

TESIS

**DETEKSI GEN *eaeA* *ESCHERICHIA COLI* YANG
DIISOLASI DARI ORGAN VISCERAL AYAM
DENGAN MENGGUNAKAN TEKNIK
*POLYMERASE CHAIN REACTION***

PENELITIAN EKSPLORATIF LABORATORIS



Oleh :

BITYA ARIANTINI

NIM. 061714253007

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

TESIS

**DETEKSI GEN *eaeA* *ESCHERICHIA COLI* YANG
DIISOLASI DARI ORGAN VISCERAL AYAM
DENGAN MENGGUNAKAN TEKNIK
*POLYMERASE CHAIN REACTION***

PENELITIAN EKSPLORATIF LABORATORIS



Oleh :

BITYA ARIANTINI

NIM. 061714253007

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

2022

ii

**DETEKSI GEN *eaeA* *ESCHERICHIA COLI* YANG
DIISOLASI DARI ORGAN VISCERAL AYAM
DENGAN MENGGUNAKAN TEKNIK
*POLYMERASE CHAIN REACTION***

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 :

**BITYA ARIANTINI
NIM 061714253007**

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul :

**DETEKSI GEN *eaeA* *ESCHERICHIA COLI* YANG DIISOLASI DARI
ORGAN VISCERAL AYAM DENGAN MENGGUNAKAN TEKNIK
*POLYMERASE CHAIN REACTION***

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 21 Februari 2022



Bitya Ariantini
NIM 061714253007

LEMBAR PENGESAHAN

TESIS INI TELAH DISETUJUI

Tanggal: 21 Februari 2022

Oleh:

Pembimbing Ketua



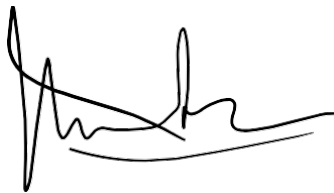
Dr. Wiwiek Tyasningsih, drh., M.Kes
NIP. 196203281988032001

Pembimbing Serta



Prof. Muchammad Yunus, drh., M.Kes., Ph.D
NIP. 19661229199303101

Mengetahui,
Ketua Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat
VeterinerFakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Dr. Eka Pramyrtha Hestianah, drh., M.Kes
NIP. 196403161990022001

Usulan Penelitian Tesis ini telah diuji dan dinilai pada

Tanggal: 10 Maret 2020

PANITIA PENGUJI USULAN PENELITIAN TESIS

Ketua : Dr. Wiwiek Tyasningsih, drh., M.Kes

Anggota : 1. Prof. Muchammad Yunus, drh., M.Kes., Ph.D
2. Prof. Dr. Suwarno, drh., M.Si
3. Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, drh
4. Prof. Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH

Tesis ini telah diuji dan dinilai pada

Tanggal: 21 Februari 2022

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Suwarno, drh., M.Si

Anggota : 1. Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, drh
2. Prof. Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH
3. Dr. Wiwiek Tyasningsih, drh., M.Kes
4. Prof. Muchammad Yunus, drh., M.Kes., Ph.D

Surabaya, 21 Februari 2022

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Mirni Lamid, drh., MP
NIP. 196201161992032001

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan penulisan tesis dengan judul **“Deteksi Gen *eaeA* *Escherichia coli* yang Diisolasi dari Organ Visceral Ayam dengan Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction*”**. Penulis menyadari bahwa pelaksanaan penelitian hingga di selesaikannya tesis ini tidak terlepas dari bantuan banyak pihak, untuk itu pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada: Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Dr. Mirni Lamid, drh., MP dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga periode 2015-2020 Prof. Dr. Pudji Sianto, M.Kes., Ph.D atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dr. Wiwiek Tyasningsih., drh., M. Kes selaku dosen pembimbing utama dan Prof. Muchammad Yunus, drh., M.Kes., Ph.D selaku dosen pembimbing serta, juga Didik Handijatno, drh., MS., Ph.D selaku dosen pembimbing utama sebelum beliau purna tugas, terima kasih atas kesediaannya dalam meluangkan waktu dan dengan sabar memberikan bimbingan, saran dan nasihat yang berguna mulai awal hingga akhir penelitian sampai penyusunan tesis ini. Prof. Dr. Suwarno., drh., M.Si selaku ketua penguji, Dr. A. T. Soelih Estoepangestie., drh dan Prof. Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH selaku dosen penguji tesis,

terima kasih atas segala nasihat dan masukan yang diberikan kepada penulis demi kesempurnaan naskah tesis ini.

Dr. Eka Pramyrtha Hestianah, drh., M.Kes., selaku ketua Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., MP selaku ketua Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga periode 2015-2020, juga seluruh dosen beserta staf kependidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah banyak membantu dan membekali ilmu selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Orang tua tercinta Bapak Drs. Sukandar (Alm) dan Mama Sri Wilujeng Indriana (Almh) atas perjuangannya selama ini. Keluarga tersayang kakak Aditya Oktariani, S.E, adik Dista Espania, S.H dan putriku Lady Viona, serta Poppa Marjhy Maratapatriata, S.T, terima kasih selama ini tidak henti-hentinya mendoakan dan memberi semangat.

Sahabat di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Dr. Aamir S.A, juga Teman seperjuangan dalam menempuh pendidikan magister drh. Alifianita, drh. Maria Aega, drh. Dhimas Toni dan drh. Citra Sari, terima kasih sudah saling membantu dan mensupport. Semoga segala bantuan kepada penulis menjadi sebuah amal ibadah yang akan dibalas oleh Tuhan Yang Maha Esa. Akhirnya penulis berharap semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Surabaya, 21 Februari 2022

Penulis

RINGKASAN

**DETEKSI GEN *eaeA* *ESCHERICHIA COLI* YANG DIISOLASI DARI
ORGAN VISCERAL AYAM DENGAN MENGGUNAKAN TEKNIK
*POLYMERASE CHAIN REACTION***

Escherichia coli adalah komponen terbesar flora normal saluran pencernaan hewan. Bakteri ini dimiliki oleh berbagai serotipe dan bisa diisolasi dari feses hewan yang sehat maupun sakit. Walaupun banyak bakteri tidak patogen, beberapa gen yang diperoleh bisa memberikan virulensi. Strain *E. coli* patogen dihubungkan dengan penyakit gastroenteritis, seperti diare dan colitis hemoragik. Strain *E. coli* patogen menyebabkan keguguran pada hewan neonatal. Sedikitnya dalam dekade terakhir, pengertian dasar genetik dan mekanisme molekular dari virulensi bakteri *E. coli* memberikan petunjuk pada mekanisme patogenesis yang dihubungkan dengan kelompok bakteri yang berbeda (Kaper and Nataro, 1998).

Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan isolat *E. coli* patogen dari ayam pada peternakan unggas di daerah Malang dan mendeteksi gen *eaeA* dengan uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sebanyak 50 ayam yang mengalami diare dan diduga mati karena Colibacillosis dari beberapa peternakan di Malang dikirim ke Laboratorium dan dilakukan nekropsi untuk diambil organnya (paru, liver dan limpa) secara aseptis.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari 50 sampel ayam, 15 sampel *suspect Escherichia coli* pada media EMBA, tetapi hanya 10 dari 15 sampel yang menunjukkan positif *Escherichia coli* melalui uji biokimiawi (IMVIC). Pada uji *enrichment* yaitu *Blood Agar* (BA) diketahui 8 dari 10 sampel tersebut menghemolisis darah. Hasil elektroforesis dari *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menunjukkan bahwa dari ke 8 sampel positif *Escherichia coli*, tidak ada sampel yang menunjukkan positif adanya gen *eaeA* yang memiliki panjang amplikon 384 bp.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan sampel yang lebih besar dengan lokasi pengambilan yang beragam.

SUMMARY

**DETECTION OF *eaeA* GENE in *Escherichia coli*
ISOLATED FROM CHICKEN VISCERAL ORGANS
BY *POLYMERASE CHAIN REACTION* TECHNIQUE**

Escherichia coli is a major component of the normal intestinal flora of animals. These bacteria belong to many different serotypes and can be isolated from the feces of both healthy and diseased animals. Whereas most of the bacteria are not pathogenic, some have acquired genes that can impart virulence. Pathogenic *E. coli* strains have been associated with gastroenteric diseases, such as diarrhea and hemorrhagic colitis. Pathogenic *E. coli* strains cause significant loss of neonatal animals. In the last few decades, understanding of the genetic basis and molecular mechanisms of the bacterial virulence of *E. coli* has shed light on the mechanisms of pathogenesis associated with this diverse group of bacteria (Kaper and Nataro, 1998).

This research was conducted to obtain pathogenic *E. coli* isolates from chickens in poultry farms in Malang area and to detect the *eaeA* gene using the *Polymerase Chain Reaction* (PCR) test. A total of 50 chickens with diarrhea and presumed dead from Colibacillosis from several farms in Malang were sent to the laboratory and necropsy was performed to take their organs (lung, liver and spleen) aseptically.

The results of this study showed that from 50 samples of chicken, 15 samples suspected *Escherichia coli* on EMBA media, but only 10 of 15 samples showed positive *Escherichia coli* through the biochemical test (IMVIC). In the enrichment test, namely *Blood Agar* (BA), it is known that 8 out of 10 samples hemolyze blood. Electrophoresis results from *Polymerase Chain Reaction* (PCR) showed that from 8 positive samples of *Escherichia coli*, none of the samples showed positive for the *eaeA* gene which had an amplicon length of 384 bp.

Further research is needed with a larger sample with a variety of sampling locations.

**DETECTION OF *eaeA* GENE in *Escherichia coli*
ISOLATED FROM CHICKEN VISCERAL ORGANS
BY *POLYMERASE CHAIN REACTION* TECHNIQUE**

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate *Escherichia coli* from chickens and to determine the presence of the *eaeA* gene, a virulence factor detected in *E. coli* at Malang area, in the isolates by *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Different chicken organs were inoculated onto blood agar and biochemical tests were performed on the suspicious isolates. A total of 50 chickens with diarrhea and presumed dead from Colibacillosis from several farms in Malang were sent to the laboratory and necropsy was performed to take their organs (lung, liver and spleen) aseptically. The results of this study showed that from 50 samples of chicken, 15 samples suspected *Escherichia coli* on EMBA media, but only 10 of 15 samples showed positive *Escherichia coli* through the biochemical test (IMVIC). In the enrichment test, namely *Blood Agar* (BA), it is known that 8 out of 10 samples hemolyze blood. DNA was extracted from these isolates and was amplified by PCR, using a pair of primers derived from the *eaeA* (virulence) gene. Electrophoresis results from *Polymerase Chain Reaction* (PCR) showed that from 8 positive samples of *Escherichia coli*, none of the samples showed positive for the *eaeA* gene which had an amplicon length of 384 bp.

Key words : *Escherichia coli*, PCR, chicken, *eaeA* gene, Malang

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN SAMPUL DALAM	ii
PRASYARAT GELAR.....	iii
PERNYATAAN.....	iv
PERSETUJUAN	v
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	viii
RINGKASAN	x
SUMMARY	xi
ABSTRACT	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xix
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat Teoritis	6
1.4.2 Manfaat Praktis.....	6
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	 7
2.1 Ayam Broiler	7
2.1.1 Tinjauan Ayam Broiler	8
2.2. Bakteri <i>Escherichia coli</i>	11
2.2.1 Klasifikasi <i>Escherichia coli</i>	13
2.2.2 Morfologi <i>Escherichia coli</i>	13
2.2.3 Sifat Pupukan	17
2.2.4 Sifat Biokimia	18
2.2.5 Toksin	19
2.2.6 Transmisi <i>Escherichia coli</i> pada Manusia	19
2.2.7 Patogenesis <i>Escherichia coli</i>	20
2.2.7.1 EPEC	20
2.2.7.2 ETEC	21
2.2.7.3 EHEC	22
2.2.7.4 EIEC	24
2.2.7.5 EAEC	24
2.2.8 Serotype <i>Escherichia coli</i>	26
2.2.9 Patogenesis Infeksi APEC.....	28

2.2.10 Uji Biokimiawi	29
2.3 Colibacillosis	30
2.4 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	31
2.4.1 Tahapan PCR.....	32
2.4.1.1 Proses Denaturasi	32
2.4.1.2 Proses <i>Annealing</i>	32
2.4.1.3 Reaksi Polimerisasi (Ekstensi)	32
2.4.2 Komponen PCR.....	33
2.4.2.1 Enzim DNA <i>Polymerase</i>	33
2.4.2.2 Primer yang digunakan.....	34
2.4.2.3 Beberapa Reagen lain yang digunakan	34
2.5 Elektroforesis	34
2.5.1 Elektroforesis DNA.....	35
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL	37
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	37
BAB 4 MATERI DAN METODE	41
4.1 Jenis dan Rencana Penelitian	41
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian	41
4.3 Definisi Operasional Variabel	41
4.4 Materi Penelitian	42
4.4.1 Pengambilan Sampel	42
4.4.2 Bahan dan Alat Penelitian	42
4.5 Metode Penelitian	43
4.5.1 Isolasi dan Identifikasi	43
4.5.2 Pemeriksaan PCR	45
4.5.2.1 Ekstraksi DNA	45
4.5.2.2 Amplifikasi Rangkaian Gen <i>eaeA</i>	46
4.5.2.3 PCR	47
4.5.2.4 Primer	47
4.5.2.5 Elektroforesis Hasil PCR	48
4.6 Kerangka Operasional Penelitian.....	49
BAB 5 HASIL PENELITIAN	50
5.1 Hasil Identifikasi <i>Eschericia coli</i>	50
5.2 Hasil Pemeriksaan Mikroskopis <i>Escherichia coli</i>	50
5.3 Uji Biokimiawi <i>Escherichia coli</i>	51
5.4 Deteksi Gen <i>eaeA</i> <i>Escherichia coli</i> menggunakan PCR	56
BAB 6 PEMBAHASAN	57
6.1 Isolasi Identifikasi <i>Escherichia coli</i>	57
6.2 Hasil Elektroforesis Produk <i>Polymerase Chain Reaction</i>	60
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	62
7.1 Kesimpulan	62

7.2 Saran	62
DAFTAR PUSTAKA.....	63
LAMPIRAN.....	69

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Primer yang digunakan dalam Pemeriksaan PCR	48
5.1. Uji Identifikasi positif <i>Escherichia coli</i>	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Ayam Pedaging (Broiler)	11
2.2 Morfologi <i>Escherichia coli</i>	16
2.3 Pewarnaan Gram <i>Escherichia coli</i>	17
2.4 Biakan <i>Escherichia coli</i> pada <i>Eosin Methylen Blue Agar</i>	18
3.1 Bagan Kerangka Konseptual Penelitian.....	37
4.1 Bagan Kerangka Operasional Penelitian	49
5.1. Media EMBA yang diduga <i>Escherichia coli</i>	50
5.2. <i>Escherichia coli</i> dilihat secara mikroskopis	51
5.3. Media Sitrat setelah diinkubasi 24 jam	51
5.4. Media Urea setelah diinkubasi 24 jam	52
5.5. Media TSIA setelah diinkubasi 24 jam	52
5.6. Media SIM membentuk cincin merah	53
5.7. Media MR berubah warna setelah ditetesi <i>methyl red</i>	53
5.8. Media VP tidak terjadi perubahan warna	54
5.9. <i>E. coli</i> patogen menghemolisis media <i>Blood Agar</i>	54
5.10. Hasil PCR gen penyandi <i>eaeA</i> isolat <i>Escherichia coli</i>	56

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1) Dokumentasi Penelitian	69
2) Blasting Primer dengan Gen <i>eaeA</i>	71

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

APEC	= <i>Avian Pathogenic Escherichia coli</i>
EPEC	= <i>Entero Pathogenic Escherichia coli</i>
ETEC	= <i>Entero Toxigenic Escherichia coli</i>
EHEC	= <i>Entero Haemorrhagic Escherichia coli</i>
EIEC	= <i>Entero Invasive Escherichia coli</i>
EAEC	= <i>Entero Aggregative Escherichia coli</i>
PCR	= <i>Polymerase Chain Reaction</i>
µm	= micrometer
EMBA	= <i>Eosin Methylen Blue Agar</i>
H ₂ S	= Hidrogen Sulfida
DNA	= <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
et al	= <i>et alia ; et alii</i>
dkk	= dan kawan kawan
kg	= kilogram
%	= persen
tsh	= <i>Thyroid stimulating hormone</i>
°C	= Derajat Celcius
µ	= mikro
ILT	= <i>Infectious Laryngotracheitis</i>
CRD	= <i>Chronic Respiratory Disease</i>
ND	= <i>New Castle Disease</i>
Aw	= <i>water activity</i>
pH	= <i>potential of Hydrogen</i>
ST	= <i>Stable Toxin</i>
LT	= <i>Labile Toxin</i>
RNA	= <i>Ribo Nucleic Acid</i>

HEP-2	= <i>Human epithelial type 2</i>
KOH	= Kalium Hidroksida
dNTP	= <i>deoksinukleotida</i>
ddNTP	= <i>dideoksinukleotida</i>
MgCl ₂	= <i>Magnesium Chlorida</i>
mm	= millimeter
OH	= Hidroksida
Stx	= Shiga toxin
MR	= <i>Methyl Red</i>
VP	= <i>Voges Proskauer</i>
UV	= <i>Ultraviolet</i>
ml	= milliliter
BA	= <i>Blood Agar</i>
µl	= microliter
HCl	= Hydrogen chloride
Nm	= Nanometer
H ₂ O	= Hidrogen dioksida
M	= Molar
NaOAC	= Natrium etanoat
rpm	= revolution per minute
IMVIC	= <i>Indol - Methyl Red - Voges Proskauer – Citrat</i>
bp	= base pair (pasangan basa)
SCA	= <i>Simmons Citrate Agar</i>
NaCl	= Natrium klorida
EDTA	= Ethylenediaminetetraacetic acid
KCl	= Kalium klorida
TE buffer	= Tris-EDTA buffer
MT	= Melting temperature