-2} dibuat dengan menambahkan 1 ml sampel pengenceran 10^{-1} ke dalam 9ml aquades steril. Sampel pengenceran 10^{-3} , dibuat dengan menambahkan 1 ml sampel pengenceran 10^{-2} ke dalam 9 ml aquades steril, demikian seterusnya. Setelah itu tiap tabung pengenceran diambil 1 ml inokulasikan pada lima tabung BGGB yang didalamnya terdapat tabung durham. Penanganan sampel untuk penyimpanan (stok sampel) menggunakan larutan glycerin 1% yaitu dengan mencampurkan larutan sampel dengan glycerin 1% dengan perbandingan 1:1.

Luria Bertani (LB) Broth (Merck 1.10285.)

Media ini adalah media penyubur (*enrichment media*) yang mempunyai kandungan pepton dari kasein 10 gram, *yeast extract* 5gram dan sodium chloride 10 gram. Cara penggunaannya yaitu dengan melarutkan 25 gram media dalam 1 liter aquades steril. Setelah itu dipanaskan dalam penangas air sampai homogen. Proses berikutnya adalah sterilisasi media dalam autoklaf suhu 121°C dengan tekanan 15 atmosfir selama 30 menit. Uji sterilitas dilakukan dengan menginkubasi media dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

Eosin Methylen Blue Agar (Merck 1.01347.)

Media ini mengandung pepton 10 gram, $K_2H_3PO_4$ 2 gram dan laktosa 5 gram. Media ini diambil secara aseptis dan ditimbang seberat 36 gram dan dicampurkan dalam aquades sampai satu liter. Setelah itu dipanaskan dalam penangas air untuk mempercepat proses homogenisasi, kemudian untuk proses sterilisasi dilakukan dengan memasukkan media dalam autoklaf dengan suhu $121^{\circ}C$ dengan tekanan 15 atmosfer selama 30 menit. Setelah itu media dituang kedalam cawan Petri steril, setelah beku cawan Petri dibalik. Uji sterilitas semua cawan petri yang terisi media dalam inkubator dengan suhu $37^{\circ}C$ selama 24 jam. Media siap digunakan jika tidak ada pencemaran atau pertumbuhan koloni kuman.

Larutan Tryptone 1% (Oxoid)

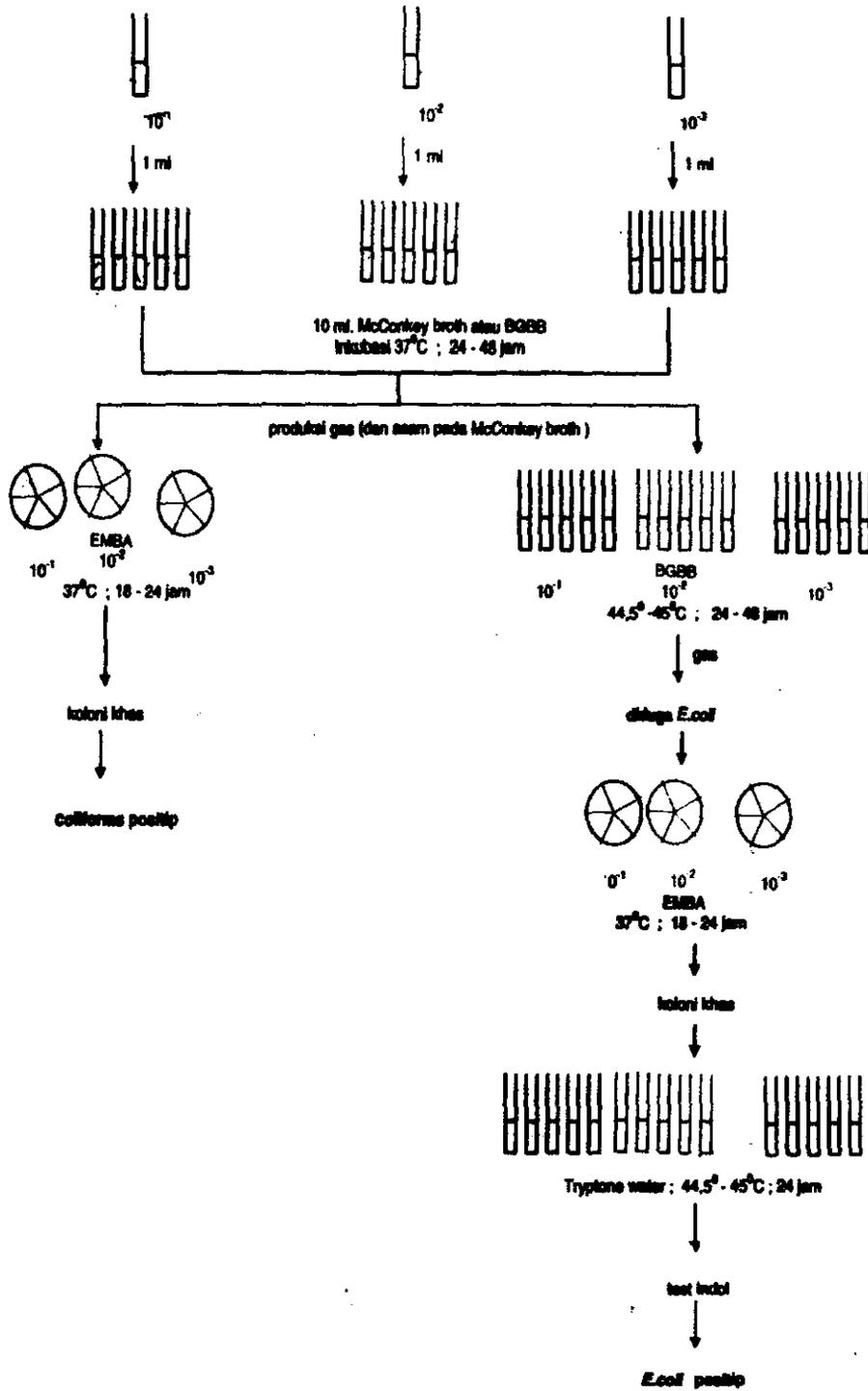
Larutan media ini mengandung Nitrogen 12,7 gram, Amino Nitrogen 3,7 gram, Sodium Chloride 6,4 gram, Tryptophan 1 gram. Seberat 10 gram media dilarutkan dalam aquades steril sampai 1 liter. Setelah itu dipanaskan dalam penangas air sampai larut. Selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml untuk tiap tabung. Proses sterilisasi dilakukan dengan memasukkan media dalam autoklaf dengan suhu $121^{\circ}C$ dengan tekanan 15 atmosfer selama 30 menit. Setelah dingin siap digunakan untuk media uji Indol.

Reagen kovach

Komposisi media ini terdiri dari: isoamilalkohol 15 ml dan paradimetil aminobensaldehid 10 gram dilarutkan dalam hidrogen klorida pekat 50 ml

Lampiran 2. Skema MPN

Metode Most Probable Number (Soetji P, 2001)



Lampiran 3. Tabel Mc Crady's

Using 5 Tubes
With 10, 1 and 0.1 ml Volumes

Pos*	MPN										
10, 1, 0.1		10, 1, 0.1		10, 1, 0.1		10, 1, 0.1		10, 1, 0.1		10, 1, 0.1	
000	0	100	2	200	4.5	300	7.8	400	13	500	23
001	1.8	101	4	201	6.8	301	11	401	17	501	31
002	3.6	102	6	202	9.1	302	13	402	21	502	43
003	5.4	103	8	203	12	303	16	403	25	503	58
004	7.2	104	10	204	14	304	20	404	30	504	76
005	9	105	12	205	16	305	23	405	36	505	95
010	1.8	110	4	210	6.8	310	11	410	17	510	33
011	3.6	111	6.1	211	9.2	311	14	411	24	511	46
012	5.5	112	8.1	212	12	312	17	412	26	512	64
013	7.3	113	10	213	14	313	20	413	31	513	84
014	9.1	114	12	214	17	314	23	414	36	514	110
015	11	115	14	215	19	315	27	415	42	515	130
020	3.7	120	6.1	220	9.3	320	14	420	22	520	49
021	5.5	121	8.2	221	12	321	17	421	26	521	70
022	7.4	122	10	222	14	322	20	422	32	522	95
023	9.2	123	12	223	17	323	24	423	38	523	120
024	11	124	15	224	19	324	27	424	44	524	150
025	13	125	17	225	22	325	31	425	50	525	180
030	5.6	130	8.3	230	12	330	17	430	27	530	79
031	7.4	131	10	231	14	331	21	431	33	531	110
032	9.3	132	13	232	17	332	24	432	39	532	140
033	11	133	15	233	20	333	28	433	45	533	180
034	13	134	17	234	22	334	31	434	52	534	210
035	15	135	19	235	25	335	35	435	59	535	250
040	7.5	140	11	240	15	340	21	440	34	540	130
041	9.4	141	13	241	17	341	24	441	40	541	170
042	11	142	15	242	20	342	28	442	47	542	220
043	13	143	17	243	23	343	32	443	54	543	280
044	15	144	19	244	25	344	36	444	62	544	350
045	17	145	22	245	28	345	40	445	69	545	430
050	9.4	150	13	250	17	350	25	450	41	550	240
051	11	151	15	251	20	351	29	451	48	551	350
052	13	152	17	252	23	352	32	452	56	552	540
053	15	153	19	253	26	353	37	453	64	553	920
054	17	154	22	254	29	354	41	454	72	554	1600
055	19	155	24	255	32	355	45	455	81	555	2400

Buckle et al(1979^b).

Lampiran 4. Data Hasil MPN Dari Faeces Sapi

<i>Coliform</i>					<i>Escherichia coli</i>			
K.S	Mid. D	Tab. (+)	MPN	Σ Bakteri/g Sampel	Mid. D	Tab. (+)	MPN	Σ Bakteri/g Sampel
C1	10 ⁻⁵	5.1.0	33	3,3 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	3.0.0	8	8 x 10 ²
C2	10 ⁻⁵	3.2.1	17	1,7 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	3.0.0	8	8 x 10 ²
C3	10 ⁻⁵	4.4.0	34	3,4 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	4.1.0	17	1,7 x 10 ³
C4	10 ⁻⁵	4.2.0	22	2,2 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	3.3.0	17	1,7 x 10 ³
C5	10 ⁻⁵	4.2.1	26	2,6 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	3.3.0	17	1,7 x 10 ³
C6	10 ⁻⁵	4.3.0	27	2,7 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	3.2.0	14	1,4 x 10 ³
C7	10 ⁻⁵	5.2.2	94	9,4 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	4.2.1	26	2,6 x 10 ³
C8	10 ⁻⁵	5.3.2	140	1,4 x 10 ⁵	10 ⁻⁴	5.1.1	46	4,6 x 10 ³
C9	10 ⁻⁵	5.1.1	46	4,6 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	4.1.0	17	1,7 x 10 ³
C10	10 ⁻⁵	5.1.1	46	4,6 x 10 ⁴	-	-	-	-
C11	10 ⁻⁶	4.2.0	22	2,2 x 10 ⁵	10 ⁻⁵	3.2.0	14	1,4 x 10 ⁴
C12	10 ⁻⁵	5.4.1	170	1,7 x 10 ⁵	10 ⁻⁴	4.3.0	27	2,7 x 10 ³
C13	10 ⁻⁵	5.2.1	70	7 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	4.1.1	21	2,1 x 10 ³
C14	10 ⁻⁵	4.3.0	27	2,7 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	3.3.0	17	1,7 x 10 ³
C15	10 ⁻⁵	5.1.1	46	4,6 x 10 ⁴	-	-	-	-
C16	10 ⁻⁵	5.4.0	130	1,3 x 10 ⁵	-	-	-	-
C17	10 ⁻⁵	4.3.0	27	2,7 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	3.2.0	14	1,4 x 10 ³
C18	10 ⁻⁵	5.3.1	110	1,1 x 10 ⁵	10 ⁻⁴	4.3.0	27	2,7 x 10 ³
C19	10 ⁻⁵	5.2.2	94	9,4 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	4.1.1	21	2,1 x 10 ³
C20	10 ⁻⁵	4.3.1	33	3,3 x 10 ⁴	-	-	-	-
C21	10 ⁻⁵	4.4.0	34	3,4 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	3.3.0	17	1,7 x 10 ³
C22	10 ⁻⁵	5.1.2	63	6,3 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	4.1.1	21	2,1 x 10 ³
C23	10 ⁻⁵	5.3.0	79	7,9 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	3.2.0	14	1,4 x 10 ³
C24	10 ⁻⁵	4.3.1	33	3,3 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	3.3.1	11	1,1 x 10 ³
C25	10 ⁻⁶	5.2.1	70	7 x 10 ⁵	10 ⁻⁵	3.2.0	21	2,1 x 10 ⁴

C26	10^{-5}	4.2.1	26	$2,6 \times 10^4$	10^{-4}	3.2.0	14	$1,4 \times 10^3$	
C27	10^{-6}	5.1.0	33	$3,3 \times 10^5$	10^{-5}	4.0.0	13	$1,3 \times 10^4$	
C28	10^{-5}	4.1.2	26	$2,6 \times 10^4$	-	-	-	-	
C29	10^{-5}	4.2.2	32	$3,2 \times 10^4$	10^{-4}	3.0.0	8	8×10^2	
C30	10^{-5}	4.1.1	21	$2,1 \times 10^4$	10^{-4}	3.1.0	11	$1,1 \times 10^3$	
Total MPN Coliform :				$2,75 \times 10^6$	Total MPN <i>E. coli</i> :				$8,72 \times 10^4$
Rata-rata Coliform/g faeces:				$9,16 \times 10^4$	Rata-rata <i>E. coli</i> /g faeces:				$3,48 \times 10^3$

Keterangan:

- K.S : Kode Sampel
- Mid. D : Middle Dilution (angka pengenceran tengah)
- Tab. (+) : Jumlah tabung yang positif (seri 15 tabung)
- MPN : Angka MPN yang sesuai dengan tabel Mc. Crady's
- Σ Bakteri/g sampel : Penghitungan menggunakan rumus

$$\text{MPN/g} = \frac{\text{nilai MPN}}{100} \times \frac{1}{\text{Pengenceran Tengah}}$$

- Tanda (-) menandakan sampel tersebut pada pengujian untuk *Escherichia coli* tidak menampilkan hasil positif (Coliform yang bukan *Escherichia coli*)

Lampiran 5. Data Hasil Deteksi STEC Pada *Escherichia coli* Isolat Faeces Sapi

K.S	Asal Isolat	BGBB (gas)	EMBA (hijau metalik)	Indol	Stx1	Stx2
STx1,2	Jepang	+	+	+	+	+
C1	Sapi	+	+	+	-	-
C2	Sapi	+	+	+	-	-
C3	Sapi	+	+	+	+	-
C4	Sapi	+	+	+	-	+
C5	Sapi	+	+	+	+	+
C6	Sapi	+	+	+	-	-
C7	Sapi	+	+	+	-	+
C8	Sapi	+	+	+	-	-
C9	Sapi	+	+	+	-	-
C11	Sapi	+	+	+	-	-
C12	Sapi	+	+	+	+	+
C13	Sapi	+	+	+	-	-
C14	Sapi	+	+	+	+	-
C15	Sapi	+	+	+	+	+
C18	Sapi	+	+	+	-	-
C19	Sapi	+	+	+	-	+
C21	Sapi	+	+	+	-	-
C22	Sapi	+	+	+	-	-
C23	Sapi	+	+	+	+	-
C24	Sapi	+	+	+	-	+
C25	Sapi	+	+	+	-	-
C26	Sapi	+	+	+	-	+
C27	Sapi	+	+	+	-	-
C29	Sapi	+	+	+	-	-

C30	Sapi	+	+	+	-	-
-----	------	---	---	---	---	---

- Jumlah STEC yang memproduksi toksin Stx1 adalah tiga sampel
- Jumlah STEC yang memproduksi toksin Stx2 adalah empat sampel
- STEC yang memproduksi toksin Stx1 dan Stx2 adalah tiga sampel

Lampiran 6. Data Hasil MPN Dari Faeces Babi

<i>Coliform</i>					<i>Escherichia coli</i>			
K.S	Mid. D	Tab. (+)	MPN	Σ Bakteri/g Sampel	Mid. D	Tab. (+)	MPN	Σ Bakteri/g Sampel
P1	10^{-5}	5.5.4	1600	$1,6 \times 10^6$	10^{-5}	4.3.1	33	$3,3 \times 10^4$
P2	10^{-5}	5.4.1	170	$1,7 \times 10^5$	10^{-4}	4.1.0	17	$1,7 \times 10^3$
P3	10^{-6}	5.0.1	31	$3,1 \times 10^5$	10^{-5}	4.0.0	13	$1,3 \times 10^4$
P4	10^{-6}	5.2.1	70	7×10^5	10^{-5}	3.1.0	11	$1,1 \times 10^4$
P5	10^{-6}	4.3.1	33	$3,3 \times 10^5$	10^{-5}	4.0.0	13	$1,3 \times 10^4$
P6	10^{-6}	5.2.0	49	$4,9 \times 10^5$	10^{-5}	5.0.0	23	$2,3 \times 10^4$
P7	10^{-6}	4.4.0	34	$3,4 \times 10^5$	10^{-5}	3.2.0	14	$1,4 \times 10^4$
P8	10^{-6}	5.0.1	31	$3,1 \times 10^5$	10^{-5}	4.0.0	13	$1,3 \times 10^4$
P9	10^{-5}	5.2.2	94	$9,4 \times 10^4$	10^{-4}	4.2.0	22	$2,2 \times 10^3$
P10	10^{-5}	5.4.0	130	$1,3 \times 10^5$	10^{-4}	5.1.0	33	$3,3 \times 10^3$
P11	10^{-5}	5.3.1	110	$1,1 \times 10^5$	10^{-4}	4.2.0	22	$2,2 \times 10^3$
P12	10^{-6}	5.0.0	23	$2,3 \times 10^5$	10^{-4}	4.0.0	13	$1,3 \times 10^3$
P13	10^{-5}	5.1.0	33	$3,3 \times 10^4$	-	-	-	-
P14	10^{-5}	5.4.1	170	$1,7 \times 10^5$	10^{-4}	4.2.0	22	$2,2 \times 10^3$
P15	10^{-4}	5.4.0	130	$1,3 \times 10^4$	10^{-4}	5.3.0	79	$7,9 \times 10^3$
P16	10^{-5}	5.1.1	46	$4,6 \times 10^4$	10^{-4}	4.2.0	22	$2,2 \times 10^3$
P17	10^{-6}	5.3.2	140	$1,4 \times 10^6$	10^{-5}	4.3.0	27	$2,7 \times 10^4$
P18	10^{-5}	5.2.2	94	$9,4 \times 10^4$	10^{-4}	4.0.0	13	$1,3 \times 10^3$
P19	10^{-6}	5.2.1	70	7×10^5	10^{-5}	4.1.0	17	$1,7 \times 10^4$
P20	10^{-5}	5.0.0	23	$2,3 \times 10^4$	10^{-4}	4.0.0	13	$1,3 \times 10^3$
P21	10^{-5}	5.1.0	33	$3,3 \times 10^4$	10^{-4}	5.1.0	33	$3,3 \times 10^3$
P22	-	-	-	-	-	-	-	-
P23	10^{-5}	5.1.1	46	$4,6 \times 10^4$	10^{-4}	4.1.0	17	$1,7 \times 10^3$
P24	10^{-6}	5.2.1	70	7×10^5	10^{-4}	4.2.0	22	$2,2 \times 10^4$
P25	10^{-5}	5.4.2	220	$2,2 \times 10^5$	10^{-5}	4.3.0	27	$2,7 \times 10^4$

P26	10^{-6}	5.1.0	33	$3,3 \times 10^5$	10^{-5}	4.0.0	13	$1,3 \times 10^4$	
P27	10^{-5}	5.0.0	23	$2,3 \times 10^4$	-	-	-	-	
P28	10^{-6}	5.2.1	70	7×10^5	10^{-5}	4.1.0	17	$1,7 \times 10^4$	
P29	10^{-6}	5.1.0	33	$3,3 \times 10^5$	10^{-4}	5.1.0	33	$3,3 \times 10^3$	
P30	10^{-5}	5.3.1	110	$1,1 \times 10^5$	10^{-5}	4.2.0	22	$2,2 \times 10^4$	
Total MPN Coliform				$: 9,78 \times 10^6$	Total MPN <i>E. coli</i>				$: 2,98 \times 10^5$
Rata-rata Coliform/g faeces				$: 3,37 \times 10^5$	Rata-rata <i>E. coli</i> /g faeces				$: 1,1 \times 10^4$

Keterangan:

- K.S : Kode Sampel
- Mid. D : Middle Dilution (angka pengenceran tengah)
- Tab. (+) : Jumlah tabung yang positif (seri 15 tabung)
- MPN : Angka MPN yang sesuai dengan tabel Mc. Crady's
- Σ Bakteri/g sampel : Penghitungan menggunakan rumus

$$\text{MPN/g} = \frac{\text{nilai MPN}}{101} \times \frac{1}{\text{Pengenceran Tengah}}$$

- Tanda (-) menandakan sampel tersebut pada pengujian untuk *Escherichia coli* tidak menampakkan hasil positif (Coliform yang bukan *Escherichia coli*)

Lampiran 7. Data Hasil Deteksi STEC Pada *Escherichia coli* Isolat Faeces**Babi**

K.S	Asal Isolat	BGGB (gas)	EMBA (hijau metalik)	Indol	Stx1	Stx2
STx1,2	Jepang	+	+	+	+	+
P1	Babi	+	+	+	-	+
P2	Babi	+	+	+	-	-
P3	Babi	+	+	+	+	-
P4	Babi	+	+	+	-	-
P5	Babi	+	+	+	-	+
P6	Babi	+	+	+	+	+
P7	Babi	+	+	+	-	+
P8	Babi	+	+	+	-	-
P9	Babi	+	+	+	-	-
P10	Babi	+	+	+	-	-
P11	Babi	+	+	+	-	+
P12	Babi	+	+	+	-	-
P14	Babi	+	+	+	-	-
P15	Babi	+	+	+	-	-
P16	Babi	+	+	+	-	-
P17	Babi	+	+	+	-	-
P18	Babi	+	+	+	+	+
P19	Babi	+	+	+	-	-
P20	Babi	+	+	+	+	+
P21	Babi	+	+	+	+	-
P23	Babi	+	+	+	-	-
P24	Babi	+	+	+	-	-
P25	Babi	+	+	+	+	-

P26	Babi	+	+	+	-	-
P28	Babi	+	+	+	+	-
P29	Babi	+	+	+	+	-
P30	Babi	+	+	+	-	-

Lampiran 8. Prosedur Hibridisasi Koloni

I. Inokulasi/penanaman bakteri

1. Siapkan media (LB agar) dalam cawan Petri, lakukan uji sterilitas selama 24 jam
2. Letakkan membran filter (Hybond-N+) pada permukaan media agar
3. Inokulasi isolat bakteri pada permukaan filter, inkubasi 37⁰C selama 24 jam.

II. Pra hibridisasi

1. Filter yang ditumbuhi koloni bakteri diambil dan diletakkan pada kertas Whatman 3MM pertama yang telah dibasahi dengan 10% SDS (proses lysis) selama 3 menit
2. Letakkan membran filter di atas permukaan kertas 3MM kedua yang telah dibasahi dengan 0,5M NaOH dan 1,5M NaCl (proses denaturasi) selama 5 menit
3. Pindah membran filter dan diletakkan di atas permukaan kertas 3MM ketiga yang telah dibasahi dengan 1,5M NaCl dan 0,5M Tris-Hcl (proses netralisasi) selama 5 menit
4. Pindah membran filter ke atas permukaan kertas 3MM keempat yang telah dibasahi dengan 2x SSC selama 5 menit

5. Letakkan membran filter pada kertas 3MM kering, biarkan mengering pada suhu kamar selama 30 menit. Proses fiksasi DNA dengan mengapit filter dengan 2 kertas 3MM dengan pemanasan 80° selama 1-2 jam
6. Rendam membran filter ke dalam 2x SSC selama 5 menit
7. Rendam membran filter dalam cawan Petri larutan *pre washing* (5x SSC; 0,5% SDS; 1mM EDTA), tutup, inkubasi 50°C selama 30 menit
8. Bersihkan sisa-sisa sel bakteri dengan larutan *pre wash* yang baru.
9. Siapkan larutan Hyb-mix (untuk 50 ml):

20x SSC	12,5 ml
Aquabidest	37,5 ml
0,1% Laurysarcosine	50 mg
1% Blocking reagen	0,5 g
10% SDS	100 μl

(diutar dalam 70°C 1 jam)
10. Membran Filter direndam dalam Hyb-mix, inkubasi 1-2 jam suhu 62°C

III. Labelling (*DIG DNA Labeling and Detection Kit - BOEHRINGER MANNHEIM*)

1. Larutkan DNA sampel positif Stx1-2 ($0,5\mu\text{g}$ - $0,3\mu\text{g}$) dalam mikrotube sampai dengan volume $15\mu\text{l}$ dan didenaturasi dengan pemanasan selama 10 menit pada air mendidih, setelah itu segera masukkan dalam es atau *freezer*

2. Tambahkan dalam mikrotube: - 2 μ l hexanucleotide mix (vial 5)
- 2 μ l dNTP mixture (vial 6)
- 1 μ l Klenow enzim (vial 7)
3. Sentrifus dan di inkubasi pada suhu 37⁰C selama 60 menit
4. Tambahkan 2 μ l 0,2M EDTA, ph 8.0
5. Presipitasi DNA yang sudah dilabel dengan menambah 2,5 μ l 4M LiCl dan 75 μ l (-20⁰C) ethanol kemudian dicampur dengan baik
6. Biarkan selama 30 menit suhu -70⁰C atau 2 jam pada suhu -20⁰C
7. Sentrifus selama 30 menit. Cuci pelet DNA dengan 70% ethanol dingin sebanyak 50 μ l
8. Keringkan pelet DNA dan larutkan dengan 50 μ l TE buffer

IV. Hibridisasi

1. Probe yang sudah siap dipakai ditambahkan kedalam filter yang sedang direndam dalam Hyb-mix.
2. Hibridisasi berlangsung 1 malam suhu 62⁰C, goyang pelan

V. Post Hibridisasi

Siapkan: **Bufer 1:**

Untuk 200 ml \rightarrow Tris 2M = 12,5ml, ph 7,4

NaCl 5M = 7,5 ml