

Sekuen Nukleotida Gene *Shiga like toxin-2* dari Isolat Lokal *Escherichia coli* O157:H7 asal Hewan dan Manusia

(NUCLEOTIDES SEQUENCES OF SHIGA-LIKE TOXIN 2 GENES OF ESCHERICHIA COLI O157:H7 LOCAL ISOLATES ORIGINATED FROM ANIMALS AND HUMAN)

I Wayan Suardana¹, Dyah Ayu Widiasih²
Komang Januartha Putra Pinatih³

¹Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Udayana, Jln. Sudirman Denpasar, Bali Tlp.(0361) 22379;
E-mail: iwayansuardana22@yahoo.com

²Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna No 2, Karangmalang, Yogyakarta 55281
E-mail: dawidiasih@yahoo.com.

³Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana,
Jl. PB. Sudirman Denpasar, Bali, Indonesia
E-mail: kjanuartha@yahoo.com

ABSTRAK

Hewan ternak khususnya sapi, dikenal sebagai reservoir utama *Escherichia coli* O157:H7. Sebagai satu-satunya serotipe *E. coli* yang bersifat zoonosis, patogenitas bakteri ini ditentukan oleh kemampuannya untuk menghasilkan satu atau lebih *cytotoxin* yang sangat potensial yang dikenal dengan nama *Shiga-like toxin* (Stx) atau *verocytotoxin*, khususnya dari jenis Stx2 yang terkait erat dengan kejadian *hemolytic uremic syndrome* (HUS) pada manusia. Studi ini bertujuan menganalisis susunan nukleotida dari gen *stx2* antara isolat asal hewan dan manusia dalam upaya mengkaji potensi zoonosis yang ditimbulkannya. Kegiatan penelitian diawali dengan kultivasi 20 isolat *E. coli* O157:H7 koleksi hasil penelitian sebelumnya dengan rincian dua isolat asal tinja sapi, dua isolat asal daging sapi, dua isolat asal tinja ayam, dua isolat asal tinja manusia non-klinis dan 12 isolat asal tinja manusia klinis (asal penderita gagal ginjal). Isolat sebanyak 20 tersebut dikonfirmasi pada media selektif *sorbitol Mac Conkey agar* (SMAC) yang dilanjutkan dengan uji *latex O157 agglutination test* serta uji antiserum H7. Analisis molekuler komplit gen *stx2* yang meliputi *open reading frame* (ORF) dari gen *stx2* dilakukan menggunakan primer rancangan peneliti yaitu Stx2(F)/Stx2(R). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada dua isolat yaitu KL-48(2) asal tinja manusia dan SM-25(1) asal tina sapi positif membawa gene *stx2* yang ditandai dengan produk PCR 1587 bp. Analisis hasil sekuensing menunjukkan kedua isolat memiliki susunan gene *stx2* yang identik dengan *E. phaga* 933 dan *E. coli* ATCC 43894. Hasil ini mengindikasikan kedua isolat lokal berpotensi sebagai agen zoonosis dengan efek klinis yang serupa dengan *E. phaga* 933 dan *E. coli* ATCC 43894.

Kata-kata kunci: *E. coli* O157:H7; gen *stx2*; *hemolytic uremic syndrome*; zoonosis

ABSTRACT

Animals/livestock, especially cattle, are known as the main reservoir of *Escherichia coli* O157: H7. As the only one of zoonotic *E. coli*, the pathogenicity of these bacteria is determined by its ability to produce one or more very potent cytotoxin known as Shiga-like toxin (Stx) or verocytotoxin, particularly of the Stx2 type that is closely related to the incidence of hemolytic uremic syndrome (HUS) in humans. This study analyzed the nucleotide sequences of *stx2* gene between isolates from animals and humans in an effort to assess the potential zoonoses of the agent. The research activity was initiated by cultivating 20 isolates of *E. coli* O157:H7 collection based on result in the previous study i.e. 2 isolates originated from cattle feces, 2 isolates originated from beef, 2 isolates originated from chicken feces, 2 isolates originated from human faeces and 12 non-clinical isolates originated from human fecal who were suffering with renal failure. All isolates were confirmed on selective medium Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) followed by testing on agglutination O157 latex test, and H7 antisera. Molecular analysis of *stx2* gene covering open reading

frame (ORF) of the *stx2* gene was performed using the primer which was designed by researcher i.e. Stx2 (F) / Stx2 (R). The results showed, there were 2 isolates i.e. KL-48 (2) originated from human feces and SM-25 (1) originated from cattle feces were positive for carrying a *stx2* gene, which was marked by the 1587 bp PCR product. Analysis of sequencing showed both isolates had identical to *stx2* nucleotide sequences with *E. phaga* 933 as well as *E. coli* ATCC 933. These results indicate the both local isolates are potential as zoonotic agents with clinical effects similar to *E. phaga* 933 and *E. coli* ATCC 43894

Key words: *E. coli* O157:H7; gene *stx2*; hemolytic uremic syndrome; zoonoses

PENDAHULUAN

Sapi dikenal sebagai reservoir utama *Escherichia coli* O157:H7 meskipun beberapa jenis ternak lainnya seperti unggas, kambing, domba, dan babi, juga diketahui berpotensi sebagai penular agen zoonosis ke manusia (Naylor *et al.*, 2005; Karmali *et al.*, 2010). Terjadinya kontaminasi silang antara daging dengan feses dalam tahapan prosesing, penanganan sampai pemasaran dalam suatu mata rantai pengadaan bahan pangan, proses pemasakan yang tidak cukup, diduga memberikan sumbangan yang cukup besar terhadap munculnya kejadian *food borne infections* oleh *E. coli* O157:H7. Penularan melalui susu ataupun air yang terkontaminasi feses juga sering dilaporkan (Radu *et al.*, 2001). Patogenitas *E. coli* O157:H7 sebagai satu-satunya serotipe yang bersifat zoonosis, ditentukan oleh kemampuannya menghasilkan satu atau lebih *cytotoxin* yang sangat potensial yang dikenal dengan nama *Shiga-like toxin* (Stx) baik Stx1 maupun Stx2. Selain itu, kemampuan dari bakteri ini melakukan penempelan dan perlekatan terutama pada sekum dan kolon pada tubuh inang (Krauss *et al.*, 2003). Toksin Stx1 dan Stx2 yang dihasilkan oleh strain *E. coli* ini, diketahui memiliki efek dalam jenis dan derajat kerusakan jaringan yang berbeda pada tubuh inang. Toksin Stx1 lebih terabsorpsi oleh sel epitel usus yang berlanjut pada terjadinya diare berdarah, sedangkan toksin Stx2 yang bersirkulasi pada aliran darah selanjutnya menuju ke ginjal dan berikatan dengan reseptor *globo series globotriaosylceramide* (Gb3) yang berdampak pada terjadinya kerusakan endotel glomerulus ginjal sehingga terjadi *hemolytic uremic syndrome* (HUS) (Bahrun Dahler, 2002; Fraser *et al.*, 2004; Cadirci *et al.*, 2010). Mengacu pada potensi zoonosis agen *E. coli* O157:H7 yang cukup tinggi, serta mempertimbangkan tingginya kejadian gagal ginjal pada manusia akibat toksin *Stx-2 E. coli* O157:H7 sebagai salah satu kausanya, maka kajian analisis nukleotida komplet gene *Stx2*

dari isolat *E. coli* O157:H7 asal hewan dan manusia menjadi penting diungkap.

METODE PENELITIAN

Kultivasi Stok Isolat

Kultivasi terhadap 20 isolat stok (tersimpan dalam gliserol 30% dengan suhu penyimpanan -20°C) yang terdiri dari satu isolat kontrol positif *E. coli* ATCC 43894 serta dua isolat asal tinja sapi, dua isolat asal daging sapi, dua isolat asal tinja ayam, dua isolat asal tinja manusia non-klinis, dan 12 isolat asal tinja manusia klinis (asal penderita gagal ginjal). Keseluruhan isolat ditumbuhkan kembali pada media selektif *Sorbitol Mac Conkey Agar* (SMAC) (Oxoid CM 0813), yang dilanjutkan dengan uji konfirmasi menggunakan uji aglutinasi lateks *E. coli* O157 (Oxoid DR 620M).

Isolasi DNA Genomik Bakteri

Tahap isolasi DNA genomik bakteri mengacu pada prosedur pabrik. Isolat *E. coli* O157:H7 yang diinokulasi pada media *Luria Bertani*/LB dipanen dengan cara sentrifugasi (Beckman Microfuge 11) 7500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, sedangkan pelet sel ditambah 180 µL *tissue lysis buffer* (*Buffer ATL*) dan 20 µL larutan proteinase K (600 mAU/mL) selanjutnya divorteks (*Thermolyne Maximi*) selama 15 detik. Larutan kemudian ditambahkan 200 µL *lysis buffer* (*Buffer AL*), divorteks selama 15 detik, diinkubasikan pada *waterbath* suhu 56°C selama 10 menit, ditambahkan 200 µL etanol absolut 96%, dan divorteks selama 15 detik. *Lysate E. coli* yang diperoleh digunakan untuk *binding* DNA. *Lysate* dimasukkan ke dalam penyaring yang terletak dalam tabung kecil 2 mL (*QIAamp Mini spin column*) dan dipusing dengan kecepatan 6000xg (8000 rpm) selama satu menit. Sisa cairan dibuang, dan filter yang telah mengandung DNA dimasukkan ke dalam tabung kecil 2 mL yang baru untuk selanjutnya dilakukan tahapan *washing* DNA. Filtrat DNA

ditambah 500 μL wash buffer (buffer AW1) dan didiamkan selama lima menit, dipusing dengan kecepatan 6000xg atau 8000 rpm selama satu menit. Sisa cairan tertampung dibuang dan diganti dengan tabung kecil 2 mL yang baru. Wash buffer (buffer AW2) sebanyak 500 μL ditambahkan dan didiamkan selama lima menit. Tabung kecil dipusing dengan kecepatan penuh 14.000 rpm selama tiga menit, sisa cairan yang tertampung dibuang dan dilanjutkan untuk eluting DNA. QIAamp Mini spin column yang mengandung DNA dimasukkan ke dalam tabung kecil (Nunc, Inc) steril baru, ditambahkan 50 μL elution buffer (buffer AE), didiamkan pada suhu kamar selama lima menit, dan dipusing dengan kecepatan 6000xg atau 8000 rpm selama satu menit untuk selanjutnya disimpan pada 4°C.

Amplifikasi Komplit Gen *stx2*

Analisis komplit gen *stx2* yang meliputi daerah *open reading frame* (ORF) gen *stx2* dengan prosedur PCR dilakukan pada total volume 27 μL yang mengandung 1,5 μL DNA templet (300 ng/ μl), 17 μL FastStart PCR Master, 6,5 μL water PCR-grade dan 1 μL masing-masing primer rancangan peneliti yaitu primer Stx2(F): 5'-GCCATTAGCTCAT CGGGATA-'³ dan primer Stx2(R): 5'-CGAATGCTCAGTCTGACAGG-'³ konsentrasi 20 pmol/ μL . Amplifikasi dilakukan pada mesin MJ Mini Personal Thermalcycler Biorad model PTC-1148 dengan kondisi pre-denaturasi pada suhu 94°C selama tujuh menit, diikuti 35 siklus dengan kondisi denaturasi 94°C selama satu 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 lima menit. Setelah reaksi selesai, sebanyak 4 μL produk PCR dicampur dengan 2 μL 5 x DNA loading dye (blue/orange loading dye) dan dielektroforesis pada gel agarose 1% yang telah diisi GoldView™ Nucleic Acid Stain 5 ml/30 ml agar, bersama dengan Marker 100 bp DNA Ladder (Invitrogen cat.no. 15628-019) dalam buffer TBE 1 X. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100V selama 35 menit. Visualisasi band yang muncul dilakukan dengan UV transilluminator dan difoto dengan kamera digital FE-270 7,1 Megapixel.

Sekuensing Hasil Amplifikasi Komplit Gen *stx2*

Analisis produk amplifikasi dilakukan dengan sekuensing produk amplifikasi komplit gen *stx2* di Eijkman Institute for Molecular Biology (Jakarta) menggunakan Big Dye Terminator dengan alat ABI PRISM 3130 dan 3130 xl Genetic Analyzer. Data hasil sekuensing dianalisis dengan program Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 4.0 (Tamura et al., 2007). Sekuen yang diperoleh setelah diedit dianalisis dengan metode Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) pada Genebank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) dengan data nukleotida dan asam amino yang tersedia di Genebank. Hubungan evolusi dan pohon filogeni ditentukan berdasarkan metode Neighbor-Joining (NJ) (Saitou dan Nei, 1987). Nilai persentase replikasi pohon dari taksa/isolat yang membentuk *clade* diolah dengan *bootstrap test* 1000 dan diperlihatkan dekat cabang, serta analisis struktur proteinnya dilakukan dengan program DDBJ GTOP.

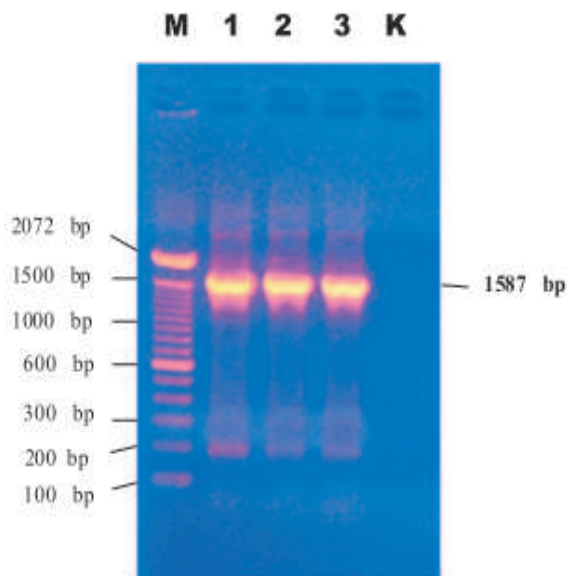
HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi Komplit Gen *Stx2*

Amplifikasi komplit gen *stx2* yang meliputi daerah *open ORF* dilakukan pada isolat asal hewan ataupun manusia yang memiliki similaritas yang tinggi. Dalam penelitian ini berhasil teramplifikasi pada isolat KL-48(2) asal manusia dan isolat SM-25(1) asal sapi, di samping juga isolat kontrol ATCC 43894 dengan hasil amplifikasi seperti Gambar 1.

ada Gambar 1 disajikan bahwa ketiga isolat yaitu KL 48(2) asal manusia sakit dan isolat SM 25(1) asal tinja sapi yang secara jelas dan konsisten teridentifikasi membawa komplit gen *stx2* seperti halnya kontrol ATCC 43894 pada jalur nomor 1 dengan panjang produk 1587 bp. Hasil pada Gambar 1 sekaligus menunjukkan bahwa waktu optimasi untuk amplifikasi DNA target sudah cukup serta desain primer yang dirancang peneliti juga sudah optimal.

Terdeteksinya komplit gen *stx2* pada isolat asal feses manusia sakit (penderita gagal ginjal) dan isolat asal feses sapi, menguatkan hipotesis bahwa isolat *E. coli* O157:H7 tersebut berasal



Gambar 1. Deteksi *open reading frame* (ORF) gene *stx2* dengan primer Stx2(F) dan Stx2(R) pada agarose 1%. Jalur 1 kontrol positif : ATCC 43894; jalur 2: KL(48(2) dan jalur 3: SM25(1), M: Marker 100 bp DNA Ladder (Invitrogen Cat. 15628-019).K-: Kontrol negatif.

dari sumber yang sama serta diduga memiliki ciri genetik yang hampir sama dengan *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 sehingga berpotensi besar sebagai agen zoonosis seperti yang diungkapkan oleh Krauss *et al.* (2003). Untuk lebih memastikan susunan nukleotida penyusunnya, perlu dilakukan konfirmasi berdasarkan hasil sekuensing. Foley *et al.* (2004) menyatakan bahwa DNA sekuensing merupakan suatu metode yang lebih menjanjikan, mudah dikerjakan dan merupakan instrumen pembeda yang sangat akurat.

Analisis Nukleotida *Open Reading Frame* (ORF) Gen *Stx2*

Analisis untuk mengetahui susunan nukleotida dari komplit gen *stx2*, produk PCR dari komplit gene *stx2* isolat KL 48(2) asal manusia sakit dan isolat SM 25(1) asal feses sapi, serta isolat kontrol ATCC 43894 selanjutnya disekuensing di *Eijkman Institute for Molecular Biology* (Jakarta) baik dari sisi *forward* menggunakan primer Stx2(F) maupun dari sisi *reverse* menggunakan primer Stx2 (R). Hasil sekuensing daerah ORF setelah *dialignment* seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. *Alignment* susunan nukleotida (berukuran 1241 nt) daerah *open reading frame* (ORF) dari gene *stx2 E.coli* ATCC 43894, KL-48(2) dan SM-25(1) dengan beberapa isolat lainnya di *genbank* dengan program *clustal W*

E.coli_O157:H7_98-16	ATG	AAG	TGT	ATA	TTA	TTT	AAA	TGG	GTA	CTG	TGC	CTG	TTA	[39]
E.phage_933W	[39]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[39]
E.coli_O157:H7_V20	[39]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[39]
E.coli_O157:H-Thai-13	[39]
E.coli_WUS	[39]
E.coli_O157:H7_144	[39]
E.coli_O157:H7_Fu40	[39]
E.coli_ATCC_43894	[39]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[39]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[39]
E.coli_O157:H7_98-16	CTG	GGC	TTT	TCT	TCG	GTA	TCC	TAT	TCC	CGG	GAA	TTT	ACG	[78]
E.phage_933WTG	[78]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[78]
E.coli_O157:H7_V20	[78]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[78]
E.coli_O157:H-Thai-13	[78]
E.coli_WUST	[78]
E.coli_O157:H7_144	[78]
E.coli_O157:H7_Fu40	[78]
E.coli_ATCC_43894TG	[78]
E.coli_KL_48(2)ManusiaTG	[78]
E.coli_SM_25(1)SapiTG	[78]
E.coli_O157:H7_98-16	ATA	GAC	TTT	TCG	ACT	CAA	CAA	AGT	TAT	GTA	TCT	TCG	TTA	[117]
E.phage_933WCC	[117]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[117]
E.coli_O157:H7_V20	[117]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[117]
E.coli_O157:H-Thai-13	[117]
E.coli_WUSC	[117]
E.coli_O157:H7_144	[117]

Lanjutan Tabel 1

E.coli_O157:H7_Fu40	[117]	
E.coli_ATCC_43894	[117]	
E.coli_KL_48(2)Manusia	[117]	
E.coli_SM_25(1)Sapi	[117]	
E.coli_O157:H7_98-16	AAT	AGT	ATA	CGG	ACA	GAG	ATA	TCG	ACC	CCT	CTT	GAA	CAT	[156]
E.phage_933W	[156]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[156]
E.coli_O157:H7_V20	[156]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[156]
E.coli_O157:H-Thai-13	[156]
E.coli_WUS	[156]
E.coli_O157:H7_144	[156]
E.coli_O157:H7_Fu40	[156]
E.coli_ATCC_43894	[156]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[156]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[156]
E.coli_O157:H7_98-16	ATA	TCT	CAG	GGG	ACC	ACA	TCG	GTG	TCT	GTT	ATT	AAC	CAC	[195]
E.phage_933W	[195]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[195]
E.coli_O157:H7_V20	[195]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[195]
E.coli_O157:H-Thai-13	[195]
E.coli_WUS	[195]
E.coli_O157:H7_144	[195]
E.coli_O157:H7_Fu40	[195]
E.coli_ATCC_43894	[195]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[195]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[195]
E.coli_O157:H7_98-16	ACC	CCA	CCG	GGC	AGT	TAT	TTT	GCT	GTG	GAT	ATA	CGA	GGG	[234]
E.phage_933W	[234]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[234]
E.coli_O157:H7_V20	[234]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[234]
E.coli_O157:H-Thai-13	[234]
E.coli_WUS	G	[234]
E.coli_O157:H7_144	[234]
E.coli_O157:H7_Fu40	[234]
E.coli_ATCC_43894	[234]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[234]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[234]
E.coli_O157:H7_98-16	CTT	GAT	GTC	TAT	CAG	GCG	CGT	TTT	GAC	CAT	CTT	CGT	CTG	[273]
E.phage_933W	[273]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[273]
E.coli_O157:H7_V20	[273]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[273]
E.coli_O157:H-Thai-13	[273]
E.coli_WUS	[273]
E.coli_O157:H7_144	[273]
E.coli_O157:H7_Fu40	[273]
E.coli_ATCC_43894	[273]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[273]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[273]
E.coli_O157:H7_98-16	ATT	ATT	GAG	CAA	AAT	AAT	TTA	TAT	GTG	GCC	GGG	TTC	GTT	[312]
E.phage_933W	[312]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[312]
E.coli_O157:H7_V20	[312]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[312]
E.coli_O157:H-Thai-13	[312]
E.coli_WUS	[312]
E.coli_O157:H7_144	[312]
E.coli_O157:H7_Fu40	[312]
E.coli_ATCC_43894	[312]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[312]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[312]
E.coli_O157:H7_98-16	AAT	ACG	GCA	ACA	AAT	ACT	TTC	TAC	CGT	TTT	TCA	GAT	TTT	[351]
E.phage_933W	[351]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[351]
E.coli_O157:H7_V20	[351]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[351]
E.coli_O157:H-Thai-13	[351]
E.coli_WUS	[351]

Lanjutan Tabel 1

E.coli_O157:H7_144	[351]
E.coli_O157:H7_Fu40	[351]
E.coli_ATCC_43894	[351]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[351]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[351]
E.coli_O157:H7_98-16	ACA	CAT	ATA	TCA	GTG	CCT	GGT	GTG	ACA	ACG	GTT	TCC	ATG		[390]
E.phage_933WC	[390]
E.coli_O157:H7_Thai-12C	[390]
E.coli_O157:H7_V20C	[390]
E.coli_O157:H7_Thai-1	..GC	[390]
E.coli_O157:H-Thai-13C	[390]
E.coli_WUSC	..A	[390]
E.coli_O157:H7_144C	[390]
E.coli_O157:H7_Fu40C	[390]
E.coli_ATCC_43894C	[390]
E.coli_KL_48(2)ManusiaC	[390]
E.coli_SM_25(1)SapiC	[390]
E.coli_O157:H7_98-16	ACA	ACG	GAC	AGC	AGT	TAT	ACC	ACT	CTG	CAA	CGT	GTC	GCA		[429]
E.phage_933W	[429]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[429]
E.coli_O157:H7_V20	[429]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[429]
E.coli_O157:H-Thai-13	[429]
E.coli_WUS	[429]
E.coli_O157:H7_144	[429]
E.coli_O157:H7_Fu40	[429]
E.coli_ATCC_43894	[429]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[429]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[429]
E.coli_O157:H7_98-16	GCG	CTG	GAA	CGT	TCC	GGA	ATG	CAA	ATC	AGT	CGT	CAC	TCA		[468]
E.phage_933W	[468]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[468]
E.coli_O157:H7_V20	[468]
E.coli_O157:H7_Thai-1	..A	[468]
E.coli_O157:H-Thai-13	[468]
E.coli_WUS	[468]
E.coli_O157:H7_144	[468]
E.coli_O157:H7_Fu40	[468]
E.coli_ATCC_43894	[468]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[468]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[468]
E.coli_O157:H7_98-16	CTG	GTT	TCA	TCA	TAT	CTG	GCG	TTA	ATG	GAG	TTC	AGT	GGT		[507]
E.phage_933W	[507]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[507]
E.coli_O157:H7_V20	[507]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[507]
E.coli_O157:H-Thai-13	[507]
E.coli_WUS	[507]
E.coli_O157:H7_144	[507]
E.coli_O157:H7_Fu40	[507]
E.coli_ATCC_43894	[507]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[507]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[507]
E.coli_O157:H7_98-16	AAT	ACG	ATG	ACC	AGA	GAT	GCA	TCC	AGA	GCA	GTT	CTG	CGT		[546]
E.phage_933WA	[546]
E.coli_O157:H7_Thai-12A	[546]
E.coli_O157:H7_V20A	[546]
E.coli_O157:H7_Thai-1A	[546]
E.coli_O157:H-Thai-13A	[546]
E.coli_WUSA	[546]
E.coli_O157:H7_144A	[546]
E.coli_O157:H7_Fu40A	[546]
E.coli_ATCC_43894A	[546]
E.coli_KL_48(2)ManusiaA	[546]
E.coli_SM_25(1)SapiA	[546]
E.coli_O157:H7_98-16	TTT	GTC	ACT	GTC	ACA	GCA	GAA	GCC	TTA	CGC	TTC	AGG	CAG		[585]
E.phage_933W	[585]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[585]
E.coli_O157:H7_V20CT	[585]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[585]
E.coli_O157:H-Thai-13	[585]

Lanjutan Tabel 1

E.coli_WUSG	[585]	
E.coli_O157:H7_144	[585]	
E.coli_O157:H7_Fu40	[585]	
E.coli_ATCC_43894	[585]	
E.coli_KL_48(2)Manusia	[585]	
E.coli_SM_25(1)Sapi	[585]	
E.coli_O157:H7_98-16	ATA	CAG	AGA	GAA	TTT	CGT	CAG	GCA	CTG	TCT	GAA	ACT	GCT	[624]
E.phage_933W	[624]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[624]
E.coli_O157:H7_V20	[624]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[624]
E.coli_O157:H-Thai-13	A..	[624]
E.coli_WUS	[624]
E.coli_O157:H7_144	[624]
E.coli_O157:H7_Fu40	[624]
E.coli_ATCC_43894	[624]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[624]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[624]
E.coli_O157:H7_98-16	CCT	GTG	TAT	ACG	ATG	ACG	CCG	GGA	GAC	GTG	GAC	CTC	ACT	[663]
E.phage_933W	[663]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[663]
E.coli_O157:H7_V20	[663]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[663]
E.coli_O157:H-Thai-13	[663]
E.coli_WUS	[663]
E.coli_O157:H7_144	[663]
E.coli_O157:H7_Fu40	[663]
E.coli_ATCC_43894	[663]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[663]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[663]
E.coli_O157:H7_98-16	CTG	AAC	TGG	GGG	CGA	ATC	AGC	AAT	GTG	CTT	CCG	GAG	TAT	[702]
E.phage_933W	[702]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[702]
E.coli_O157:H7_V20	[702]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[702]
E.coli_O157:H-Thai-13	[702]
E.coli_WUS	[702]
E.coli_O157:H7_144	[702]
E.coli_O157:H7_Fu40	[702]
E.coli_ATCC_43894	[702]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[702]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[702]
E.coli_O157:H7_98-16	CGG	GGA	GAG	GAT	GGT	GTC	AGA	GTG	GGG	AGA	ATA	TCC	TTT	[741]
E.phage_933W	[741]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[741]
E.coli_O157:H7_V20	[741]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[741]
E.coli_O157:H-Thai-13	[741]
E.coli_WUS	[741]
E.coli_O157:H7_144	[741]
E.coli_O157:H7_Fu40	[741]
E.coli_ATCC_43894	[741]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[741]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[741]
E.coli_O157:H7_98-16	AAT	AAT	ATA	TCG	GCG	ATA	CTG	GCC	ACT	GTG	GCC	GTT	ATA	[780]
E.phage_933WAG	[780]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[780]
E.coli_O157:H7_V20	[780]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[780]
E.coli_O157:H-Thai-13	[780]
E.coli_WUSAT	[780]
E.coli_O157:H7_144	[780]
E.coli_O157:H7_Fu40	[780]
E.coli_ATCC_43894AG	[780]
E.coli_KL_48(2)ManusiaAG	[780]
E.coli_SM_25(1)SapiAG	[780]
E.coli_O157:H7_98-16	CTG	AAT	TGT	CAT	CAT	CAG	GGG	GCG	CGT	TCT	GTT	CGC	GCC	[819]
E.phage_933WC	[819]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[819]
E.coli_O157:H7_V20	[819]
E.coli_O157:H7_Thai-1C	[819]

Lanjutan Tabel 1

E.coli_O157:H7_Thai-1	[1053]
E.coli_O157:H-Thai-13	[1053]
E.coli_WUS	T	[1053]
E.coli_O157:H7_144	[1053]
E.coli_O157:H7_Fu40	[1053]
E.coli_ATCC_43894	T	[1053]
E.coli_KL_48(2)Manusia	T	[1053]
E.coli_SM_25(1)Sapi	T	[1053]
E.coli_O157:H7_98-16	AGT	TTT	CCA	AGT	ATA	ATG	AGA	ATG	ATA	CAT	TCA	CAG	TAA	[1092]
E.phage_933W	G	...	C	...	T	...	G	[1092]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[1092]
E.coli_O157:H7_V20	[1092]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[1092]
E.coli_O157:H-Thai-13	[1092]
E.coli_WUS	G	...	C	...	T	...	G	[1092]
E.coli_O157:H7_144	[1092]
E.coli_O157:H7_Fu40	[1092]
E.coli_ATCC_43894	G	...	C	...	T	...	G	[1092]
E.coli_KL_48(2)Manusia	G	...	C	...	T	...	G	[1092]
E.coli_SM_25(1)Sapi	G	...	C	...	T	...	G	[1092]
E.coli_O157:H7_98-16	AAG	TGG	CCG	GAA	AAG	AGT	ACT	GGA	CCA	GTC	GCT	GGA	ATC	[1131]
E.phage_933W	G	T	A	G	...	A	[1131]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[1131]
E.coli_O157:H7_V20	[1131]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[1131]
E.coli_O157:H-Thai-13	[1131]
E.coli_WUS	G	T	A	G	...	A	[1131]
E.coli_O157:H7_144	[1131]
E.coli_O157:H7_Fu40	[1131]
E.coli_ATCC_43894	G	T	A	G	...	A	[1131]
E.coli_KL_48(2)Manusia	G	T	A	G	...	A	[1131]
E.coli_SM_25(1)Sapi	G	T	A	G	...	A	[1131]
E.coli_O157:H7_98-16	TGC	AAC	CGT	TAC	TGC	AAA	GTG	CTC	AGT	TGA	CAG	GAA	TGA	[1170]
E.phage_933W	[1170]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[1170]
E.coli_O157:H7_V20	[1170]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[1170]
E.coli_O157:H-Thai-13	[1170]
E.coli_WUS	[1170]
E.coli_O157:H7_144	[1170]
E.coli_O157:H7_Fu40	[1170]
E.coli_ATCC_43894	[1170]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[1170]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[1170]
E.coli_O157:H7_98-16	CTG	TCA	CAA	TCA	AAT	CCA	GTA	CCT	GTG	AAT	CAG	GCT	CCG	[1209]
E.phage_933W	[1209]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[1209]
E.coli_O157:H7_V20	[1209]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[1209]
E.coli_O157:H-Thai-13	[1209]
E.coli_WUS	[1209]
E.coli_O157:H7_144	[1209]
E.coli_O157:H7_Fu40	[1209]
E.coli_ATCC_43894	[1209]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[1209]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[1209]
E.coli_O157:H7_98-16	GAT	TTG	CTG	AAG	TGC	AGT	TTA	ATA	ATG	ACT	GA	[1241]
E.phage_933W	[1241]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[1241]
E.coli_O157:H7_V20	[1241]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[1241]
E.coli_O157:H-Thai-13	[1241]
E.coli_WUS	[1241]
E.coli_O157:H7_144	[1241]
E.coli_O157:H7_Fu40	[1241]
E.coli_ATCC_43894	[1241]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[1241]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[1241]

Pada Tabel 1 disajikan bahwa dari 1241 nukleotida yang *dialignment*, (keseluruhan daerah ORF gen *stx2*) menunjukkan bahwa susunan nukleotida gen *stx2* isolat *E. coli* ATCC 43894, KL-48(2) asal feses manusia penderita gagal ginjal dan SM-25(1) asal feses sapi memiliki susunan yang sama dengan faga 933W yang merupakan faga yang dibawa oleh *E. coli* EDL 933 asal manusia sebagai penyebab wabah *E. coli* O157:H7 tahun 1982 di Amerika. Bakteri *E. coli* EDL 933 diketahui sebagai strain yang sangat virulen dengan gejala timbulnya rasa keram yang menyeluruh di abdominal yang diawali dengan terjadinya diare tanpa darah ataupun dengan darah. Strain ini juga dibuktikan sangat virulen pada saluran cerna babi dan diasumsikan bersifat sangat berbahaya pada manusia (Ding *et al.*, 2010).

Di sisi lain, isolat KL-48(2) dan SM-25(1) memiliki susunan nukleotida yang sangat berbeda jika dibandingkan dengan isolat *E. coli* O157:H7 strain 98-16 (AB168106) asal feses manusia di Jepang, serta strain lainnya yaitu Thai-12 (AB168110) dan Thai-1 (AB168108) asal daging sapi, strain Thai-13 (AB168111), strain 144 (AB168104) dan strain Fu40 (AB168103) asal feses sapi. Hasil *alignment* terhadap strain-strain tersebut, strain lokal KL-48(2) dan SM-25(1) menunjukkan adanya perbedaan nukleotida berupa substitusi transisi (urutan nukleotida ke-45, 72, 93, 369, 513, 753, 867, 971, 1009, 1037, 1074, 1079, 1085, 1091, 1094, 1103 dan 1109), serta substitusi transversi (urutan nukleotida ke-108, 765, 831, 1097 dan 1099). Selain itu, urutan nukleotida berupa substitusi transisi ke- 369 dan ke-513 dapat digunakan sebagai *marker* nukleotida untuk membedakan isolat *E. coli* O157:H7 strain 98-16 dengan beberapa isolat *E. coli* lainnya, termasuk dengan isolat Indonesia KL-48(2) dan SM-25(1).

SIMPULAN

Isolat KL-48(2) asal manusia memiliki susunan nukleotida komplit gen *stx2* yang identik dengan isolat SM-25(1) asal sapi, demikian pula halnya dengan *E. phaga* 933W maupun dengan *E. coli* ATCC 43894 sebagai agen infeksi dengan kemampuan toksin Stx2 yang mematikan.

SARAN

Diketahuinya susunan genetik gen *stx2* yang identik antara isolat lokal *E. coli* O157:H7 dengan strain referen yang diketahui memiliki sifat virulensi tinggi, disarankan untuk melakukan kajian lebih lanjut terhadap tampilan fenotif dari gen *stx2* melalui uji pada hewan coba ataupun pada kultur sel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi-Departemen Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini melalui dana penelitian Strategis Nasional Tahap II Tahun Anggaran 2014 dengan kontrak No. 239.14/UN 14.2/PNL.01.03.00/2014, Tanggal 14 Mei 2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Dahler B. 2002. *Sindrom Hemolitik Uremik. Buku Ajar Nefrologi Anak*. FK-UI. Jakarta.
- Cadirci O, Siriken B, Inat G, Kevenk TO. 2010. The prevalence of *Escherichia coli* O157 and O157:H7 in ground beef and raw meatball by immunomagnetic separation and the detection of virulence genes using multiplex PCR. *Meat Sci* 84: 553-556.
- Ding H, Zhang R, Liu K, Huang L, Tian M, Jiang M, Zao Q, Mao X. 2010. *Escherichia coli* O157:H7 EDL 933 has a strong virulence to bama miniature pigs by injection and fails to colonize to their gastrointestinal tracts. *Afr J Microbiol Res* 4(16): 1742-1746.
- Foley SL, Simjee S, Meng J, White DG, McDermott PF, Zhao S. 2004. Evaluation of molecular typing methods for *E. coli* O157:H7 isolates from cattle, food, and humans. *J Food Protect* 67(4): 651-657.
- Fraser ME, Fujinaga M, Cherney MM, Melton-celsa AR, Twiddy EM, O'Brien AD, James NG. 2004. Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *E. coli* O157:H7. *J Biol Chem* 279: 27511-27517.

- Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol* 140: 360-370.
- 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.
- Naylor SW, Gally DL, Low JC. 2005. Review. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 295: 419-441.
- Radu S, Ling OW, Rusul G, Abdul Karim MI, Nisibuchi M. 2001. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE Analyses. *J Microbiol Meth* 46: 131-139.
- Saitou N, Nei M. 1987. *The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. *Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0*. *Molecular Biology and Evolution* 10:1093/molbev/msm 092.