

## Deteksi Produksi Toksin Stx-1 dan Stx-2 dari *Escherichia coli* O157:H7 Isolat Lokal Hasil Isolasi Feses dan Daging Sapi

(DETECTION OF STX-1 AND STX-2 TOXINS OF *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 LOCAL ISOLATES ISOLATED FROM FECES CATTLES AND BEEF)

I Wayan Suardana<sup>1</sup>, I Gusti Made Krisna Erawan<sup>2</sup>,  
Bambang Sumiarto<sup>3</sup>, Denny Widaya Lukman<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner <sup>2</sup>laboratorium Penyakit Dalam Veteriner  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana,  
Jl. PB.Sudirman Denpasar, Bali Tlp.(0361) 223791, 701808. E-mail : wayansuardana@plasa.com

<sup>3</sup>Lab Kesehatan Masyarakat Veteriner, FKH, Universitas Gadjah Mada

<sup>4</sup>Lab Kesehatan Masyarakat Veteriner, FKH, Institut Pertanian Bogor

### ABSTRACT

Shiga toxin produced by *Escherichia coli* O157:H7 can cause outbreaks and sporadic cases of serious human diseases. The diseases are indicated by *hemorrhagic colitis* and *hemolytic uremic syndrome*. Meat and meat products have been identified as vehicles of food borne disease caused by *E.coli* O157:H7. The main aim of this research was to identify the correlation between the level of *E.coli* O157:H7 contamination and the presence of Shiga toxin (Stx1 and Stx2) by applying method of Vero toxin *Escherichia coli*-Reverse Passive Agglutination Test (VTEC-RPLA). The results showed that 3 of 7 isolates and 1 of 4 isolates isolated from feces of cattle and beef, respectively produced Stx 1 (VT1). In the detection of Stx 2 (VT2), 4 of 7 isolates and 1 of 4 isolates, isolated from the same samples were found to produce this toxin. According to all isolates, in this research showed, 1 isolate was found to produce VT2, 4 isolates to produce both VT1 and VT2, while 6 isolates showed negative results either to VT1 or VT2.

**Key words :** *E.coli* O157:H7, VT1, VT2

### PENDAHULUAN

Infeksi melalui makanan akibat adanya Shiga toksin yang dihasilkan oleh *Escherichia coli* (STEC) dilaporkan sebagai kausa yang sangat penting terjadinya beberapa wabah (Watanabe *et al.*, 1999; Foley, 2004). Bentuk yang menciri dari STEC adalah dihasilkannya suatu sitotoksin yang sering disebut dengan nama Verotoxin atau *Shiga like toxin* (Stx) (Calderwood *et al.*, 1996; Atalla *et al.*, 2000). *Escherichia coli* O157:H7 merupakan salah satu serotipe yang paling bertanggung jawab terhadap terjadinya kasus *hemolytic uremic syndrome* (HUS), selain serotipe lainnya sebesar 20 sampai 25% yakni serotipe O26:H11, O103:H2 dan O111:H- (Johnson *et al.*, 1996). Sapi merupakan reservoir penting dari Shiga toksin *Escherichia coli* (STEC) termasuk didalamnya yaitu serotipe *E.coli* O157:H7 sebagai bakteri penghasil STEC. Hasil survei menunjukkan sekitar 1-5% dari

sejumlah sapi akan melepaskan *E.coli* O157:H7 dalam fesesnya dengan tingkat kontaminasi < 10<sup>2</sup> cfu/g sampai 10<sup>5</sup> cfu/gram (Jiang *et al.*, 2003).

Secara umum, *E.coli* dianggap sebagai flora normal dalam saluran pencernaan hewan (sapi) yang dapat mengkontaminasi daging dan lingkungan sekitar Rumah Pemotongan Hewan selama proses pemotongan berlangsung. Daging sapi yang pada awalnya sudah terkontaminasi disertai dengan proses pemasakannya yang tidak benar merupakan sumber infeksi dari beberapa kasus keracunan makanan, termasuk yang diakibatkan oleh STEC (Atalla *et al.*, 2000). Walaupun masih ada perantara lainnya sebagai media transmisi adanya beberapa kasus wabah STEC pada manusia, jalur kontaminasi dari feses sapi masih dianggap sebagai jalur yang paling umum (Atalla *et al.*, 2000). Perkembangan penelitian untuk mendeteksi kehadiran STEC secara pesat telah dimulai sejak tahun 1987 (Doyle *et al.*, 1987; Pradel *et al.*, 2000).

Mohammad *et al.*, (1985 dalam Samadpour *et al.*, 2002) dengan teknik penghitungan secara langsung terhadap toksin yang dihasilkan, berhasil menemukan 28 dari 172 sampel (16%) feses sapi positif STEC. Deteksi dengan menggunakan DNA probe Stx-I dan II oleh Samadpour *et al.*, (1990), juga berhasil menemukan 9 dari 28 (32%) sampel feses pedet positif STEC (Samadpour *et al.*, 2002).

Berdasarkan atas pertimbangan belum adanya informasi kehadiran Shiga toksin yang dihasilkan oleh *E.coli* O157:H7 isolat lokal, baik *Shiga like toxin 1* (Stx-1) maupun *Shiga like toxin 2* (Stx-2), maka penelitian deteksi produksi toksin (Stx-1 dan Stx-2) dari *E.coli* O157:H7 khususnya dari isolat lokal hasil isolasi feses sapi dan daging sapi menjadi menarik untuk dilakukan.

## METODE PENELITIAN

### Persiapan Isolat

Sejumlah 7 isolat *E.coli* O157:H7 (hasil isolasi dari 92 sampel) asal feses sapi dan 4 isolat (hasil isolasi dari 89 sampel) asal daging sapi koleksi peneliti sebelumnya diambil dari stok nutrisi agar, untuk selanjutnya ditanam kembali pada media *Brain Heart Infusion Agar* (BHI) untuk menyuburkan isolat yang akan diuji untuk selanjutnya diidentifikasi kembali untuk meyakinkan jenis isolat yang akan diuji lebih lanjut.

### Identifikasi Serotipe *E. coli* O157

Hasil positif fecal coli pada uji IMVIC yang ditanam pada media nutrisi agar miring, selanjutnya ditanam pada media selektif sorbitol MacConkey agar (SMAC) (Oxoid CM 0813),. Sebagai kontrol positif, dalam penelitian ini digunakan kontrol positif *E.coli* O157:H7 ATCC 43894. Setelah diinkubasikan pada suhu 37°C selama 20-24 jam, koloni *E.coli* yang diidentifikasi sebagai *E.coli* O157, dicirikan dengan ciri koloni jernih, tidak berwarna (*colourless*), atau bersifat sorbitol negatif. (Bridson, 1998)

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

Uji konfirmasi yang lebih meyakinkan bahwa koloni positif dari media SMAC adalah *E.coli* O157, maka bersama-sama dengan isolat kontrol positif selanjutnya diuji dengan

menggunakan *E.coli* O157 latex agglutination test (Oxoid DR620 M), dengan cara; sebanyak 2-3 ose isolat positif *E.coli* pada stok isolat dan presumtif *E.coli* O157 pada media SMAC, dimasukkan kedalam 1 ml NaCl fisiologis untuk selanjutnya dipanaskan pada suhu 100°C selama 1-2 jam. Setelah pemanasan, sebanyak 1 tetes isolat direaksikan dengan 1 tetes pereaksi latex. Hasil uji positif ditandai dengan terbentuknya presipitasi, sesuai dengan kontrol positif yang tersedia (Bridson, 1998)

### Uji Serologis dengan *E.coli* H Antiserum H7

Pengujian untuk melihat antigen *fagella* dari *E.coli* O157, yaitu antigen H7, pengujian dilanjutkan dengan cara uji aglutinasi dengan antiserum H7 (Difco™ *E.coli* Antiserum). Pengujian diawali dengan terlebih dahulu melakukan penumbuhan isolat pada media *motility* (media SIM) sebanyak 2 kali *pasase* yang diinkubasikan pada 37°C selama 16-18 jam. Hasil positif ditandai dengan terlihatnya penyebaran pertumbuhan di sekitar tempat tusukan. Isolat yang positif pada uji motiliti selanjutnya dibiakkan pada media. BHI cair, untuk selanjutnya diinkubasi pada suhu inkubasi 35±2 °C selama 18-24 jam. Koloni yang tumbuh diinaktifkan dengan menggunakan 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 cara mengambil 50 µl biakan bakteri yang telah diinaktivasi tersebut, ditambah dengan 50 µl antiserum H7, lalu dicampur secara merata sebelum diinkubasikan pada suhu 50±2 °C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan terjadinya aglutinasi >25% dari volume isolat yang direaksikan, dan terlihat adanya kekeruhan pada bagian supernatannya (Difco, 2003)

### Pengujian Shiga toksin dengan VTEC-RPLA

Pengujian Shiga toksin baik Stx-1 maupun Stx-2, dilakukan dengan cara dicampurkan 0,5 ml pelarut ke dalam masing-masing *vial kit* yang telah disediakan. Selanjutnya disiapkan plat yang terdiri atas 3 kolom dengan masing-masing kolom terdiri atas 8 sumuran. Dipipet 25 µl pelarut untuk ditambahkan ke masing-masing sumuran. Mulai dari sumuran ke-1 ditambahkan 25 µl sampel yang diuji lalu

diencerkan secara berseri sampai sumuran ke-7, sedangkan sumuran ke-8 hanya berisi pelarut saja. Langkah selanjutnya pada setiap sumuran kolom 1 kemudian ditambahkan sebanyak 25 µl VT 1 test latex, dan pada setiap sumuran kolom ke-2 ditambahkan 25 µl VT 2 test latex, sedangkan pada setiap sumuran kolom ke-3 ditambahkan 25 µl kontrol latex, lalu dicampur dengan cara menggoyang goyangkan. Plat selanjutnya ditutup dan di inkubasikan pada suhu kamar selama 20-24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya endapan / *presipitasi* pada dasar plat. Untuk melihat konsistensi hasil dari pengujian *Shiga like toxin* dengan VTEC-RPLA ini, maka dilakukan pengujian ulangan.

**Analisis Data**

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis secara deskriptif untuk selanjutnya disajikan dalam bentuk Tabel (Steel and Torrie, 1995).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Hasil Isolasi dan Identifikasi Isolat *E.coli* O157:H7**

Hasil pengujian 7 isolat *E.coli* O157 asal feses sapi, dan 4 isolat asal daging pada media Sorbitol MacConkey Agar, menunjukkan bahwa seluruh koloni *E.coli* O157 yang tumbuh dalam media ini memperlihatkan bentuk koloni yang tidak berwarna (*colourless*), dan ini mengindikasikan bahwa koloni yang tumbuh tersebut tidak memfermentasikan sorbitol. Pengujian selanjutnya dengan Latex Agglutination Test, seluruh koloni *E.coli* O157 juga memperlihatkan reaksi aglutinasi positif terhadap uji anti serum O157. Pengujian lanjutan terhadap adanya antigen flagella H7, juga memperlihatkan hasil positif yang ditandai dengan terjadinya aglutinasi. Berdasarkan hasil identifikasi ini, maka seluruh isolat dianggap benar-benar merupakan isolat *E.coli* O157:H7. Selanjutnya deteksi adanya produksi Shiga toksin oleh isolat tersebut dengan metode *vero toxin Escherichia coli-reverse pasive latex agglutination test* (VTEC-RPLA) siap dilakukan.

**Perbandingan Cemaran *E.coli* O157:H7 dan *Shiga like toxin 1* (VT1) dan *Shiga like toxin 2* (VT2) pada Feses Sapi dan Daging Sapi dengan Uji Aglutinasi VTEC-RPLA**

Hasil uji *reverse pasive latex agglutination test* (VTEC-RPLA) terhadap VT 1 dan VT 2 dari

Tabel 1. Hasil Uji VT1 dan VT2 dari Isolat *E.coli* O157:H7 Asal Feses dan Daging Sapi dengan *Reverse Pasive Latex Agglutination Test* (VTEC-RPLA)

No	Kode Sampel	Asal Isolat	Uji VT1*	Uji VT2*
1.	SR 22	Feces sapi	-	+
2.	SR 21		-	-
3.	S6		+	+
4.	SM 1	++	+++	
5.	SM 7	-	-	
6.	S 21	-	-	
7.	SP 15	+	+	
8.	DB7	Daging sapi	-	-
9.	DB 16	-	-	
10.	DB 17	+	+	
11.	DB 17-1	-	-	

Keterangan: \*) Hasil 2 kali pengujian

- : tidak terjadi aglutinasi
- + : aglutinasi 25% dari volume isolat
- ++ : aglutinasi 50% dari volume isolat
- +++ : aglutinasi 75% dari volume isolat

7 isolat *E.coli* O157:H7 asal feses sapi dan 4 isolat asal daging sapi ditampilkan pada Tabel 1.

Dari Tabel 1, menyajikan bahwa identifikasi terhadap ke-7 isolat *E.coli* O157:H7 (hasil isolasi dari 92 sampel feses sapi), dan 4 isolat asal daging sapi (hasil isolasi dari 89 sampel daging sapi), menunjukkan bahwa sebanyak 3 dari 7 isolat asal feses sapi (42,86%), dan 1 dari 4 isolat asal daging (25%) positif menghasilkan *Shiga like toxin 1* (VT1). Dari Tabel 1 juga terlihat bahwa 4 dari ke 7 isolat asal feses sapi (57,14%) dan 1 dari 4 isolat asal daging sapi (25%) positif menghasilkan *Shiga like toxin 2* (VT2). Cukup tingginya prevalensi *Shiga like toxin* yang berhasil diidentifikasi sesuai dengan hasil penelitian Bambang Sumiarto *et al.*, (2005) yang berhasil menemukan bahwa prevalensi VTEC (*Shiga like toxin*) pada peternakan sapi perah di Propinsi Jawa Tengah dan Daerah Istimewa Yogyakarta sebesar 53,5%. Hasil yang didapat jauh lebih tinggi dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Samadpour *et al.*, (2002), yang dilakukan di daerah sub-tropis yaitu di Amerika (Washington) dengan tingkat prevalensi STEC pada daging sapi sebesar 16,8%, ataupun hasil penelitian yang dilakukan oleh Heuvelink *et al.*, (1999) yang menemukan prevalensi VTEC di Netherlands hanya sebesar 1,1%.

Rincian lebih jauh dari data Tabel 1 juga menyajikan bahwa, 3 dari 7 isolat asal feses sapi positif menghasilkan toksin VT1 dan VT2, dan hanya 1 isolat yang menghasilkan 1 toksin saja yaitu toksin VT2. Untuk isolat asal daging sapi diketahui bahwa 1 isolat yang diketahui positif menghasilkan toksin, ternyata bersifat positif terhadap VT1 maupun terhadap VT2. Disamping itu, diketahui juga bahwa 3 dari 7 isolat asal feses sapi, dan 3 dari 4 isolat asal daging sapi bersifat negatif baik terhadap VT1 maupun VT2. Hasil ini serupa dengan yang dilaporkan oleh Guyon *et al.*, (2001), yang menemukan bahwa dengan teknik RAPD dan PCR IS3 menemukan bahwa dari 5 isolat *E.coli* O157:H7 yang diisolasi, hanya 3 isolat yang positif memproduksi toksin Stx khususnya Stx2c, sedangkan sisanya 2 isolat negatif. Adanya isolat *E.coli* O157 yang tidak menghasilkan Stx, juga pernah dilaporkan oleh Avery *et al.*, (2002). Dari 24 isolat yang diuji, 19 isolat menunjukkan hasil positif terhadap Stx2, 2 isolat positif Stx 1 dan 2, serta 3 isolat bersifat negatif baik terhadap Stx 1 maupun Stx 2. Foley *et al.*, (2004) juga menemukan bahwa tidak semua isolat *E.coli* O157:H7 dapat menghasilkan kedua jenis verocytotoxin. Ada kalanya 1 isolat menghasilkan kedua-duanya (Stx 1 dan Stx 2), namun ada beberapa strain yang hanya menghasilkan 1 jenis toksin saja yakni Stx 1 ataukah Stx 2.

Dalam LeJeune *et al.*, (2004) disebutkan bahwa, faktor virulensi utama dari *E.coli* O157:H7 adalah adanya *prophage* yang mengkode *Shiga like toxin*. Disamping itu, dijelaskan pula bahwa, semakin besar produksi *Shiga like toksin* untuk setiap bakteri, maka akan berkaitan langsung dengan peningkatan keparahan penyakit pada manusia yang terinfeksi olehnya. Pendapat yang sama juga disebutkan dalam Fey *et al.*, (2000) yang menyatakan bahwa *Shiga like toxin* 1 dan 2 merupakan faktor virulensi utama dari *E.coli* O157:H7 yang berkaitan langsung dengan kejadian *hemorrhagic colitis* dan HUS, terutama karena interaksinya dengan sel endotel pada tempat infeksi, termasuk pada bagian glomerulus dan arteri dari ginjal. Bertitik tolak dari hasil penelitian dan dikaitkan dengan landasan teori yang ada, maka 3 isolat asal feses sapi dan 1 isolat asal daging sapi berpeluang besar bersifat sangat patogen dan menimbulkan gejala klinis berupa *hemorrhagic colitis* dan *hemolytic uremic syndrome* (HUS) karena

mampu memproduksi ke-2 jenis toksin yaitu Stx1 dan Stx2.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil deteksi toksin dengan metode *vero toxin Escherichia coli-reverse passive latex agglutination test (VTEC-RPLA)*, maka:

Identifikasi isolat *E.coli* O157:H7 asal feses sapi dan daging sapi, menunjukkan bahwa tidak semua isolat menghasilkan *Shiga like toxin* baik VT1 (Stx1) maupun VT2 (Stx2). 3 isolat dari 7 isolat feses sapi dan 1 isolat dari 4 isolat daging sapi positif VT1. Sedangkan hasil identifikasi terhadap VT2 menunjukkan 4 dari 7 isolat feses sapi dan 1 dari 4 isolat daging sapi

Hasil identifikasi juga menunjukkan bahwa 4 isolat *E.coli* O157:H7 positif menghasilkan VT1 dan VT2, 1 isolat hanya positif menghasilkan VT2 saja dan ada 6 isolat bersifat negatif terhadap VT1 maupun VT2.

## SARAN

Untuk lebih memastikan hasil pengujian, dipandang perlu dilakukan konfirmasi dengan metode uji lainnya seperti PCR sebagai pembanding. Sekuensing DNA sangat perlu dilakukan untuk lebih memastikan keakuratan gen penyandi *shiga like toxin* yang telah diidentifikasi.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada pihak Dirjen Dikti yang telah mendanai proyek penelitian ini melalui dana Hibah Pekerti Tahap II Tahun Anggaran 2006 dengan Kontrak No.027/SP3/PP/DP2M/II/2006 tanggal 1 Pebruari 2006

## DAFTAR PUSTAKA

- Atalla HN, Johnson R, McEwen S, Osborne RW, Gyles CL. 2000. Use of Shiga Toxin (Stx) Enzyme Linked Immunosorbent Assay and Immunoblot for Detection and Isolation of Stx Producing *Escherichia coli* from Naturally Contaminated Beef. *Journal of Food Protection*. 63(9): 1167-1172.

- Avery SM, Small A, Reid CA, Buncic S. 2002. Pulsed 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.
- Bambang Sumiarto, Setyawan Budiharta, Widya Asmara, Subronto Prodjoharjono. 2005. Epidemiologi Verocytotoxigenic *Escherichia coli* (Vtec) pada Peternakan Sapi Perah di Propositip insi Jawa Tengah dan Daerah Istimewa Yogyakarta. *Jurnal Veteriner*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. 6(3): 85-93.
- Bridson EY. 1998. The Oxoid Manual. 8<sup>th</sup>Ed. Difco. 2003. BD DifcoTM *E.coli* Antiser. Becton, Dickinson and Company 7 Loventon Circle Sparks. Maryland 21152 USA.
- Doyle MP, and Schoeni JL. 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Retail Fresh Meats and Poultry. *Journal of Applied Environmental Microbiology*. 53: 2394-2396.
- Fey PD, Wickert RS, Rupp ME, Safranek TJ, Hinrichs SH. 2000. Prevalence of Non-O157:H7 Toxin Producing *Escherichia coli* in Diarrheal Stool Samples from Nebraska. *Emerging Infectious Disease*. <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/v06no5/fev..htm>.
- 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.
- Guyon R, Dorey F, Malas JP, Leclercq A. 2001. Hazard Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 Contamination during Beef Slaughtering in Calvados, France. *Journal of Food Protection*. 64(9): 1341-1345.
- Heuvelink AE, Zwartkruis-Nahuis JTM, Beumer RR, Boer ED. 1999. Occurance and Survival of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 in Meats Obtained from Retail Outlets in The Netherlands. *Journal of Food Protection*. 62(10): 1115-1122.
- Johnson RP, Clarke RC, Wilson JB, Read SC, Rahn K, Renwick SA, Sandhu KA, Alves D, Karmali MA, Lior H, McEwen, Spika JS, Gyles CL. 1996. Growing Concerns and Recent Outbreaks Involving non-O157:H7 Serotypes of Verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*. 59: 1112-1122
- Jiang X, Morgan J, Doyle MP. 2003. Thermal Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Cow Manure Compost. *Journal of Food Protection*. 66(10). 2003. 1771-1777
- LeJeune JT, Abedon ST, Takemura K, Christie NP, Sreevatsan. 2004. Human *Escherichia coli* O157:H7 Genetic Marker in Isolates of Bovine Origin. *Emerging Infectious Disease*. <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/v010no8/03-0784.htm>.
- Samadpour M, Kubler M, Buck FC, Depavia GA, Mazengia E, Stewart J, Yang P, Alf D. 2002. Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Ground Beef and Cattle Feces from King Country, Washington. *Journal of Food Protection*. 65 (8): 1322-1325.
- Steel, RG, Torrie JH. 1995. Prinsip dan Prosedur Statistika. PT, Gramedia Pustaka. Jakarta: 168-266.
- Watanabe Y, Ozasa K, Mermin JH, Griffin PM, Masuda K, Imashuku S, Sawada T. 1999. Factory Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Japan. *Journal of Emerging Infection Disease*. 5:424-428.