

TESIS

IDENTIFIKASI *Escherichia coli* BERSIFAT *MULTIDRUG RESISTANT* PENGHASIL TOKSIN SHIGA PADA SAMPEL SUSU SAPI SEGAR DARI BEBERAPA KUD DI PROVINSI JAWA TIMUR, INDONESIA

PENELITIAN EKSPLORATIF LABORATORIK



Oleh:

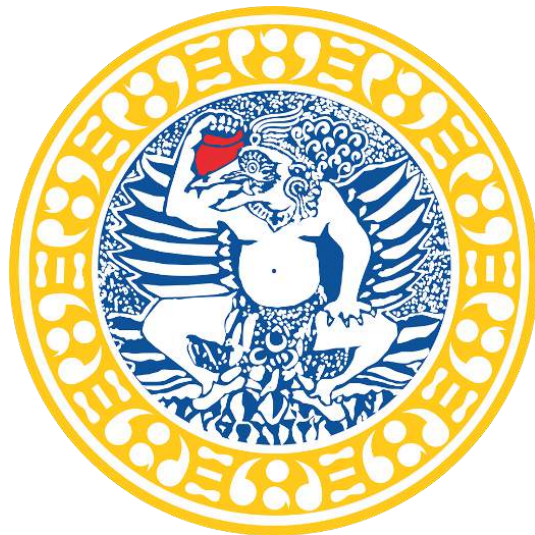
RIBBY ANSHARIETA
061824253006

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

TESIS

IDENTIFIKASI *Escherichia coli* BERSIFAT *MULTIDRUG RESISTANT* PENGHASIL TOKSIN SHIGA PADA SAMPEL SUSU SAPI SEGAR DARI BEBERAPA KUD DI PROVINSI JAWA TIMUR, INDONESIA

PENELITIAN EKSPLORATIF LABORATORIK



Oleh:

RIBBY ANSHARIETA
061824253006

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

ii

**IDENTIFIKASI *Escherichia coli* BERSIFAT *MULTIDRUG RESISTANT*
PENGHASIL TOKSIN SHIGA PADA SAMPEL SUSU SAPI SEGAR
DARI BEBERAPA KUD DI PROVINSI JAWA TIMUR,
INDONESIA**

TESIS

Untuk memperoleh gelar Magister

Dalam Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner

Pada Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

**RIBBY ANSHARIETA
061824253006**

iii

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul:

**IDENTIFIKASI *Escherichia coli* BERSIFAT *MULTIDRUG RESISTANT*
PENGHASIL TOKSIN SHIGA PADA SAMPEL SUSU SAPI SEGAR
DARI BEBERAPA KUD DI PROVINSI JAWA TIMUR,
INDONESIA**

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, 29 Mei 2020



Ribby Ansharieta

NIM. 061824253006

LEMBAR PENGESAHAN

TESIS INI TELAH DISETUJUI
Tanggal 29 Mei 2020

Oleh:

Pembimbing Ketua



Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH
NIP. 196201151988031002

Pembimbing



Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.
NIP. 195908081987012001

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



Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P.
NIP. 196208281989032001

Usulan Penelitian Tesis ini telah diuji dan dinilai pada
Tanggal: 8 Agustus 2019

PANITIA PENGUJI USULAN PENELITIAN TESIS

Ketua : Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH
Anggota : 1. Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M. Kes.
2. Dr. Wiwiek Tyasningsih, drh., M. Kes.
3. Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, drh.
4. Dr. Nenny Harijani, drh., M. Si.

Tesis ini telah diuji dan dinilai pada
Tanggal : 29 Mei 2020

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. Wiwiek Tyasningsih, drh., M. Kes.
Anggota : 1. Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, drh.
2. Dr. Nenny Harijani, drh., M. Si.
3. Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH
4. Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M. Kes.

Surabaya, 29 Mei 2020

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M. Kes
NIP. 195601051986011001

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmannirrahim

Alhamdulillah puji syukur kepada Allah SWT., karena kehendak dan ridhanya peneliti dapat menyelesaikan Tesis berjudul IDENTIFIKASI *Escherichia coli* BERSIFAT *MULTIDRUG RESISTANT* PENGHASIL TOKSIN SHIGA PADA SAMPEL SUSU SAPI SEGAR DARI BEBERAPA KUD DI PROVINSI JAWA TIMUR, INDONESIA. Peneliti menyadari Tesis ini tidak akan selesai tanpa doa, dukungan dan dorongan dari berbagai pihak. Adapun dalam kesempatan ini peneliti ingin mengucapkan banyak terima kasih kepada:

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof. Dr. Pudji Srianto, M. Kes. atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk dapat menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh. selaku Wakil Dekan 1, Dr. Mufasirin, drh., M.Si. selaku Wakil Dekan II, Prof. Dr. Suwarno, drh., M.Si. selaku Wakil Dekan III, serta Prof. Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si. selaku Kepala Bagian Akademik atas bimbingannya kepada saya selama menjalani perkuliahan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.

Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH selaku pembimbing utama, dan Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M. Kes. selaku pembimbing serta atas saran dan bimbingannya hingga saya dapat menyelesaikan Tesis ini. Dr. Wiwiek Tyasningsih, drh., M. Kes. selaku ketua penguji, Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, drh. selaku sekretaris penguji, dan Dr. Nenny Harijani, drh., M. Si. selaku anggota penguji atas semua kritik dan saran yang diberikan kepada saya.

Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P. selaku Ketua Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner yang selalu memberikan arahan dan bimbingan kepada saya selama menempuh pendidikan Magister di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Seluruh staf pengajar S2 Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas

Airlangga atas bimbingan, pendidikan, dan pengarahan selama saya mengikuti pendidikan Magister.

Orang tua tercinta Budi Santosa, S.E., M.Si dan Widyarini yang telah membesarkan, mendidik, memberikan dukungan, menyayangi, mendo'akan, dengan penuh pengorbanan sedari lahir hingga sekarang. Kakak Didya Sinatryani, S.Pi. yang telah memberikan dukungan dan motivasi kepada saya, serta Fariz Zaki Nugroho, dr. yang selalu menemani saya dan selalu mendukung saya untuk menyelesaikan Tesis ini. Pihak yang telah banyak membantu di masing-masing KUD untuk kepentingan penelitian. Sancaka Chasyer Ramandinianto, drh., Shinta Levea Ni'matul Fadlillah, drh., dan Eka Dian Sofiana, drh. selaku kolega penelitian. Wahyu Setyarini, S.Si. dan Radita Yuniar Arizandy, S.Si. selaku analis yang telah banyak meluangkan waktu dan tenaganya untuk membantu saya di laboratorium Gastrointestinal, Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga.

Zhaza Afililla, drh., dan Tantri Dyah Whidi Palupi, drh. sebagai kolega dekat yang selalu menemani dalam suka duka, juga penampung segala cerita semasa kuliah dan penelitian ini. Semua teman di S2 IPKMV, Akyun Rozaqi Syah Putra, drh., M.Si., Alifianita Anake Yansri, drh., Luvi Kristianingtyas, drh., M.Si., Puput Ade Wahyuningtyas, drh., M. Si, Nur Rusdiana, drh., Fransiska Cicilia Beka, drh., Maria Gladys Bupu Meze, drh., Amirotul Azhimah, drh., Happy Vidhyati Sartika, drh., Freshindy Marissa Wibisono, drh., Elly Nur Indasari, S.KH., dan Anjani Marisa Kartikasari, S.KH. yang telah membantu, mendukung dan mendo'akan saya hingga dapat menyelesaikan Tesis ini.

Penulis mengakui bahwa tulisan ini masih kurang dan jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang akan membantu dalam perbaikan Tesis ini. Dengan hati yang rendah hati, penulis berharap agar penelitian ini bermanfaat untuk kemajuan ilmu pengetahuan dan dapat memberikan kontribusi pada bidang kedokteran hewan dan semua orang yang membutuhkannya.

Surabaya, 29 Mei 2020

Penulis

RINGKASAN

Identifikasi *Escherichia coli* Bersifat *Multidrug Resistant* Penghasil Toksin Shiga pada Sampel Susu Sapi Segar dari Beberapa KUD di Provinsi Jawa Timur, Indonesia

Escherichia coli yang memproduksi toksin Shiga (STEC) didefinisikan sebagai kelompok *E. coli* yang dapat memproduksi sebuah toksin bernama Shiga toksin (*stx*). Terdapat dua jenis toksin utama yang ditemukan di kelompok STEC ini. Dua toksin tersebut merupakan *stx1* dan *stx2*. Menurut beberapa laporan temuan di lapangan, toksin jenis *stx2* lebih sering dijumpai dibandingkan dengan *stx1* pada isolat *E. coli* bersumber dari feces hewan ternak. Hewan ternak sapi dipercaya sebagai reservoir utama bakteri STEC ini. STEC sering diidentikkan dengan wabah *foodborne* di seluruh dunia, dengan gejala yang ringan seperti diare ringan, hingga gejala berat seperti sindrom hemolytic uremic (HUS). Makanan yang terkait dengan infeksi STEC ini adalah makanan dengan proses pemasakan yang kurang matang, seperti daging mentah, keju, susu non pasteurisasi/ susu segar, jus buah dan sayur, dan bahan-bahan asli dari alam lainnya.

Bakteri *Multidrug Resistant* (MDR) adalah ancaman utama bagi kesehatan masyarakat saat ini. Keberadaan bakteri MDR ini sering diakibatkan oleh penggunaan antibiotik yang tidak tepat dalam penanganan infeksi dan pemberiannya yang irasional. *Escherichia coli* merupakan bakteri pencemar utama di lingkungan yang mana sering dikaitkan sebagai bakteri yang mudah bermutasi dan mentransferkan gen resisten antibiotik sehingga timbul resistensi terhadap berbagai golongan antibiotik. Susu merupakan sumber pangan asal hewan yang dapat bertindak sebagai reservoir dalam penularan penyakit bakteri yang infeksius. Adanya bakteri *E. coli* dalam susu segar sering dilaporkan berkenaan dengan sumber dari *food borne disease*. Temuan *E. coli* MDR pada produk pangan asal hewan sangat tinggi. *Food borne disease* merupakan ancaman yang membahayakan karena cemaran bakteri *Escherichia coli* yang dapat berasal dari susu sapi segar. Keberadaan gen virulen penting dalam *E. coli* yakni toksin Shiga, akan menambah tingkat keparahannya dengan enzim beta laktamase yang dimiliki. Dengan demikian, diharapkan dari penelitian ini dapat memberikan gambaran akan adanya STEC MDR yang diisolasi dari susu segar di Provinsi Jawa Timur.

Susu segar diambil dari berbagai KUD di provinsi Jawa Timur dengan total sebanyak 200 sampel dalam periode waktu September - Desember 2019. Sekitar 25 ml sampel susu dari setiap peternak diambil dan ditempatkan dalam tabung steril. Sampel susu dimasukkan ke dalam *ice box* dengan suhu 4°C untuk transportasi. Setiap sampel ditanam dalam media BGLB dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Sampel positif ditanam pada media EMB Agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Koloni yang menunjukkan warna hijau metalik dimurnikan dan dilanjutkan dengan uji biokimia IMViC serta ditanam ke dalam Luria Bertani Broth untuk penyimpanan. Uji sensitivitas antibiotik menggunakan metode Kirby-Bauer didahului dengan *profiling*

resistensi antibiotik dengan hasil akhir pengelompokan pada kategori yang bersifat kualitatif dengan penilaian *sensitive*, *intermediate* dan *resistant*. Kemudian isolat yang resisten terhadap lebih dari 3 golongan antibiotik diuji PCR untuk mengetahui ada tidaknya gen *stx2* pada isolat tersebut. Ekstraksi dilakukan dengan metode *boiling*. Primer spesifik yang digunakan adalah untuk gen *stx2* F: 5'- CCA TGA CAA CGG ACA GCA GTT-3' and R: 5'- CCT GTC AAC TGA GCA CTT TG-3' dengan hasil produk amplifikasi berukuran 779 bp.

Hasil yang didapat dalam penelitian ini adalah sebanyak 139 dari 200 sampel susu segar (69,5%) tercemar oleh bakteri *E. coli* yang menandakan tingginya cemaran bakteri tersebut di dalam susu segar. Untuk pengujian antibiotik ditemukan *E. coli* yang resisten terhadap antibiotik *Tetracycline* (15,11%), *Streptomycin* (12,23%), *Trimethoprim* (9,35%), *Chloramphenicol* (5,76%) dan *Aztreonam* (2,16 %). Sejumlah 10 isolat *E. coli* MDR telah ditemukan (7.19%) dengan pola resistensi tertinggi yang tercatat terhadap empat antibiotik *Tetracycline*, *Streptomycin*, *Trimethoprim* dan *Chloramphenicol* pada 3 dari 10 isolat *E. coli* MDR. Ditemukan 1 dari 10 isolat *E coli* MDR (10%) yang positif terdapat gen *stx2*.

Penelitian ini telah berhasil mengkonfirmasi keberadaan isolat *Escherichia coli* MDR yang diisolasi dari susu sapi segar dari beberapa KUD di Provinsi Jawa Timur, disertai dengan temuan bakteri positif toksin Shiga dengan gen pengkode *stx2* pada isolat *Escherichia coli* MDR.

SUMMARY

Identification of Multidrug Resistant *Escherichia coli* Shiga Toxin Producing in Raw Milk Samples from Several Dairy Cooperation of East Java Province, Indonesia

Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) is defined as a group of *E. coli* which can produce a toxin named Shiga toxin (*stx*). There are two main types of toxins found in this STEC group. These two types are *stx1* and *stx2*. According to several reports in the field, *stx2* type toxin is more common compared to *stx1* in *E. coli* isolates sourced from livestock stool. Cattle are believed to be the main reservoir for the STEC bacteria. STEC is often identified with foodborne outbreaks throughout the world, with mild symptoms such as mild diarrhoea, to severe symptoms such as haemorrhagic colitis (HC) and haemolytic uremic syndrome (HUS). Foods related to STEC infection are foods with undercooked cooking processes, such as raw meat, cheese, non-pasteurized milk/ raw milk, fruit and vegetable juices, and other natural ingredients.

Multidrug Resistant (MDR) bacteria are is a major threat to public health today. The presence of MDR bacteria is often caused by inappropriate use of antibiotics in handling infections and irrational administration. *Escherichia coli* is a major bacterial contaminant in the environment which is often called as bacteria that easily mutate and transfer antibiotic resistant genes so the level of resistance increases to various classes of antibiotics. Milk is a food source of animal origin which can act as a reservoir in transmitting infectious bacterial diseases. The presence of *E. coli* in raw milk is often reported as a source causing food borne disease. The prevalence of *E. coli* MDR in food products of animal origin is remarkably high. Food borne disease is a dangerous threat due to contamination of *Escherichia coli* bacteria that can come from raw cow's milk. The presence of an important virulent gene in *E. coli*, the Shiga toxin, will increase its severity with its beta lactamase enzyme. Thus, it is expected that this study can identify the present of positive STEC MDR isolated from raw milk in East Java Province.

Raw cow's milks were taken from various Dairy Cooperation in the province of East Java with a total of 200 samples in the period between September - December 2019. About 25 ml of milk samples from each farm were taken and placed in sterile tubes. Milk samples were put into ice boxes with a temperature of 4°C for transportation. Each sample was cultured in BGLB media and incubated at 37°C for 18-24 hours. Positive samples were cultured on EMB agar and incubated at 37°C for 18-24 hours. Colonies showing metallic green colour were purified and later tested with the IMViC biochemical test and stored into Luria Bertani Broth media. Antibiotic sensitivity test is preceded by antibiotic resistance profiling with final results grouping in qualitative categories which are sensitive, intermediate and resistant categories. MDR *E. coli* isolates which resistant to 3 or more antibiotic classes, then followed by PCR method to find out the presence or absence of the *stx2* gene in the isolate. Extraction is done by boiling method. The specific primers used for the *stx2* are F: 5'-CCA TGA CAA CGG ACA GCA

GTT-3' and R: 5'-CCT GTC AAC TGA GCA CTT TG-3' with an amplification product size of 779 bp.

The results obtained in this study were 139 of 200 raw cow's milk samples (69.5%) were contaminated by *E. coli*, which indicates the high contamination of these bacteria in the raw milk. For antibiotic sensitivity testing, found *E. coli* which were resistant to *Tetracycline* (15.11%), *Streptomycin* (12.23%), *Trimethoprim* (9.35%), *Chloramphenicol* (5.76%) and *Aztreonam* (2.16%). A total of 10 *E. coli* MDR isolates have been found (7.19%) with the highest resistance pattern recorded against the four antibiotics *Tetracycline*, *Streptomycin*, *Trimethoprim* and *Chloramphenicol* in 3 out of 10 MDR *E. coli* isolates. One out of 10 isolates of *E. coli* MDR (10%) were positive with the *stx2* gene.

This study confirmed the presence of MDR *Escherichia coli* isolates, isolated from raw cow's milk from several Dairy Cooperation in East Java Province, and also found positive Shiga toxin bacteria with the *stx2* encoding gene in MDR *Escherichia coli* isolates.