

IDENTIFIKASI SUBTIPE *Enterotoxigenic Escherichia coli* DAN *Enteroaggregative Escherichia coli* PADA BIJI KOPI FESES LUWAK (*Paradoxurus hermaphroditus*) DARI BEBERAPA AGROWISATA DI BALI

I Gede Bhima Wira Guna¹, Ni Nyoman Sri Budayanti², Made Agus Hendrayana², I Dewa Made Sukrama²

¹Program Studi Sarjana Kedokteran dan Profesi Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

²Departemen Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

korespondensi: nyomansribudayanti@gmail.com

ABSTRAK

Latar Belakang: Kopi luwak merupakan salah satu kopi yang terkenal akan cita rasanya. Indonesia merupakan salah satu penghasil kopi luwak terbaik di dunia, Bali merupakan salah satu tempat yang banyak memproduksi kopi luwak. Kopi luwak berasal dari hasil pencernaan hewan luwak yang memakan biji kopi. Luwak merupakan hewan berdarah panas yang didalam sistem pencernaannya terdapat banyak bakteri flora normal, yaitu *Escherichia coli*. Pada proses pengolahan dari biji kopi feses luwak masih banyak dilakukan secara tradisional, hal tersebut membuat petani luwak yang mengolah berpeluang tercemar bakteri *Escherichia coli* sehingga dapat menyebabkan diare. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi adanya bakteri *Escherichia coli* sub tipe *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) dan *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC) pada biji kopi feses luwak dari beberapa agrowisata di Bali. Metode: Penelitian ini adalah penelitian deskriptif dengan rancangan penelitian observasional. Penelitian ini menggunakan sebanyak 18 sampel yang diambil pada agrowisata di setiap kabupaten dan kota di Bali. Seluruh sampel diperiksa di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Sampel tersebut dikultur pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) dan hasil murni bakteri *Escherichia coli* dilanjutkan uji konfrontasi menggunakan pengecatan gram, serta tahap identifikasi sub tipe ETEC dan EAEC dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hasil: Dari 18 sampel yang dikumpulkan, 13 (72%) sampel positif bakteri *Escherichia coli*. 13 sampel positif dilanjutkan ke proses PCR dan didapatkan tidak terdeteksi adanya sub tipe ETEC dan EAEC. Simpulan: Pada penelitian ini ditemukan bakteri *Escherichia coli* pada Sebagian besar sampel biji kopi feses luwak yaitu 72%. Namun setelah diidentifikasi lebih lanjut pada metode PCR, tidak adanya sub tipe ETEC dan EAEC pada seluruh sampel positif *Escherichia coli*.

Kata Kunci : Biji kopi feses luwak, *Escherichia coli*, Diare

ABSTRACT

Background: Luwak coffee is one of the coffees that is famous for its taste. Indonesia is one of the best civet coffee producers in the world, Bali is one of the places that produces a lot of civet coffee. Luwak coffee comes from the digestion of civet animals that eat coffee beans. Civets are warm-blooded animals that in their digestive system there are many normal flora bacteria, namely *Escherichia coli*. In the processing of civet feces coffee beans are still mostly done traditionally, this makes the civet farmers who process it likely to be contaminated with *Escherichia coli* bacteria so that it can cause diarrhea. This study aims to identify the presence of *Escherichia coli* bacteria subtypes *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) and *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC) in civet faeces coffee beans from several agro-tourism areas in Bali. Methods: This research is a descriptive study with an observational research design. This study used 18 samples taken from agro-tourism in every district and city in Bali. All samples were examined at the Microbiology Laboratory, Faculty of Medicine, Udayana University. The samples were cultured on *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) media and pure *Escherichia coli* bacteria were followed by a confrontation test using gram staining, and the identification of ETEC and EAEC subtypes using the *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method. Results: Of the 18 samples collected, 13 (72%) samples were positive for *Escherichia coli* bacteria. 13 positive samples were continued for the PCR process and it was found that no ETEC and EAEC subtypes were detected. Conclusion: In this study, *Escherichia coli* bacteria were found in most samples

of civet feces coffee beans, namely 72%. However, after further identification using the PCR method, there were no ETEC and EAEC subtypes in all *Escherichia coli* positive samples.

Keywords : *Civet feces coffee beans, Escherichia coli, Diarrhea*

1. PENDAHULUAN

Diare atau *diarrheal disease* merupakan penyakit yang sering ditandai dengan bertambahnya frekuensi buang air besar lebih dari tiga kali atau lebih dalam sehari disertai feses yang cair. Penyakit ini merupakan gejala infeksi gastrointestinal yang disebabkan oleh bakteri, virus, maupun parasite. Diare sering di sebabkan oleh beberapa jenis bakteri seperti *Shigella*, *Campylobacter*, *Salmonella*, dan *Escherichia coli*.¹

Kasus diare setiap tahunnya terdapat sekitar 2 milyar kasus di dunia. 2,5 juta kasus diare diketahui telah menyebabkan kematian setiap tahunnya di dunia. 1,9 juta kasus diare menyebabkan kematian terhadap anak dibawah umur 5 tahun. Di Amerika Serikat kejadian kasus diare telah mencapai sekitar 200-300 juta kasus tiap tahunnya. Kasus diare di Amerika dominan terjadi terhadap orang lanjut usia. Penyakit diare sering kali ditemukan pada negara berkembang, salah satunya adalah Indonesia. Pada tahun 2016 Indonesia mencatat orang yang menderita diare hingga 6.897.463 kasus. Depkes RI mencatat bahwa penyakit diare adalah penyakit dengan urutan kedua yang menyebabkan kematian pada balita di Indonesia setelah pneumonia.^{2,3,4} Data kasus diare pada Provinsi Bali hingga saat ini masih terbilang tinggi. Di tahun 2017 jumlah kasus diare tercatat 114.656 kasus dengan perbandingan 270 kasus per 1000 orang. Hal tersebut jauh meningkat 10 kali dibandingkan tahun sebelumnya. Untuk kasus diare yang dapat tertangani sebanyak 63.293 kasus dalam persentase 55,2%, hal ini menurun dengan kasus penanganan pada tahun 2016.⁵

Kopi luwak adalah kopi yang sudah tidak asing terdengar di telinga semua orang, kopi ini memiliki citra rasa yang khas dan memiliki nilai jual yang tinggi dipasaran nasional maupun internasional. *International Coffee Organisation* (ICO) mencatat, pengonsumsi kopi didunia mencapai 157,8 juta/ 60 kg kantong kopi pada tahun 2016-2017.⁶ Indonesia adalah negara pengekspor kopi terbesar keempat di dunia, salah satunya merupakan kopi luwak.⁷ Dibalik harganya yang mahal, kopi luwak dihasilkan dari proses pencernaan hewan luwak yang disebut dengan biji kopi feses kopi luwak. Hewan luwak atau musang jenis *Paradoxorus hermaphroditus* ini adalah hewan pemakan buah kopi dan tergolong hewan omnivora. Luwak adalah hewan yang memiliki pencernaan yang fleksibel, sehingga luwak memiliki pola makan yang selektif. Sistem pencernaan pada hewan luwak terdapat bakteri *xilanolitik*, *selulolitik*, dan *proteolitik* yang akan menghasilkan enzim-enzim untuk membantu proses fermentasi. Pada usus hewan luwak juga terdapat berbagai bakteri yang akan membantu dalam proses pencernaan.^{8,9} Bakteri dan enzim pada sistem pencernaan luwak menyebabkan proses fermentasi pada biji kopi berlangsung sangat cepat, sekitar 12 jam. Hasil dari fermentasi inilah yang

akan diolah menjadi kopi luwak nantinya. Hasil pencernaan tersebut berupa biji kopi feses luwak yang akan diolah kembali menjadi kopi.¹⁰

Pada umumnya setiap feses manusia maupun hewan, dicurigai mengandung bakteri flora normal yang ikut terbawa bersama feses tersebut. Hal ini tentu sangat berbahaya bagi pengolah biji kopi luwak sehingga dapat menyebabkan gangguan sistem pencernaan. Bakteri flora normal yang terdapat pada feses adalah bakteri *Escherichia coli*. Bakteri *Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif yang terdapat pada usus manusia dan hewan berdarah panas, bakteri *Escherichia coli* bertugas untuk membantu pencernaan dalam tubuh. Bakteri *Escherichia coli* pada umumnya tidak semua berbahaya, tetapi terdapat beberapa jenis bakteri ini yang mengalami patogen sehingga dapat mengganggu sistem pencernaan apabila terkena bakteri ini. Beberapa penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen ini yaitu diare, *hemolytic uremic syndrome (HUS)*, dan infeksi saluran kemih.¹¹

Diarrheagenic Escherichia coli (DEC) merupakan bakteri patogen *Escherichia coli* yang paling sering menyebabkan diare. *Diarrheagenic Escherichia coli* (DEC) memiliki beberapa sub tipe, diantara sub tipe tersebut, *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) dan *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC) yang paling berpotensi terjadinya kasus diare pada negara berkembang. *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) merupakan penyebab utama diare akut dengan dehidrasi yang biasa terjadi pada anak-anak maupun orang dewasa di negara berkembang. *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC) merupakan penyebab terjadinya diare persisten dan *watery diarrhea* pada anak, serta penyebab tersering kedua kejadian *travelers' diarrhea* setelah ETEC.^{12,13}

Berdasarkan data tersebut itu perlu diadakan penelitian untuk membuktikan adanya *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) dan *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC) pada biji kopi feses luwak. Tujuan untuk mencegah pencemaran bakteri patogen *Escherichia coli* pada petani pengolah biji kopi feses luwak. Dalam proses identifikasi bakteri *Escherichia coli* peneliti akan menggunakan metode kultur dan untuk mengidentifikasi sub tipe *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) dan *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC) peneliti akan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).¹⁴

2. BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menerapkan jenis penelitian deskriptif dengan rancangan penelitian observasional. Agrowisata luwak di Bali sebagai populasi terjangkau penelitian ini. Sedangkan, untuk sampel penelitian yang digunakan yaitu biji kopi feses luwak yang berada pada agrowisata setianp kabupaten kota di wilayah Bali

tahun 2021, serta memenuhi kriteria inklusi. Teknik penentuan sampel pada penelitian ini adalah *cluster purposive sampling* dengan jumlah sampel sebanyak 18 sampel penelitian yang diambil dari 18 Agrowisata di 9 kabupaten/kota yang ada pada wilayah Pulau Bali.

Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Penelitian ini telah mendapat kelaikan etik dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dengan rincian No:473/UN14.2.2.VII.14/LT/2021.

Kultur Bakteri *Escherichia coli*

Sampel biji kopi feses luwak dihaluskan dengan mortar dan diambil sebanyak 1 gram, lalu ditumbuhkan pada media *Tryptic Soy Broth* (TSB) yang sudah diberikan label. Tahap selanjutnya, sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Seluruh sampel yang telah diinkubasi akan tampak gelembung-gelembung gas dan berwarna keruh pada media TSB dan dilanjutkan ke tahap inokulasi pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) dengan metode *quadrant streak* dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 1x24 jam dengan posisi cawan terbalik. Setelah diinkubasi pada media selektif EMBA ditemukan pertumbuhan bakteri dengan koloni berwarna hijau metalik dengan titik hitam ditengahnya yang menandakan positif bakteri *Escherichia coli*. Setelah didapatkan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, akan dilakukan subkultur dengan media yang sama dan langkah yang sama untuk mendapatkan bakteri murni *Escherichia coli*.

Pengecatan Gram Bakteri *Escherichia coli*

Hasil subkultur bakteri *Escherichia coli* akan diambil 1 koloni. Selanjutnya Bakteri tersebut diletakan pada kaca objek yang akan diberikan larutan aquades, kristal violet, lugol, alkohol 95%, dan safranin. Setelah diberikan larutan dan air mengalir, preparat siap diamati dibawah mikroskop.

Identifikasi PCR untuk Mendeteksi Subtipe ETEC dan EAEC

Dalam proses identifikasi dengan metode PCR bakteri *Escherichia coli* subtipe ETEC menggunakan *elt* sebagai target sedangkan subtipe EAEC menggunakan CVD432 sebagai gen target.

Tabel 1 Daftar primer, sekuens dan ukuran bp yang digunakan dalam penelitian.¹⁵

Target gen	Primer	bp
<i>elt</i>	ACGGCGTTACTATCCT	273
	CTC	
	TGGTCTCGGTCAGAT	
CVD432	ATGTG	630
	CTGGCGAAAGACTGT	
	ATCAT	
	AAATGTATAGAAATC	
	CGCTGTT	

Tahap pertama adalah isolasi DNA menggunakan metode *boiling* dengan memasukan sampel murni kedalam kedalam larutan *buffer Tris-EDTA* (TE) selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih dengan suhu 100°C selama 10 menit. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 8000rpm selama 1 menit pada

suhu 22°C untuk mendapatkan DNA murni. Lalu DNA disimpan pada suhu -80°C hingga DNA siap digunakan sebagai *template* PCR.

Selanjutnya DNA murni dimasukkan ke dalam program PCR unipleks dengan mencampur DNA *template* dan *ReadyMix* dengan primer ETEC dan EAEC sebagai produk PCR. Setelah itu dilakukan tahap *annealing* dengan suhu 54°C untuk gen *elt* dan 48°C untuk gen CVD432 selama 1 menit, dilanjutkan dengan tahap ekstensi selama 1 menit. Setelah mendapatkan hasil akhir, kemudian masing-masing produk PCR diambil sebesar 2 µL untuk elektroforesis selama 35 menit dengan tegangan 100 volt. Tahap terakhir, gambaran hasil elektroforesis dibaca dengan bantuan gel agarose dibawah sinar UV.

3. HASIL

Hasil kultur sampel biji kopi feses luwak pada media EMBA, sampel (01), (02), (03), (04), (05), (09), (10), (12), (13), (14), (16), (17), (18) dicurigai adanya pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. hal ini dicurigai karena terdapat koloni bakteri berwarna hijau keemasan atau hijau kilap logam dengan titik hitam di tengah bakteri tersebut.¹⁶ Sedangkan untuk sisa sampel, tidak ditemukan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* atau bakteri berwarna hijau kilap logam yang ditengahnya berwarna hitam, namun ditemukan bakteri berwarna hitam dan ungu.



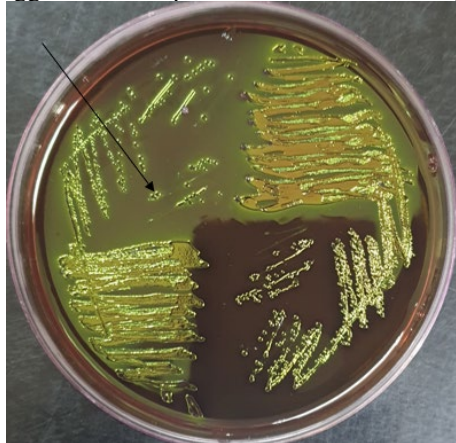
Gambar 1. Hasil Kultur Menunjukkan Koloni Bulat Hijau Kilap Logam pada Panah Berwarna Hitam

Tabel 2 Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* dari Hasil Kultur Sampel Biji Kopi Feses Luwak pada Media EMBA

Sampel	Media EMBA	Pertumbuhan Bakteri <i>Escherichia coli</i>
01	Hitam, hijau kilap logam, ungu	(+)
02	Hitam, hijau kilap logam, ungu	(+)
03	Ungu, hitam, hijau kilap logam	(+)

04	Hitam, ungu, hijau kilap logam	(+)
05	Hitam, hijau kilap logam	(+)
06	Hitam, ungu	(-)
07	Ungu, hitam	(-)
08	Hitam, ungu	(-)
09	Hijau kilap logam , hitam	(+)
10	Hijau kilap logam , hitam	(+)
11	Hitam, ungu	(-)
12	Hijau kilap logam , hitam	(+)
13	Hitam, Hijau kilap logam	(+)
14	hijau kilap logam , hitam, ungu	(+)
15	ungu	(-)
16	Ungu, hijau kilap logam	(+)
17	Ungu, hijau kilap logam	(+)
18	hijau kilap logam , hitam, ungu	(+)

Sampel yang dicurigai tumbuh bakteri *Escherichia coli* akan dilakukan subkultur dengan media yang sama yaitu EMBA. Subkultur dilakukan untuk memurnikan bakteri, sehingga tidak terdapat bakteri lain dalam sampel.

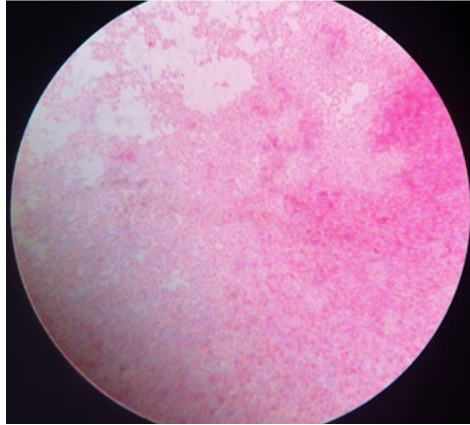


Gambar 2. Hasil Subkultur Menunjukkan Koloni Bulat Hijau Kilap Logam pada Panah Berwarna Hitam

Tabel 3 Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* dari Hasil SubKultur Sampel Biji Kopi Feses Luwak pada Media EMBA

Sampel	Media EMBA	Pertumbuhan Bakteri <i>Escherichia coli</i>
01	Hijau kilap logam, berbentuk bulat, tepi entire	(+)
02	Hijau kilap logam, berbentuk bulat, tepi entire	(+)
03	Hijau kilap logam, berbentuk bulat, tepi entire	(+)
04	Hijau kilap logam, berbentuk bulat, tepi entire	(+)
05	Hijau kilap logam, berbentuk bulat, tepi entire	(+)
09	Hijau kilap logam, berbentuk bulat, tepi entire	(+)
10	Hijau kilap logam, berbentuk bulat, tepi entire	(+)
12	Hijau kilap logam, berbentuk bulat, tepi entire	(+)
13	Hijau kilap logam, berbentuk bulat, tepi entire	(+)
14	Hijau kilap logam, berbentuk bulat, tepi entire	(+)
16	Hijau kilap logam, berbentuk bulat, tepi entire	(+)
17	Hijau kilap logam, berbentuk bulat, tepi entire	(+)
18	Hijau kilap logam, berbentuk bulat, tepi entire	(+)

Bakteri murni ini akan dilakukan pengecatan gram untuk uji konfirmasi lebih lanjut. Hasil yang ditemukan pada pengecatan gram ini, yaitu bakteri berwarna merah dengan basil tunggal dan tidak ada spora, sehingga dapat disimpulkan sebagai bakteri gram negatif.



Gambar 3. Hasil Pengecatan Gram Menunjukkan Basil berwarna merah, berbentuk tunggal, tidak ada spora

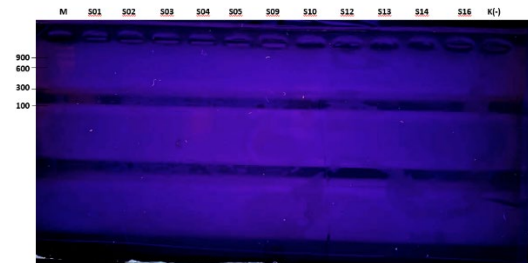
Tabel 4 Identifikasi Sampel Positif Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dari Hasil Pengecatan Gram

Sampel	Pengecatan Gram	Gram
01	Basil berwarna merah, berbentuk tunggal, tidak ada spora	(-)
02	Basil berwarna merah, berbentuk tunggal, tidak ada spora	(-)
03	Basil berwarna merah, berbentuk tunggal, tidak ada spora	(-)
04	Basil berwarna merah, berbentuk tunggal, tidak ada spora	(-)
05	Basil berwarna merah, berbentuk tunggal, tidak ada spora	(-)
09	Basil berwarna merah, berbentuk tunggal, tidak ada spora	(-)
10	Basil berwarna merah, berbentuk tunggal, tidak ada spora	(-)
12	Basil berwarna merah, berbentuk tunggal, tidak ada spora	(-)
13	Basil berwarna merah, berbentuk tunggal, tidak ada spora	(-)
14	Basil berwarna merah, berbentuk tunggal, tidak ada spora	(-)
16	Basil berwarna merah, berbentuk tunggal, tidak ada spora	(-)

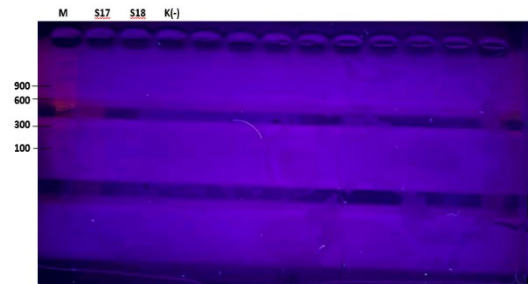
17	Basil berwarna merah, berbentuk tunggal, tidak ada spora	(-)
18	Basil berwarna merah, berbentuk tunggal, tidak ada spora	(-)

Berdasarkan hasil kultur, subkultur, dan pengecatan gram yang telah dilakukan, jumlah sampel biji kopi feses luwak yang ditemukan bakteri *Escherichia coli* sebanyak 13 dari 18 sampel yang telah memenuhi kriteria inklusi.

Hasil elektroforesis gen *elt* dapat dilihat pada Gambar 4, 5, dan tabel 5, bahwa tidak ditemukan adanya pita pada 273 bp dan juga dengan kontrol negatif sehingga disimpulkan tidak terdeteksi adanya gen *elt* pada seluruh sampel.

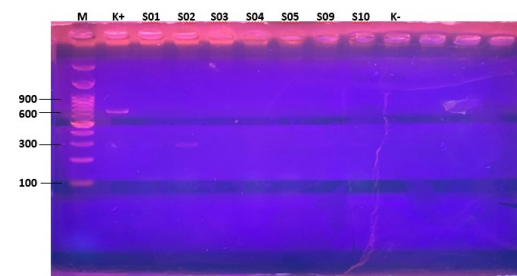


Gambar 4. Hasil elektroforesis gen *elt* (273bp)

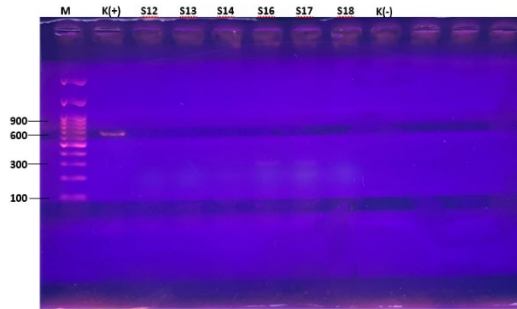


Gambar 5. Hasil elektroforesis gen *elt* (273bp)

Sedangkan pada Gambar 6, 7, dan tabel 6, ditemukan adanya pita 300 bp pada sampel (02), (16), (17), dan tidak ditemukan adanya pita pada sampel (01), (03), (04), (05), (09), (10), (12), (13), (14), (18) dan kontrol negatif. Namun pada gen CVD432 ditemukannya pita positif pada kontrol positif. Jadi dapat disimpulkan bahwa tidak terdeteksi adanya gen CVD432 pada seluruh sampel yang diteliti.



Gambar 6. Hasil elektroforesis gen CVD432 (630bp)



Gambar 7. Hasil elektroforesis gen CVD432 (630bp)

Tabel 5 Hasil Elektroforesis Gen *elt* (273bp)

Sampel	Bispare	Gen <i>elt</i>
S01	-	Negatif (-)
S02	-	Negatif (-)
S03	-	Negatif (-)
S04	-	Negatif (-)
S05	-	Negatif (-)
S09	-	Negatif (-)
S10	-	Negatif (-)
S12	-	Negatif (-)
S13	-	Negatif (-)
S14	-	Negatif (-)
S16	-	Negatif (-)
S17	-	Negatif (-)
S18	-	Negatif (-)
K(-)	-	Negatif (-)

Tabel 6 Hasil elektroforesis Gen CVD432 (630bp)

Sampel	Bispare	Gen CVD432
K(+)	630bp	Positif (+)
S01	-	Negatif (-)
S02	300bp	Negatif (-)
S03	-	Negatif (-)
S04	-	Negatif (-)
S05	-	Negatif (-)
S09	-	Negatif (-)
S10	-	Negatif (-)
S12	-	Negatif (-)
S13	-	Negatif (-)
S14	-	Negatif (-)
S16	300bp	Negatif (-)
S17	300bp	Negatif (-)
S18	-	Negatif (-)
K(-)	-	Negatif (-)

4. PEMBAHASAN

Escherichia coli merupakan salah satu bakteri flora normal yang menjadi penyebab terbanyak penyakit diare pada manusia. *Escherichia coli* terbagi atas 5 sub tipe yang sering menyebabkan diare, yaitu *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC), *Enteropathogenic Escherichia coli*

(EPEC), *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* (EHEC), *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC), *Enterotoxigenic Escherichia coli* (EAEC).¹⁷ Penelitian mengenai identifikasi bakteri patogen *Escherichia coli* pada biji kopi feses luwak dari beberapa agrowisata di Bali bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya bakteri patogen *Escherichia coli* terutama ETEC dan EAEC pada biji kopi feses luwak.

Hasil kultur dari penelitian menunjukkan bahwa terdapat bakteri *Escherichia coli* pada sampel biji kopi feses luwak sebanyak 13 dari 18 sampel yang telah diambil menggunakan media selektif *Eosin Methylen Blue* (EMBA) yaitu sampel (01), (02), (03), (04), (05), (09), (10), (12), (13), (14), (16), (17), (18). Hal ini wajar ditemukan, karena bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri yang membantu proses pencernaan pada hewan luwak menurut El Kiyat, Mentari, dan Santoso tahun 2019.⁹ Pada penelitian yang dilakukan Rahmah tahun 2016 bahwa bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri flora normal pada manusia dan hewan berdarah panas yang umumnya tidak semua berbahaya, tetapi terdapat beberapa jenis bakteri ini yang mengalami patogen akibat tumbuh melebihi batas normal sehingga dapat mengganggu sistem pencernaan.¹⁸

Identifikasi Sub tipe ETEC dan EAEC menggunakan metode PCR mendapatkan hasil yaitu tidak ditemukannya adanya pita yang sesuai atau sejajar dengan ukuran bp gen *elt* untuk ETEC dan gen CVD432 untuk EAEC. Hasil elektroforesis sampel terhadap gen *elt* menunjukkan bp yang tidak sesuai dengan target gen *elt* yaitu 273 bp. Sedangkan hasil elektroforesis sampel pada gen CVD432 mendapatkan ukuran pita 300 bp pada sebagian sampel, namun menurut Tobias dan Vutukuru tahun 2012 ukuran bp pada CVD 432 adalah 630 bp.¹⁵ Sebagian sampel yang memiliki pita 300 bp kemungkinan adalah DNA kontaminan pada saat proses pencampuran atau ekstraksi. Dapat disimpulkan bahwa identifikasi gen *elt* dan CVD432 pada sampel biji kopi feses luwak positif bakteri *Escherichia coli* yaitu sampel (01), (02), (03), (04), (05), (09), (10), (12), (13), (14), (16), (17), (18) tidak ditemukan atau negatif. Hal ini dapat disebabkan karena sampel yang positif bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri patogen atau sub tipe yang berbeda. Selain itu dapat disebabkan oleh kafein pada biji kopi dapat menyebabkan efek mutagenik yang dapat menahan atau meminimalisir pertumbuhan DNA bakteri *Escherichia coli* pada hewan luwak menurut Iswanto dkk tahun 2019.¹⁹ Pada penelitian yang dilakukan Wijayani tahun 2015 terdapat bakteri asam laktat yang ada pada feses luwak mampu memproduksi asam laktat dari hasil perombakan hydrogen peroksida, karbohidrat, dan bakteriosin sehingga dengan adanya zat anti bakteri dan asam dapat menghambat pertumbuhan patogen khususnya *Escherichia coli*.²⁰

Hasil dari wawancara yang dilakukan kepada pengelola agrowisata luwak di Bali mengatakan bahwa perawatan dan pemeliharaan hewan luwak terjaga dengan baik demi menjamin kesehatan dari luwak serta kualitas biji kopi yang akan dihasilkan dari pencernaan hewan luwak itu sendiri. Luwak yang sakit akan dibedakan kandangnya dengan luwak

yang sehat, hal ini merupakan salah satu faktor pencegah sehingga luwak yang lain terhindar dari penyakit. Berdasarkan penelitian dari kurniasih dan nurjazuli tahun 2015, tentang hubungan higiene dan sanitasi makanan dengan kontaminasi bakteri *Escherichia coli* menjelaskan bahwa sanitasi yang baik dapat mengurangi pertumbuhan dari bakteri *escherichia coli*.²¹ Dan berdasarkan penelitian Zikra tahun 2018 yang meneliti mengenai bakteri *escherichia coli* mengatakan bahwa kebersihan air merupakan salah satu faktor penting agar terhindar dari bakteri patogen *escherichia coli*. Dari seluruh pembahasan diatas menjaga kebersihan dan sanitasi agrowisata dengan baik dapat mengurangi kontaminasi dari bakteri *escherichia coli*. Serta perlu dilakukan edukasi kepada petani luwak agar selalu menjaga kebersihan dalam mengolah biji kopi feses luwak agar dapat meminimalisir terkontaminasi bakteri *Escherichia coli*.²²

5. SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa ditemukannya bakteri *Escherichia coli* pada 13 dari 18 sampel yang diteliti, hal ini disebabkan karena terdapat bakteri flora normal pada pencernaan hewan luwak. Pada identifikasi sub tipe bakteri *Escherichia coli* tidak ditemukannya adanya kontaminasi bakteri *Enterotoxigenic Escherichia coli* (EPEC) dan *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC) pada ke 13 sampel biji kopi feses luwak dari beberapa agrowisata di Bali. Hal ini dibuktikan dengan identifikasi molekuler *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang menunjukkan hasil negatif adanya bakteri EPEC atau gen *elt*. Pada sub tipe EAEC atau gen CVD432 juga memberikan hasil negatif pada 13 sampel biji kopi feses luwak yang diteliti. Hal tersebut dapat terjadi dikarenakan sampel positif merupakan sub tipe bakteri *Escherichia coli* yang berbeda dari gen yang diteliti atau gen bakteri lain yang tidak diteliti, serta bisa disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* yang ada pada sample merupakan bakteri flora normal yang tidak berpatogen.

Kelemahan penelitian ini adalah jumlah sampel yang diteliti kurang banyak karena keterbatasan peneliti sehingga bisa saja kurang mewakili populasi. Serta pada identifikasi gen *elt* sub tipe EPEC tidak menggunakan kontrol positif dikarenakan keterbatasan bahan penelitian sehingga hasil identifikasi PCR menjadi kurang lengkap.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. *Diarrhoea* [Internet]. 2016. [cited 20 March 2019] Available At: www.who.int/topics/diarrhoea/en/http://www.who.int/en/newsroom/factsheets/detail/obesity-and-overweight.
2. Amin LZ. Tatalaksana diare akut. *Cermin Dunia Kedokteran*. 2015 Jul 1;42(7):504-8.
3. Arsurya Y, Rini EA, Abdiana A. Hubungan Tingkat Pengetahuan Ibu tentang Penanganan Diare dengan Kejadian Diare pada Balita di Kelurahan Korong Gadang

- Kecamatan Kuranji Kota Padang. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 2017 Oct 12;6(2):452-6.
4. Latifah H. *Hubungan Faktor Lingkungan dan Sosiodemografi Dengan Kejadian Diare Pada Anak Balita (1-4 Tahun) Di Wilayah Kerja Puskesmas Pauh Kamar Kabupaten Padang Pariaman Tahun 2018* (Doctoral dissertation, Universitas Andalas).
5. Dinas Kesehatan Provinsi Bali. *Profil Dinas Kesehatan Provinsi Bali tahun 2017*.
6. Tawali AB, Laga A. Luwak coffee in vitro fermentation: literature review. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 2019 Feb 1 (Vol. 230, No. 1, p. 012096). IOP Publishing.
7. Fauzi M, Choiron M, Astutik YDP. KARAKTERISTIK KIMIA KOPI LUWAK ROBUSTA ARTIFISIAL TERFERMENTASI OLEH RAGI LUWAK DAN AMILASE. *J Penelit Pascapanen Pertan* [Internet]. 2018 Mar 5;14(3):144–53.
8. Rahmawati NH, Rakhmawati A, Yulianti E. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik dari Feses Hewan Luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*). *Biologi-S1*. 2016;5(4):62-9.
9. El Kiyat W, Mentari D, Santoso N. Potensi mikrobial selulase, xilanase, dan protease dalam fermentasi kopi luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*) secara in vitro. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 2019 ;22(2):58-66.
10. Yusianto. Kopi luwak dan pengujian keasliannya. *Pus Penelit kopi dan Kakao Indones*. 2014;1–44.
11. Melliawati R. *Escherichia coli* dalam kehidupan manusia. *BioTrends*. 2015 Oct 7;4(1):10-4.
12. Crofts AA, Giovanetti SM, Rubin EJ, Poly FM, Gutiérrez RL, Talaat KR, Porter CK, Riddle MS, DeNearing B, Brubaker J, Maciel M. Enterotoxigenic *E. coli* virulence gene regulation in human infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018 Sep 18;115(38):E8968-76.
13. Jafari A, Aslani MM, Bouzari S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iranian journal of microbiology*. 2012 Sep;4(3):102.
14. Gitaswari DI, Budayanti S. Identifikasi Sub tipe Enterotoxigenic *Escherichia coli* dan Enteroaggregative *Escherichia coli* dari Spesimen Usap Dubur Penjamah Makanan di Denpasar Menggunakan *Polymerase Chain Reaction*. *E-Jurnal Medika Udayana*. 2019;8(1):7-11.
15. Tobias J, Vutukuru SR. Simple and rapid multiplex PCR for identification of the main human diarrheagenic *Escherichia coli*. *Microbiological research*. 2012 Oct 12;167(9):564-70.
16. Sabudi IM, Hendrayana MA. identifikasi bakteri *Escherichia coli* serotipe o157 dengan media sorbitol mac conkey agar (smac) pada buah semangka potong dari pedagang buah kaki lima di kota denpasar Volume 6 no. 7. *Jurnal Medika*. 2017.
17. Gomes TA, Elias WP, Scaletsky IC, Guth BE, Rodrigues JF, Piazza RM, Ferreira L, Martinez MB. Diarrheagenic

- escherichia coli. brazilian journal of microbiology. 2016;47:3-0
18. Rahmah WN. Daya Hambat Kayu Manis (Cinnamomum Burmanni) terhadap Pertumbuhan Bakteri Kultur Darah Widal Positif Anggota Familia Enterobacteriaceae. Skripsi. 2016 Nov 28.
 19. ISWANTO T, SHOVITRI M, ALTWAY A, WIDJAJA T, KUSUMAWATI DI, LISDIYANTI P. Isolation and identification of caffeine-degrading bacteria from soil, coffee pulp waste and excreted coffee bean in Luwak feces. Biodiversitas Journal of Biological Diversity. 2019 May 13;20(6).
 20. Wijayani RA. Karakteristik Kimia Kopi Biji Robusta Hasil Fermentasi Menggunakan Mikroflora Asal Feses Luwak. 2015 Dec 1
 21. Kurniasih RP, Nurjazuli N. Hubungan Higiene dan Sanitasi Makanan dengan Kontaminasi Bakteri Escherichia Coli dalam Makanan di Warung Makan Sekitar Terminal Borobudur, Magelang. Jurnal Kesehatan Masyarakat (Undip). 2015 Mar 2;3(1):549-58.
 22. Zikra W, Amir A, Putra AE. Identifikasi bakteri escherichia coli (e. coli) pada air minum di rumah makan dan cafe di Kelurahan Jati serta Jati Baru Kota Padang. Jurnal Kesehatan Andalas. 2018 Jun 10;7(2):212-6.