

IDENTIFIKASI SUBTIPE *Enterotoxigenic Escherichia coli* DAN *Enteroadgregative Escherichia coli* DARI SPESIMEN USAP DUBUR PENJAMAH MAKANAN DI DENPASAR MENGGUNAKAN *POLYMERASE CHAIN REACTION*

D A Indah Gitaswari¹, Sri Budayanti²

¹Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

²Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

ABSTRAK

Penjamah makanan atau *food handler* memiliki risiko paling tinggi untuk terpapar penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Penjamah makanan dapat bertindak sebagai *carrier* penyakit infeksi seperti demam tifoid, hepatitis A, dan diare. Hal ini disebabkan karena kurangnya kemampuan dari penjamah makanan dalam menjaga kebersihan. Bakteri patogen tersering sebagai penyebab diare adalah *Escherichia coli* yang diperkirakan sebagai penyebab 1.5 juta kematian per tahun. Bakteri *Escherichia coli* memiliki beberapa sub tipe penyebab diare yang disebut *Diarrheagenic Escherichia Coli* (DEC) diantaranya adalah *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC), *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC), *Enteroadgregative Escherichia coli* (EAEC), *Vero toxin-producing/Shiga toxin-producing Escherichia coli* (VTEC/STEC), *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC). *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) dan *Enteroadgregative Escherichia coli* (EAEC) paling sering sebagai penyebab diare. Saat ini prevalensi sub tipe *Escherichia coli* sebagai penyebab diare di Bali masih belum diketahui secara pasti. Untuk melihat prevalensi tersebut, pada penelitian ini akan diteliti tipe ETEC dan EAEC dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) unipleks. Sampel merupakan isolat *Escherichia coli* dari spesimen usap dubur penjamah makanan di Denpasar tahun 2015. Gen target untuk identifikasi ETEC dan EAEC adalah CVD432 (630 bp), LT (273 bp), dan STh (120 bp). Program PCR yang digunakan pada tahap pre denaturasi 95°C, denaturasi 95°C, suhu *annealing* 55°C, ekstensi 72°C, dan final ekstensi 72°C. Hasil penelitian didapatkan bahwa prevalensi bakteri *Escherichia coli* menunjukkan 40% memiliki hasil yang positif terhadap gen ETEC atau EAEC. Dari 40% sampel positif, 31,4% merupakan sub tipe EAEC; 5,7% sub tipe ETEC; dan 3% memiliki kedua gen yaitu ETEC dan EAEC.

Kata kunci: *Polymerase Chain Reaction, Enteroadgregative Escherichia coli, Enterotoxigenic Escherichia coli*

ABSTRACT

Food handler is a position that has the highest risk to get an exposure from any bacterial disease. Food handler can be act as the carrier for kind of infectious diseases such as typhoid fever, Hepatitis A, and diarrhea. It caused by the lack of their capability in maintain their cleanliness. The most causative pathogen of diarrhea is *Escherichia coli* that estimated to contribute in 1.5 billion of deaths each year. *Escherichia coli* has some subtypes as the etiology of diarrhea disease which called *Diarrheagenic Escherichia Coli* (DEC), sort of them are *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC), *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC), *Enteroadgregative Escherichia coli* (EAEC), *Vero toxin-producing/Shiga toxin-producing Escherichia coli* (VTEC/STEC), and *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC). *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) and *Enteroadgregative Escherichia coli* (EAEC) are merely accounted as the cause of diarrhea. However, epidemiologic data about the prevalence subtypes of *Escherichia coli* as the diarrhea pathogen in Bali is unclear. In the present study, we identified ETEC and EAEC subtypes using *Polymerase Chain Reaction* (PCR) uniplex. Sample used is an isolate of *Escherichia coli* from rectal swab specimen of food handler in Denpasar at year 2015. The gene target to identify ETEC and EAEC are CVD432 (630 bp), LT (273 bp), and STh (120 bp). PCR program that used was in the pre-denaturation phase 95°C, denaturation 95°C, annealing temperature 55°C, extension 72°C, and extension final 72°C. Result shows the prevalence of *Escherichia coli* is 40%

positive of bacteria from total gene from ETEC and EAEC. Respectively, from 40% positive sample, 31.4% is EAEC subtype; 5.7% ETEC subtype; and 3% having both ETEC and EAEC subtypes.

Keywords: *Polymerase Chain Reaction, Enteroaggregative Escherichia coli, Enterotoxigenic Escherichia coli*

PENDAHULUAN

Makanan merupakan kebutuhan pokok yang penting bagi manusia. Namun saat ini melalui makanan dapat menimbulkan masalah, salah satunya adalah penyakit yang dapat disebarkan melalui makanan seperti diare atau keracunan makanan. Penelitian yang dilakukan di beberapa Negara industri menunjukkan lebih dari 60% *food borne disease* disebabkan karena buruknya kemampuan penjamah makanan atau food handler untuk mengolah makanan¹. Bakteri dan parasit lebih sering menyebabkan diare dibandingkan virus di beberapa Negara berkembang. Bakteri pathogen tersering penyebab diare adalah *Escherichia coli*, *Shigella*, *Campylobacter* dan *Salmonella* bersama dengan *Vibrio cholera*². *Diarrheagenic Escherichia coli* (DEC) merupakan penyebab diare tersering dan memiliki beberapa sub tipe. Masing-masing sub tipe *Escherichia coli* yang dapat menyebabkan diare dilihat berdasarkan faktor virulen spesifik dan fenotipnya. Sub tipe DEC diantaranya adalah *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) sebagai penyebab diare pada traveler, *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) yang tergolong jarang menyebabkan diare pada orang dewasa dan sering menyerang anak-anak dibawah dua tahun, *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC) sebagai penyebab diare yang disertai demam, *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC) sebagai penyebab *watery diarrhea* pada anak dan diare persisten pada anak dengan *human immunodeficiency virus* (HIV), *Vero toxinproducing/ Shiga toxin-producing Escherichia coli* (VTEC/STEC), *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) sebagai penyebab diare berdarah, *hemorrhagic colitis* berat, dan *hemolytic uremic syndrome* pada 6-8% kasus, dan yang terakhir adalah *diffusely adherent Escherichia coli* (DAEC)³.

Adanya beberapa tipe *Escherichia coli* yang sudah resisten terhadap beberapa antibiotik menyebabkan pemilihan antibiotik merupakan hal yang krusial mengingat beberapa komplikasi dapat ditimbulkan pada infeksi *diarrhaegenic Escherichia coli* (DEC) seperti anemia hemolitik, trombositopenia, dan gagal ginjal akut. Disamping itu, penggunaan antibiotik yang tidak tepat dapat meningkatkan produksi toksin pada beberapa tipe dari DEC tersebut, seperti pada peningkatan

produksi Shig-toxins (Stx) dapat memperburuk *hemolytic uremic syndrome* (HUS) dan menimbulkan komplikasi. Prevalensi sub tipe *Escherichia coli* sebagai penyebab diare di Bali masih belum diketahui secara pasti. Infeksi dengan beberapa tipe dari DEC dapat menyebabkan akibat yang fatal terutama pada anakanak dan usia lanjut karena dapat menyebabkan beberapa komplikasi seperti *hemolytic uremic syndrome* (HUS) dan *hemorrhagic colitis* (HC)³.

Identifikasi beberapa jenis DEC memiliki keuntungan dalam pengobatan bagi pasien diare dengan menggunakan beberapa pemeriksaan molekuler, salah satunya adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR)⁴. Melihat permasalahan tersebut, maka pengenalan sub tipe *Escherichia coli* ini menjadi penting terutama untuk menentukan jenis pengobatan yang akan dilakukan⁵. Karena keterbatasan penelitian dan melihat prevalensi sub tipe yang saat ini mendominasi, penelitian hanya dilakukan untuk mengidentifikasi dua sub tipe dengan menggunakan metode PCR unipleks. Dua sub tipe *Escherichia coli* tersebut adalah tipe ETEC dan EAEC.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif dengan pendekatan *cross sectional study*. Populasi target adalah seluruh bakteri yang terisolasi dari penjamah makanan di Denpasar. Populasi terjangkau yang dimaksud dalam penelitian ini adalah bakteri *coliform* yang terdapat dari usap dubur penjamah makanan di Denpasar. Penelitian ini menggunakan teknik *Total Sampling*. Sampel adalah isolat bakteri *Escherichia coli* dari penjamah makanan di Denpasar pada tahun 2015.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, pada bulan Maret sampai Oktober 2015.

Pengambilan Koloni dan Isolasi DNA *E.coli*

Sampel dalam bentuk padat dilakukan striking 4 kuadran pada plate Mac Conkey (MC), dikultur dalam waktu 18-24 jam pada suhu 37°C. Sampel kemudian dikonfirmasi dengan pengecatan gram, uji katalase, dan uji biokimia, lalu dimasukkan kedalam *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Isolasi DNA dilakukan dengan metode *boiling* selama 10 menit sejumlah 10 mL yang sudah dilarutkan

dengan *buffer* TE pada suhu 99°C. Selanjutnya suspensi disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm untuk didapatkan DNA murni. DNA disimpan dalam suhu -20°C digunakan sebagai *template* pada PCR.

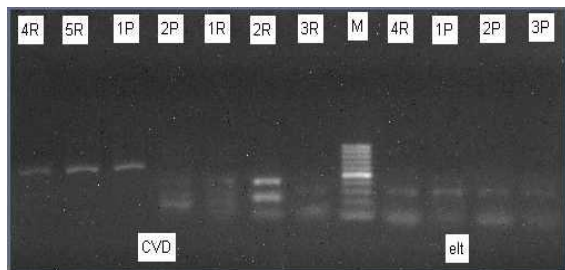
PCR untuk Mendeteksi Gen ETEC dan EAEC pada *E. coli*

DNA murni dimasukkan dalam program PCR dengan mencampur ReadyMix dan taq polymerase dengan primer ETEC dan EAEC sebagai produk PCR. PCR unipleks untuk mendeteksi gen EAEC menggunakan primer CVD432; *Forward*: 5'-CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT-3' & *Reverse*: 5'-AAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T-3'. Mendeteksi gen ETEC dengan produk gen LT menggunakan primer *elt* *Forward*: 5'-ACG GCG TTA CTA TCC TCT C-3' & *Reverse*: 5' TGG TCT CGG TCA GAT ATG TG-3'. Gen ETEC juga dapat dideteksi dengan primer *estA2-4*; *Forward*: 5'-TTC ACC TTT CCC TCA GGA TG-3' & *Reverse*: 5'-CTA TTC ATG CTT TCA GGA CCA-3'.⁷

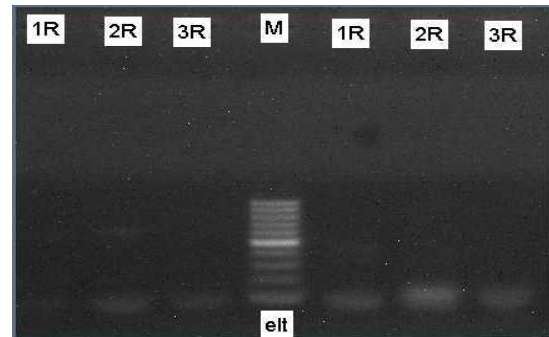
Suhu *annealing* yang ditetapkan adalah 55°C. Volume reaksi akhir sebanyak 10µL mengandung 0,8µL *template* DNA, MasterMix Kappa Biosystem 5µL, H₂O 3,2µL, primer *forward* 0,5µL dan primer *reward* 0,5µL.

Elektroforesis

Masing-masing 2 µL produk PCR diambil untuk elektroforesis dengan tegangan listrik 50 volt selama 60 menit. Gambaran hasil dibaca dengan Gel-Doc Bio-Rad.



Gambar 3. Hasil elektroforesis pada target gen pCVD432 dan elt



Gambar 4. Hasil elektroforesis pada target gen dan elt

HASIL

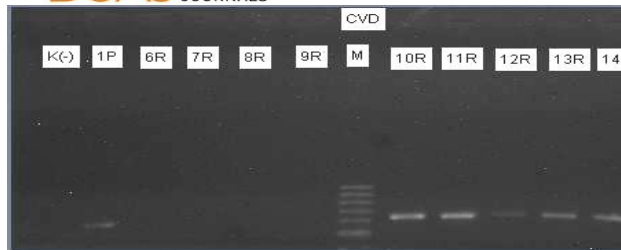
Deskripsi Karakteristik Sampel

Pada 35 isolat *Escherichia coli*, didapatkan 14 (40%) sampel yang positif terdapat gen ETEC maupun EAEC. Gen EAEC positif pada target gen CVD432 sebesar 630 bp⁶. Gen ETEC dengan produk gen LT positif pada target gen *elt* sebesar 273 bp⁷. Gen ETEC dengan produk gen Sth positif pada target gen *estA2-4* sebesar 120 bp⁷.

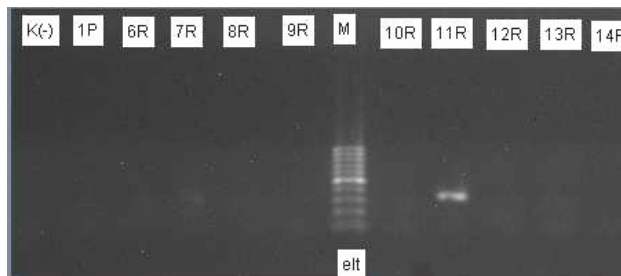
Tabel 2. Hasil PCR pada 35 sampel spesimen usap dubur sebagai karier *Escherichia coli* di Denpasar tahun 2015

Subtipe	Target Gen	Jumlah
	CVD432	11
	estA2-4	1
	elt	1
	estA2-4 dan elt	-
	est A2-4 dan CVD432	-
	elt dan CVD432	-
	estA2-4, elt, dan CVD432	1
Negatif		21
Total		35

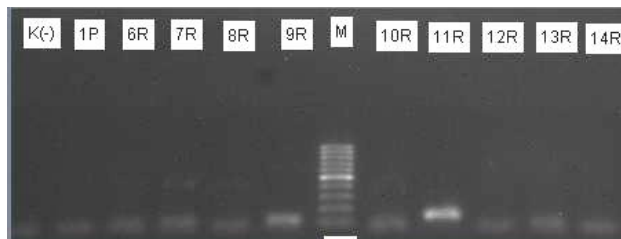
Dari tabel didapatkan bahwa 14 (40%) dari sampel menunjukkan hasil positif terhadap gen ETEC dan EAEC. Gen EAEC memiliki prevalensi tertinggi dari total sampel yang positif yaitu sebanyak 11 (31,4%) sementara untuk gen ETEC hanya 2 (5,7%). Pada penelitian ini didapatkan 1 sampel (3%) positif pada ketiga primer.



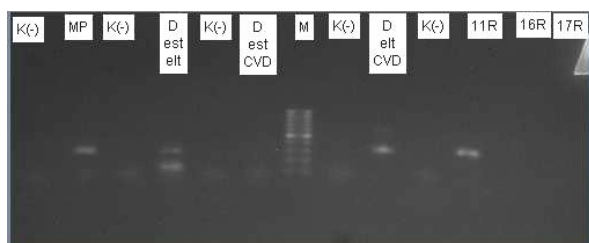
Gambar 6. Contoh hasil positif pada target gen EAEC primer pCVD432 positif pada 10R,11R, 12R, 13R, 14R dengan panjang pita 630 bp



Gambar 7. Contoh hasil positif pada primer elt pada 11R dengan panjang pita 273bp



Gambar 8. Contoh hasil positif primer est pada 11R dengan panjang pita 120 bp



Gambar 9. Contoh hasil positif pada dupleks terlihat pada kedua primer yaitu est dan elt pada sampel 11R. Ini menunjukkan sampel 11R positif pada gen ETEC dan EAEC.

PEMBAHASAN

Deteksi sub tipe spesifik pada diarrheagenic *Escherichia coli* saat ini dilakukan akibat *outbreak* infeksi diare di beberapa negara. Adanya overlap pada target gen, dimana ada satu sampel memiliki dua jenis gen dan gejala pada sub tipe *Escherichia*

coli yang berbeda dapat menyulitkan Identifikasi. Beberapa sub tipe *Escherichia coli* yang resisten terhadap beberapa antibiotik menyebabkan pemilihan antibiotik merupakan hal yang krusial mengingat beberapa komplikasi dapat ditimbulkan pada infeksi *diarrhaegenic Escherichia coli* (DEC) seperti anemia hemolitik, trombositopenia, dan gagal ginjal akut. Disamping itu, penggunaan antibiotik yang tidak tepat dapat meningkatkan produksi toksin pada beberapa tipe dari DEC tersebut, seperti pada peningkatan produksi Shig-toxins (Stx) dapat memperburuk *hemolytic uremic syndrome* dan menimbulkan komplikasi. PCR merupakan salah satu metode biologi molekuler yang memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi dalam mendeteksi target DNA. Metode PCR dapat digunakan untuk mendeteksi gen virulen pada DEC⁶.

Pada penelitian ini dalam mendeteksi sub tipe DEC dari bakteri yang sudah dikultur pada usap dubur penjamah makanan menggunakan metode PCR unipleks dan dupleks. PCR unipleks sangat baik digunakan untuk mengidentifikasi sub tipe dari DEC pada penelitian ini yaitu ETEC dan EAEC karena marker virulen pada kedua tipe bisa terlihat dengan jelas.

Penelitian yang dilakukan oleh Hedge, A di Manipal University, India dengan menggunakan metode PCR ditemukan bahwa total 52 (26%) dari total 200 sampel feses diare pada anak-anak merupakan DEC. Prevalensi sub tipe DEC pada PCR terdeteksi yakni pada gen EAEC memiliki prevalensi tertinggi yaitu 26,13% sedangkan untuk EAEC hanya 7%, sisanya diikuti oleh sub tipe DEC yang lain dari total sampel⁷. Penelitian yang sama juga dilakukan di Kenya pada anak-anak dibawah 5 tahun dengan HIV menunjukkan bahwa dari 36 bakteri patogen yang teridentifikasi, EAEC memiliki prevalensi tertinggi yaitu 58,3%, sementara ETEC hanya 5,6%⁸. Hasil yang didapat peneliti dengan menggunakan metode single PCR saat ini dari 35 sampel spesimen usap dubur pada penjamah makanan di Denpasar, 14 (40%) diantaranya teridentifikasi terdapat bakteri yang patogen. EAEC memiliki prevalensi tertinggi yaitu 11 (31,4%), dan untuk sub tipe ETEC hanya 2 (5,7%). Ini menunjukkan hasil yang sama pada prevalensi yang dilakukan pada penelitian sebelumnya.

Tipe ETEC memiliki prevalensi yang lebih rendah dibandingkan dengan EAEC disebabkan oleh eksotoksin yang dihasilkan oleh ETEC yaitu *heat-labile exotoxin* (LT) merangsang pembentukan antibodi. LT membentuk antibodi penetralisasi dalam serum dan memungkinkan juga pada lumen usus pada penderita infeksi akibat ETEC. Sehingga, pasien pada daerah dengan prevalensi ETEC tinggi seperti pada

negara berkembang kemungkinan besar telah memiliki antibodi dan tidak mudah mengalami diare apabila terpapar ulang oleh *Escherichia coli* penghasil eksotoksin LT⁹.

SIMPULAN

Pada penelitian ini peneliti masih terbatas pada penggunaan metode PCR unipleks dalam mengidentifikasi sub tipe dari *Diarrheagenic Escherichia coli*. Didapatkan prevalensi bakteri *Escherichia coli* yang positif pada penjamah makanan sebagai karier adalah 40%. Dari 40% tersebut, sub tipe EAEC memiliki prevalensi tertinggi yaitu sebanyak 31,4%, sub tipe ETEC memiliki prevalensi 5,7% dan satu bakteri memiliki kedua gen yaitu ETEC dan EAEC dengan prevalensi 3%.

Kelemahan dari penelitian ini adalah diperlukannya sampel yang lebih banyak untuk mendeteksi sub tipe dari DEC. Diharapkan pada penelitian ini dapat menggunakan jumlah sampel yang lebih besar.

Daftar Pustaka

1. Puspita I, Palandeng H, Sinolungan J. "Hubungan Praktik Higiene Sanitasi Penjamah Makanan Terhadap Cemaran *Escherichia coli* Pada Makanan Gado-gado Di Sepanjang Jalan Kota Manado," Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Sam Ratulangi. 2013
2. Aslani MM, Alikhani MY, Zavari A, dkk. "Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern," Elsevier International Journal of Infectious Disease. 2010:136-139.
3. Vinamont I. "Clinical relevance of diarrhaegenic *E.coli* detection: A distinction between toxin producing diarrhaegenic *E.coli* and diarrhaegenic *E.coli* type that cause a self-inflicted immune response," Utrecht University. 2013.
4. Arisman. "Buku Ajar Ilmu Gizi Keracunan Makanan,". Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. 2009
5. Toma C, Yan Lu, Higa N, dkk. "*Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrhaegenic Escherichia coli*," Journal of Clinical Microbiology. 2003:2669-2671.
6. Hedge A, "Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR," Indian Journal Medical Microbiology. 2012
7. Tobias J, Vutukuru, SR. "Simple and rapid multiplex PCR for identification of the main human diarrheagenic *Escherichia coli*," Elsevier Microbiological Research. 2012:564-570.
8. Rono SJ, Kakai R, Esamai F, dkk. "Pathotypes and Virulence Markers in *Escherichia coli* Associated with Diarrhoea Among HIV Seropositive and Seronegative Children Below Five Years in Western Kenya," European Scientific Journal. 2014:10:27.
9. Brooks. GF, Carroll KC., Butel, JS dkk. "Mikrobiologi Kedokteran" Edisi 25. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. 2013