

Identifikasi *Escherichia coli* O157:H7 serta Deteksi Gen *Shiga Like Toxin 1* dan *2* Asal Feses Hewan, Daging, dan Feses Manusia

(IDENTIFICATION OF *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 AND DETECTION OF SHIGA LIKE TOXIN 1 AND 2 GENES FROM ANIMAL FECES BEEF, AND HUMAN FECES)

I Wayan Suardana¹⁾, Wayan Tunas Artama²⁾,
Widya Asmara³⁾, Budi Setiadi Daryono⁴⁾

¹⁾Mahasiswa S3 Program Studi Bioteknologi Universitas Gadjah Mada;
Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana,
Jl. PB.Sudirman Denpasar, Bali Tlp.(0361) 223791, 701808

E-mail : iwayansuardana22@yahoo.com

²⁾Bagian Biokimia, ³⁾Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan

⁴⁾Bagian Genetika, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada

Jl. Teknik Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta 55281. E-mail: bs_daryono@yahoo.com

ABSTRACT

Escherichia coli O157:H7 with the ability to produce shiga-like toxin was isolated from beef, cattle, chicken, and human feces. Due to its importance to human health, it is necessary to identify the genes encoding the production of shiga-like toxin, *stx1* and *stx2* respectively to further understand the pathogenesis. Isolation of *E. coli* was done on Eosin Methylene Blue Agar (EMBA), followed by identification on Sorbitol MacConkey Agar (SMAC), latex agglutination test, and H7 antiserum test, respectively. The existence of genes *stx1* and *stx2* in *E. coli* O157:H7 was confirmed molecularly using PCR method with specific primers LP 30/31 and LP 43/44, Stx2 (F)/Stx2 (R) respectively. *Escherichia coli* O157:H7 was isolated from 22 out of 344 samples (6,4%). Some isolates showed gene *stx1* and *stx2* was detected in two isolates as indicated by a 384 bp band (*stx1* gene), 584 bp and 1588 bp bands (*stx2* gene) respectively. The results indicated that local isolates *E. coli* O157:H7 are potential as a zoonoses agent.

Keywords: Zoonoses, *E.coli* O157:H7, *stx1*, *stx2*

ABSTRAK

Ditemukannya *Shiga-like toxin* dari *Escherichia coli* O157:H7 pada feses sapi, feses ayam, daging sapi, dan feses manusia, mengindikasikan keberadaan bakteri tersebut sebagai agen zoonosis yang sangat membahayakan dan mengancam kehidupan. Berdasarkan latar belakang tersebut maka dilakukan penelitian ini dengan tujuan dapat terdeteksinya *E. coli* O157:H7 pada ke-4 sumber di atas, serta teridentifikasinya gen penyandi *Shiga-like toxin* (*Stx*) baik *Stx1* maupun *Stx2*. Penelitian diawali dengan tahapan isolasi *E. coli* pada media *Eosin Methylene Blue* (EMB) agar, yang dilanjutkan dengan tahapan identifikasi berupa penumbuhan pada media *Sorbitol MacConkey* (SMAC) agar, uji Aglutinasi lateks, uji antiserum H7, dan diakhiri dengan konfirmasi molekuler berupa uji *polymerase chain reaction* (PCR) terhadap gen *stx1* dengan primer spesifik LP30/31 dan *stx2* dengan primer spesifik LP43/44 dan primer *whole* *Stx2* (F) dan *Stx2* (R). Hasil penelitian menunjukkan sebanyak 22 isolat (6,4%) dari 344 sampel teridentifikasi sebagai *E. coli* O157:H7 dan uji lanjutan dengan PCR memperlihatkan hasil sebanyak 2 isolat positif terhadap gen *stx1* dengan panjang produk 384 bp, dan positif terhadap gen *stx2* dengan terlihatnya hasil amplifikasi 584 bp dan 1588 bp. Penelitian ini sekaligus membuktikan bahwa *E. coli* O157:H7 isolat lokal berpotensi besar sebagai agen zoonosis.

Kata-kata kunci : zoonosis, *E.coli* O157:H7, *stx1*, *stx2*

PENDAHULUAN

Sebagian besar efek merugikan dari kejadian infeksi *Escherichia coli* O157:H7 diawali dengan dihasilkannya salah satu atau kedua jenis toksin yaitu *Shiga Like Toxin-1* (Stx-1) maupun *Shiga Like Toxin-2* (Stx-2) (Barlow *et al.*, 2006; Centers for Disease Control and Prevention, 2000). Ditemukannya *E. coli* O157:H7 pada feses dan daging domba di Yogyakarta berturut-turut sebesar 13,2% dan 2,6% (Sumiarto, 2004) dan pada feces sapi sebesar 7,61%, daging sapi sebesar 5,62% dan feces manusia sebesar 1,3% (Suardana *et al.*, 2005), menguatkan hipotesis bahwa serotipe lokal dari bakteri tersebut berpotensi besar sebagai agen zoonosis yang harus diwaspadai sehingga perlu dikaji secara lebih mendalam terutama dalam deteksi faktor virulensi dari patogen tersebut.

Hill dan Jinneman (2000) memaparkan bahwa, untuk tujuan kajian epidemiologi suatu agen zoonosis sebaiknya digunakan aplikasi teknik genetik karena data yang dihasilkan memiliki keakuratan yang sangat tinggi. Bhaduri *et al.*, (2001 dalam Moon *et al.*, 2004) mengungkapkan bahwa dalam beberapa dekade terakhir ini, berbagai teknik diagnostik secara molekuler telah digunakan untuk memantau *foodborne pathogen* untuk tujuan perlindungan pada masyarakat. Metode deteksi yang didasarkan atas *polymerase chain reactin* (PCR) merupakan suatu alat yang sangat membantu karena spesifisitasnya tinggi serta kesederhanaannya. Gen target untuk deteksi spesifik dengan teknik PCR biasanya terkait dengan faktor virulensi dari patogen seperti: gen *E.coli* O157:H7 untuk biosintesis antigen O (gen *rfb*), gen terkait dengan glukoronidase (gen *uidA*), gen terkait dengan verotoksin (gen *Shiga-like toxins*, *stx1* dan *stx2*) dan gen yang terkait dengan protein yang berperan dalam perlekatan (gen *eaeA*).

Berdasarkan atas pertimbangan masih minimnya kajian deteksi gen penyandi *Shiga-like toxins* yang dihasilkan oleh *E.coli* O157:H7 isolat lokal, baik terhadap toksin Stx-1 maupun Stx-2, maka dilakukan penelitian dengan tujuan mengidentifikasi *E. coli* O157:H7 sekaligus mendeteksi gen penyandi toksin (*stx-1* dan *stx-2*) dari isolat lokal hasil isolasi feses sapi, feses ayam, daging sapi, dan feses manusia (klinis dan non-klinis).

METODE PENELITIAN

Tahap Isolasi dan Identifikasi *E.coli* O157:H7

Pengambilan Sampel

Sampel feses sapi (dari Desa Carangsari dan RPH Pesanggaran), sampel feses ayam (dari RPA Mekar Sari Jaya), sampel daging sapi (Pasar Sanglah, Pasar Kreneng, Pasar Badung dan Pasar Kumbasari), sampel feses manusia non-klinis (anak-anak TK umur 5 tahun di Desa Pelaga), dan sampel feses manusia klinis (dari penderita gagal ginjal di unit hemodialisis RSUP Sanglah), ditempatkan pada pot sampel dan dibawa dengan termos isi es untuk dilakukan analisis laboratorik awal di laboratorium Biosain dan Bioteknologi Universitas Udayana.

Besaran sampel diperoleh dengan memperhatikan prevalensi penyakit berdasarkan rumus besaran sampel menurut Martin *et al.*, (1987). Berdasarkan estimasi prevalensi kejadian penyakit sebesar 5% dan derajat *error* 5%, maka jumlah minimal sampel yang diperlukan untuk tingkat kepercayaan 95% adalah sebanyak 76 sampel.

Isolasi dan Identifikasi

Sampel feces dan daging diencerkan dengan *Buffered Peptone Water 0,1%*. Selanjutnya, sebanyak 100 µl sampel yang telah diencerkan disebar pada permukaan media EMBA steril dengan menggunakan gelas bengkok, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, dan dihitung jumlah koloni yang tumbuh (koloni yang berwarna hijau metalik dengan titik hitam pada bagian tengahnya). Koloni-koloni *E. coli* tersebut kemudian diisolasi dan ditumbuhkan pada media nutrisi agar miring untuk keperluan analisis selanjutnya.

Identifikasi Serotipe *E. coli* O157

Identifikasi serotipe *E. coli* O157 mengacu pada prosedur Bridson (1998) yaitu hasil positif pada media EMBA yang ditanam pada media nutrisi agar miring, selanjutnya ditanam pada media selektif sorbitol MacConkey agar (SMAC) (Oxoid CM 0813). Dalam penelitian ini digunakan kontrol positif *E.coli* O157:H7 ATCC 43894. Setelah diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam, koloni *E. coli* yang diidentifikasi sebagai *E.coli* O157, menunjukkan ciri-ciri koloni jernih, tidak berwarna, atau bersifat sorbitol negatif.

Uji Aglutinasi dengan *E.coli* O157 Latex Agglutination Test

Koloni yang menunjukkan hasil positif pada media SMAC dan isolat kontrol dikonfirmasi dengan *E. Coli* O157 latex agglutination test (Oxoid DR620 M), dengan cara menginokulasi 2-3 ose biakan pada 1 ml NaCl fisiologis, dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 jam, dan mereaksikannya dengan pereaksi lateks (1 tetes isolat ditambah 1 tetes pereaksi lateks). Hasil positif ditandai dengan terbentuknya presipitasi, sesuai dengan kontrol positif yang tersedia (Bridson, 1998).

Uji Serologis dengan *E.coli* H Antiserum H7

Pengujian untuk membuktikan antigen flagella H7 dari *E.coli* O157 dilakukan dengan cara uji aglutinasi dengan antiserum H7 (Difco, 2003). Pengujian diawali dengan penumbuhan isolat pada media motility (media SIM) sebanyak 2 kali pasase yang diinkubasikan pada 37°C selama 24 jam. Isolat yang positif pada uji motilitas dibiakkan pada media *Brain Heart Infusion broth* / BHI cair, selanjutnya diinkubasi suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diinaktifkan dengan formalin 0,3%. Langkah selanjutnya adalah mempersiapkan larutan Difco *E.coli* H7 antiserum H7 yang telah diencerkan dengan perbandingan 1:500. Reaksi serologis dilakukan dengan mengambil 50 µl biakan bakteri yang telah diinaktivasi, ditambah dengan 50 µl antiserum H7, lalu dicampur secara merata sebelum diinkubasikan pada suhu 50°C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan oleh terjadinya aglutinasi lebih dari 25% dari volume isolat yang direaksikan, dan terlihat adanya kekeruhan pada bagian supernatannya.

Tahap Deteksi Molekuler Gen *Shiga Like Toxin*

Isolasi DNA Genomik Bakteri

Tahap isolasi DNA genomik bakteri mengacu pada prosedur suplaiyer (Kit Qiagen, 2007). Isolat *E. coli* O157:H7 hasil isolasi dan identifikasi dipanen dengan cara sentrifugasi (7500 rpm selama 5 menit), supernatannya dibuang, pelet sel ditambahkan 180 µl buffer ATL dan 20 µl larutan proteinase K, divortex selama 5 detik, ditambahkan 200 µl buffer AL divortex selama 15 detik, diinkubasikan pada *waterbath* suhu 56°C selama 10 menit, ditambahkan 200 µl etanol absolut 96-100%, divortex selama 15 detik. *Lysate E. coli*

selanjutnya digunakan untuk *binding* DNA. Disiapkan *tube* 2 ml yang telah mengandung *tube* penyaring (*QIAamp Mini spin column*), *lysate* dimasukkan ke dalam penyaring, disentrifius 6000 g (8000 rpm) selama 1 menit, sisa cairan di buang, dan filter yang telah mengandung DNA dimasukkan ke dalam *tube* 2 ml yang baru, kemudian dilanjutkan *washing* DNA. Filtrat DNA ditambah 500 µl *wash buffer* (buffer AW1) dan didiamkan selama 5 menit, disentrifius 8000 rpm selama 1 menit, sisa cairan tertampung dibuang dan diganti dengan *tube* 2 ml yang baru. *Wash buffer* (buffer AW2) sebanyak 500 µl ditambahkan dan didiamkan selama 5 menit, disentrifius dengan kecepatan penuh (14.000 rpm selama 3 menit), sisa cairan yang tertampung dibuang dan dilanjutkan untuk *eluting* DNA. *QIAamp Mini spin column* yang mengandung DNA dimasukkan ke dalam *ependorf* steril baru, ditambahkan 50 µl *elution buffer* (buffer AE), didiamkan pada suhu kamar selama 5 menit, dan disentrifius dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit (*tube* telah mengandung larutan DNA murni). Untuk menghindari pengulangan *freezing* dan *thawing*, DNA murni disimpan pada 4°C untuk penggunaan langsung atau disimpan dalam *freezer* -20°C untuk penyimpanan dalam waktu lama.

Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

DNA sampel diencerkan 50 kali (2 µl DNA dicampur dengan 98 µl air murni) dan *optical density* (OD) diukur pada panjang gelombang 260 dan 280 nm dengan menggunakan Spektrofotometer (Backman DU-65). Konsentrasi DNA dihitung dengan menggunakan rumus seperti yang dilaporkan oleh Sambrook dan Russel (2001).

Deteksi Gen *Shiga Like Toxin* (*stx*) dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Deteksi keberadaan gen *shiga like toxin* dilakukan menggunakan primer LP 30 (F) : (5'-CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG-3') dan LP 31 (R) : (5'-CACCAGACAATGTAACCGCTG-3') untuk deteksi gen *stx1* (produk PCR 348 bp), dan LP 43 (F) : (5'-ATCCTATTCCCGGGA-GTTACG-3') dan LP 44(R) : (5'-GCGTCATCG-TATACACAGGAGC-3') untuk deteksi gen *stx2* (produk PCR 584 bp) seperti yang dilaporkan oleh Moon *et al.*, (2004). Di samping itu, diidentifikasi lebih lanjut *whole gen* dari *stx2* dengan menggunakan primer yang dirancang

peneliti yaitu *Stx2* (F) : (5'-GCC ATT AGC TCA TCG GGA TA-3) dan *Stx2* (R) : (5'-CGA ATG CTC AGT CTG ACA GG-3') dengan panjang produk PCR 1588 bp.

Reaksi PCR untuk deteksi gen *stx1* dan *stx2* dilakukan pada total volume 41 µl yang mengandung 1,5 µl DNA *template*, 36,5 µl PCR SuprRmix 2x dan 1,5 µl masing-masing primer. Amplifikasi dilakukan pada mesin *Thermalcycler Model TC25/H* dengan kondisi predenaturasi pada suhu 94°C selama 7 menit, diikuti 35 siklus dengan kondisi reaksi denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* pada 50°C selama 35 detik, dan polimerisasi pada suhu 72°C selama 2 menit. Pada bagian akhir ditambahkan dengan polimerisasi pada suhu 72°C selama 5 menit. Untuk deteksi *whole* gen *stx2*, reaksi PCR dilakukan pada total volume 27 µl yang mengandung 1,5 µl DNA *template*, 17 µl FastStart PCR Master, 1 µl masing-masing primer, dan 6,5 µl *water PCR-grade*. Amplifikasi dilakukan pada mesin *MJ Mini Personal Thermalcycler BIORAD model PTC-1148* dengan kondisi predenaturasi pada suhu 94°C selama 7 menit, diikuti 35 siklus dengan kondisi reaksi denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* pada 60°C selama 35 detik, dan polimerisasi pada suhu 72°C selama 1,5 menit. Pada bagian akhir ditambahkan dengan polimerisasi pada suhu 72°C selama 5 menit. Setelah reaksi selesai, sebanyak 4 µl produk PCR dicampur dengan 2 µl *loading dye (blue/orange loading dye)* dan dielektroforesis pada gel agarose 2% yang telah diisi GoldView™ Nucleic Acid Stain 5 ml/ 30 ml agar, bersama dengan Marker 100 bp DNA Ladder. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 v

selama 35 menit. Visualisasi *band* yang muncul dilakukan dengan UV transilluminator dan difoto dengan kamera digital FE-270 7,1 Megapixel.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis secara deskriptif untuk selanjutnya disajikan dalam bentuk tabel / gambar (Steel dan Torrie, 1995).

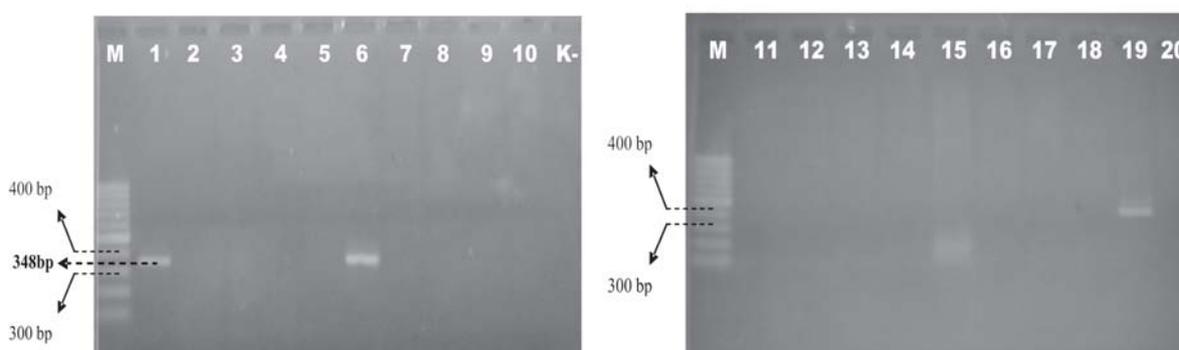
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi dan Identifikasi *E. coli* O157

Hasil pengujian terhadap keseluruhan sampel (344 sampel), dengan rincian 80 sampel feses sapi, 78 sampel daging sapi, 80 sampel feses ayam, 30 sampel feses manusia non-klinis, serta 76 sampel feses manusia klinis (penderita gagal ginjal), menunjukkan bahwa 22 isolat (6,4%) secara serologis teridentifikasi sebagai *E. coli* O157:H7 dengan rincian 4 isolat (5%) dari sampel feses sapi, 2 isolat (2,6%) dari sampel daging sapi, 2 isolat (2,5%) dari sampel feses ayam, 2 isolat (6,7%) dari sampel feses manusia non-klinis, serta 12 isolat (15,8%) dari isolat sampel manusia klinis. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *E. coli* patogen yakni *E. coli* O157:H7 lokal telah terdistribusi secara luas baik pada hewan maupun manusia.

Evaluasi Molekuler Gen *stx-1* dan *stx-2* dari *E. coli* O157

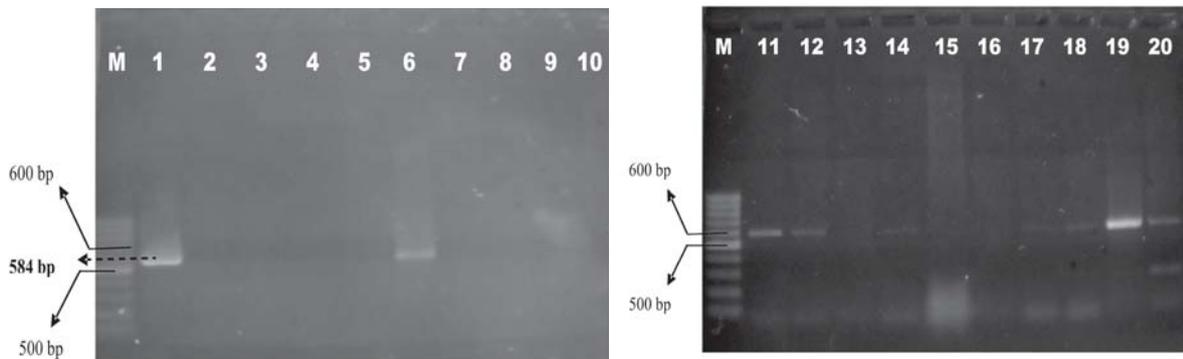
Hasil identifikasi molekuler 20 dari 22 isolat *E. coli* O157 terhadap gen *stx1* dan *stx2* dengan teknik PCR ditunjukkan pada Gambar 1, 2 dan 3.



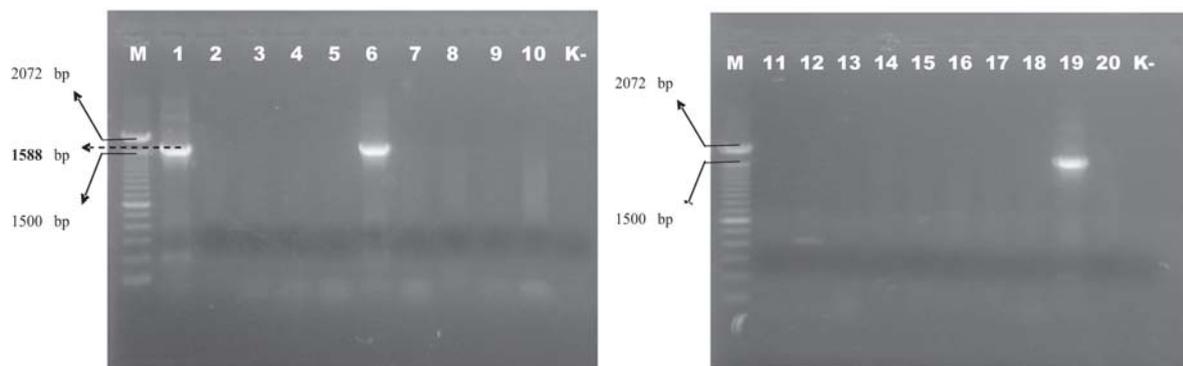
Gambar 1. Deteksi gen *stx1* dengan primer LP30/31 pada Agarose 2%. Baris 1 kontrol positif : ATCC 43894; baris 2-12 Feses manusia klinis yaitu; baris 2: KL52(7); baris 3: KL87(7); baris 4: KL30(4); baris 5: KL45(1); baris 6: KL48(2); baris 7: KL85(1); baris 8: KL83(5); baris 9: KL24(5); baris 10: KL68(1); baris 11: KL106(3); dan baris 12: KL55(6); baris 13-14 Feses ayam yaitu; baris 13: MK35; baris 14: MK19(8)/4; baris 15-16 Feses manusia non-klinis yaitu; baris 15: M14(4) / dan baris 16: M17(1); baris 17-18 Daging sapi yaitu; baris 17: DS21(4) dan baris 18: DS16(2); baris 19-20 Feses sapi yaitu; baris 19: SM25(1) dan baris 20: SM7(1). M: Marker 100 bp DNA Ladder (Microzone Ltd).K: Kontrol negatif.

Pada Gambar 1 terlihat bahwa, isolat KL 48(2) asal manusia klinis serta isolat SM 25(1) asal feses sapi terdeteksi mengandung gen *stx1* seperti kontrol ATCC 43894 (*well* nomor 1) yang dicirikan dengan terbentuknya pita pada posisi 348 bp. Adanya isolat *E. coli* O157 yang tidak lengkap memiliki gen *stx* (*stx1* dan *stx2*), pernah dilaporkan oleh Avery *et al.*, (2002) yang menemukan bahwa, dari 24 isolat yang diuji, 19 isolat positif mengandung gen *stx2*, 2 isolat positif mengandung gen *stx1* dan *stx2*, serta 3 isolat bersifat negatif mengandung gen *stx1* dan *stx2*. Foley *et al.*, (2004) juga

melaporkan bahwa tidak semua isolat *E. coli* O157:H7 dapat menghasilkan kedua jenis *verocytotoxin* tersebut. Ada kalanya 1 isolat menghasilkan kedua-duanya (*Stx1* dan *Stx2*), namun ada beberapa strain yang hanya menghasilkan 1 jenis toksin saja, *Stx1* atau *Stx2*. Bertitik tolak dari hasil penelitian ini, maka penelitian selanjutnya diarahkan pada dianalisisnya gen *stx* lainnya sebagai karakteristik penciri *E. coli* O157:H7 yaitu gen *stx2*. Hasil amplifikasi DNA target dengan teknik PCR untuk gen *stx2* disajikan pada Gambar 2 dan 3.



Gambar 2. Deteksi gen *stx2* dengan primer LP43/44 pada Agarose 2%. Baris 1 kontrol positif : ATCC 43894; baris 2-12 Feses manusia klinis yaitu; baris 2: KL52(7); baris 3: KL87(7); baris 4: KL30(4); baris 5: KL45(1); baris 6: KL(48(2)); baris 7: KL85(1); baris 8: KL83(5); baris 9: KL24(5); baris 10: KL68(1); baris 11: KL106(3); dan baris 12: KL55(6); baris 13-14 Feses ayam yaitu; baris 13: MK35; baris 14: MK19(8)/4; baris 15-16 Feses manusia non-klinis yaitu; baris 15: M14(4) dan baris 16: M17(1); baris 17-18 Daging sapi yaitu; baris 17: DS21(4) dan baris 18: DS16(2); baris 19-20 Feses sapi yaitu; baris 19: SM25(1) dan baris 20: SM7(1). M: Marker 100 bp DNA Ladder (Microzone Ltd).



Gambar 3. Deteksi whole gen *stx2* dengan primer *Stx2(F)* dan *Stx2(R)* pada Agarose 1%. Baris 1 kontrol positif : ATCC 43894; baris 2-12 Feses manusia klinis yaitu; baris 2: KL52(7); baris 3: KL87(7); baris 4: KL30(4); baris 5: KL45(1); baris 6: KL(48(2)); baris 7: KL85(1); baris 8: KL83(5); baris 9: KL24(5); baris 10: KL68(1); baris 11: KL106(3); dan baris 12: KL55(6); baris 13-14 Feses ayam yaitu; baris 13: MK35; baris 14: MK19(8)/4; baris 15-16 Feses manusia non-klinis yaitu; baris 15: M14(4) dan baris 16: M17(1); baris 17-18 Daging sapi yaitu; baris 17: DS21(4) dan baris 18: DS16(2); baris 19-20 Feses sapi yaitu; baris 19: SM25(1) dan baris 20: SM7(1). M: Marker 100 bp DNA Ladder (Invitrogen Cat.15628-019).K-: Kontrol negatif

Pada Gambar 2 ditunjukkan bahwa hanya isolat asal feses manusia klinis yaitu KL 48(2) asal, isolat KL106(3), dan isolat KL55(6), isolat asal feses ayam yaitu MK19(8)/4, isolat asal daging sapi yaitu isolate DS21(4) dan DS16(2) serta isolat asal feses sapi yaitu isolat SM 25(1) dan SM7(1) teridentifikasi mengandung gen *stx2* seperti halnya isolat kontrol ATCC 43894 pada *well* nomor 1 dengan panjang produk 584 bp. Beberapa isolat yang teridentifikasi memperlihatkan 2 ataupun 1 pita yang tidak sejelas pada kontrol. Hadirnya pita-pita tambahan / pita yang *smear* pada deteksi ini dapat diakibatkan dari kurang optimumnya waktu optimasi dari mesin PCR pada saat amplifikasi (khususnya suhu *annealing* yang rendah), jumlah siklus yang terlalu banyak, ataupun dapat diakibatkan karena kurang spesifiknya desain primer yang digunakan (Roche, 2006). Konfirmasi lebih lanjut gen *stx2* dengan primer *whole gen* seperti tersaji pada Gambar 3.

Gambar 3 ditunjukkan bahwa hanya isolat pada *well* nomor 6 yaitu KL 48(2) asal manusia klinis dan isolat pada *well* nomor 19 yaitu SM 25(1) asal feses sapi yang secara jelas dan konsisten teridentifikasi mengandung *whole gen stx2* seperti halnya kontrol ATCC 43894 pada *well* nomor 1 dengan panjang produk 1588 bp. Hasil pada Gambar 3 sekaligus menunjukkan bahwa waktu optimasi untuk amplifikasi DNA target sudah cukup serta desain primer yang dirancang peneliti juga sudah optimal. Terdeteksinya gen *stx2* pada isolat asal feses manusia klinis (penderita gagal ginjal) dan isolat asal feses sapi, menguatkan dugaan bahwa isolat lokal *E.coli* O157:H7 tersebut berasal dari sumber yang sama serta memiliki ciri genetik yang hampir sama dengan *E.coli* O157:H7 ATCC 43894, sehingga memungkinkan untuk dikelompokkan kedalam satu klaster dalam analisis *phylogenetic*. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa *E.coli* O157:H7 isolat lokal berpotensi besar sebagai agen zoonosis seperti yang diungkapkan oleh Krauss *et al.*, (2003). Untuk lebih memastikan perbedaan atau persamaan gen *stx2* dari masing-masing isolat, dipandang perlu untuk dilakukan konfirmasi berdasarkan hasil sekuensing dari nukleotida penyusunnya seperti yang diungkapkan oleh Foley *et al.*, (2004), yang melaporkan bahwa DNA sekuensing merupakan suatu metode yang lebih menjanjikan, mudah dikerjakan dan merupakan instrumen pembeda yang sangat akurat.

Bertitik tolak dari hasil penelitian yang dikaitkan dengan landasan teori yang ada, maka ke-2 isolat, berpeluang besar bersifat sangat patogen (dengan gejala klinis utama berupa diare berdarah ataupun *hemolytic uremic syndrome* / HUS) karena mampu memproduksi 2 jenis toksin sekaligus seperti yang diungkapkan oleh Fraser *et al.*, (2004). Peneliti ini melaporkan bahwa *E.coli* O157:H7 dari penderita hanya menghasilkan toksin Stx1, maka si penderita akan cenderung menderita diare berdarah, sedangkan jika *E.coli* O157:H7 dari penderita hanya menghasilkan toksin Stx2, maka si penderita akan lebih berpeluang untuk menderita HUS (*hemolytic uremic syndrome*).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil isolasi dan identifikasi serta deteksi gen *Shiga-like toxin (stx)* baik *stx1* maupun *stx2*, dapat disimpulkan sebagai berikut : sebanyak 22 dari 344 isolat (6,4%) secara serologis teridentifikasi sebagai *E.coli* O157:H7, sebanyak 2 dari 22 isolat *E. coli* O157:H7 (9,1%), terdeteksi memiliki gen *stx1* dan *Stx2*. *E. coli* O157 : H7 isolat lokal berpotensi sebagai agen zoonosis.

SARAN

Guna memastikan hasil pengujian, maka perlu dilakukan konfirmasi dengan sekuensing DNA, untuk lebih memastikan ketepatan gen penyandi *stx1* maupun gen *stx2* yang telah teridentifikasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada pihak LPPM Univeritas Gajah Mada yang telah mendanai proyek penelitian ini melalui dana Penelitian Hibah Doktor Tahun Anggaran 2009 dengan Kontrak No. LPPM-UGM/1104/2009 tanggal 19 Mei 2009, dan pihak Dikti melalui dana Penelitian Hibah Bersaing Tahun Anggaran 2009 dengan Kontrak No. 1491B.3/H14/HM/2009 tanggal 16 April 2009 serta dana BPPS untuk mahasiswa program Doktor.

DAFTAR PUSTAKA

- Avery SM, Small A, Reid CA, Buncic S. 2002. Pulsid Field Gel Electroforesis Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 from Hides of Cattle at Slaughter. Research Note. *Journal of Food Protection*. 65 (7) : 1172-1176.
- Barlow RS, Gobius KS, Desmarchelier PM. 2006. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Ground Beef. *International Journal of Food Microbiology* 111: 1-5
- Bridson EY. 1998. *The Oxoid Manual*. 8thEd. Centers for Disease Control and Prevention. 2000. *Escherichia coli* O157:H7. http://www.cdc.gov/ncidod/dmd/disease_info/escherichiacoli.g.htm.
- Difco. 2003. BD Difco™ *E.coli* Antisera. Becton, Dickinson and Company 7 Loventon Circle Sparks. Maryland 21152 USA.
- Foley SL, Simjee S, Meng J, White DG, McDermott PF, Zhao S. 2004. Evaluation of Molecular Typing Methods for *Escherichia coli* O157:H7 Isolates from Cattle, Food and Humans. *Journal of Food Protection*. 67(4): 651-657.
- Fraser ME, Fujinaga M, Cherney MM, Melton-celsa AR, Twiddy EM, O'Brien OD, James NG. 2004. Structure of Shiga Toxin type 2 (Stx2) dari *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biological Chemistry*. 279:27511-27517.
- Hill WE, Jinneman KC. 2000. Principles and Application of Genetic Techniques for Detection, Identification, and subtyping of Food-Associated Pathogenic Microorganism in *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Vol. II (ed) Barbara ML, Baird-Parker TC, Gould GW. Maryland Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg.
- Krauss H, Weber A, Appel M, Enders B, Isenberg HD, Schiefer HG, Slenczka W, Graevenitz AV, Zahner H. 2003. *Zoonoses. Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans*. 3rd Ed. ASM Press.
- Martin SW, Meek AH, Willeberg P. 1987. *Veterinary Epidemiology. Principles and Methods*. Iowa State University Press/Ames.
- Moon G, Kim WJ, Shin WS. 2004. Optimization of Rapid Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by PCR and Application to Field Test. *Journal of Food Protection*. 67 (8) : 1634-1640.
- Qiagen. 2007. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. 2nd Ed. Sample & Assay Technologies.
- Roche. 2006. FastStart PCR Master. Roche Diagnostics GmbH. Roche Applied Science 68298 Mannheim Germany.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rdED. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Suardana IW, Swacita IBN, Ratnawati NLKA, Sumiarto B, Lukman DW. 2005. Identifikasi *Escherichia coli* O157:H7 dan *Shiga Toxin Escherichia coli* (STEC) pada Daging, Feces Hewan dan Feces Manusia di Kabupaten Badung Propinsi Bali. Laporan Penelitian Hibah Pekerti Tahap I.
- Sumiarto B. 2004. Tingkat Infeksi dan Kontaminasi Bakteri *Escherichia coli* O157:H7 pada Daging Domba di Rumah Potong Hewan Yogyakarta. *Jurnal Veteriner* 5 (3): 85-90.
- Steel RG, Torrie JH. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Jakarta. Gramedia Pustaka. Pp. 168-266.