

Studi Epidemiologi Agen Zoonosis *Escherichia coli* O157:H7 melalui Analisis *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD)

(EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF ZOONOTIC AGENT *Escherichia coli* O157:H7 BY RANDOM AMPLIFICATION OF POLYMORPHIC DNA ANALYSIS)

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

¹Mahasiswa S3 Program Studi Bioteknologi Universitas Gadjah Mada, Staf Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Jl. PB.Sudirman Denpasar, Bali Tlp.(0361) 223791, 701808; E-mail : iwayansuardana22@yahoo.com

²Bagian Biokimia, ³Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Jl. Olahraga Karangmalang, Yogyakarta 55281, Tlp.(0274) 560864, Fax.(0274) 560861; E-mail : artama@ugm.ac.id

⁴Bagian Genetika, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Jl. Teknika Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta 55281. E-mail: bs_daryono@yahoo.com

ABSTRAK

Studi epidemiologi terhadap agen zoonosis *Escherichia coli* O157:H7 pada umumnya menggunakan analisis secara fenetik dan atau secara genetik. Pada analisis secara fenetik, pengelompokan bakteri didasarkan dengan adanya kemiripan baik fenetik maupun genetik, tanpa memperhatikan aspek asal-usul ataupun evolusinya. Mempertimbangkan pentingnya aspek epidemiologi dari *E. coli* O157:H7, maka studi variasi genetik dari isolat yang berasal dari berbagai sumber sangat perlu dilakukan, dengan harapan patogenesis dari infeksi dapat diperkirakan. Sebanyak 20 isolat yang berasal dari feses manusia klinis, feses manusia non-klinis, feses sapi, feses ayam dan daging sapi digunakan sebagai materi dasar dalam penelitian ini. Penelitian diawali dengan konfirmasi ulang terhadap keseluruhan isolat dengan uji aglutinasi latek O157 dan uji antiserum H7, yang dilanjutkan dengan uji molekuler untuk analisis DNA genom dengan uji *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD). Data hasil uji RAPD dianalisis dengan metode *simple matching coefficient* (Ssm) dan *algorithym unweighted pair group method using arithmetic averages* (UPGMA). Hasil penelitian menunjukkan bahwa DNA genom dari isolat lokal *E. coli* O157:H7 memiliki kemiripan paling rendah 75,1% dan paling tinggi 96,6% dibandingkan dengan isolat kontrol ATCC 43894. Diketahui bahwa isolat asal feses sapi SM-7(1) dan isolat asal feses manusia klinis KL-68(1) memiliki kemiripan yang paling tinggi 96,6% dibandingkan isolat kontrol ATCC 43894. Disamping itu, isolat klinis KL-52(7) juga memiliki kemiripan 96,6% dengan isolat asal feses ayam MK-35 disamping juga isolat asal daging sapi (DS-21(4) dan DS-16(2)) juga memiliki kemiripan yang tinggi yakni 84,9% terhadap isolat lainnya termasuk isolat kontrol. Adanya kemiripan yang cukup tinggi dari isolat asal feses sapi, feses ayam dan daging sapi dengan isolat asal feses manusia mengindikasikan bahwa kedua jenis hewan berpotensi sebagai reservoir untuk penyebaran agen zoonosis tersebut ke manusia.

Keywords: Zoonosis, *E. coli* O157:H7, fenetik.

ABSTRACT

Epidemiological studies of zoonotic agent *Escherichia coli* O157:H7 have been analyzed phenetically and or phylogenetically. In a phenetic classification, microorganisms are arranged into groups (phena) on the basis of high overall similarity using both phenotypic and genotypic methods without judgement aspect of its ancestry or evolutionary. Due to its importance to epidemiological aspect, the study of genetic variation of isolates origin from some sources need to be conducted in order to trace the routes of infection. A total of 20 samples obtained from some sources i.e clinically human feces, non-clinically human feces, cattle feces, chicken feces, and beef feces were used in this study. The study was started by confirming all of the isolates using O157 latex agglutination test and H7 antiserum test, followed by genomic DNA analysis by *random amplification of polymorphic DNA* /RAPD methods. RAPD results were analyzed

using a *simple matching coefficient* (Ssm) and *algorithym unweighted pair group method using arithmetic averages* (UPGMA) progame. Results showed there were range of genetic DNA from local isolates (75.1–99,6%) which was almost similar to ATCC 43894 control isolate. The highest similarity (99.6%) to ATCC 43894 control was showed by SM-7(1) isolate obtained from cattle fecal and KL-68(1), isolate obtained from clinically human fecal. In addition, KL-52(7) obtained from clinically human fecal had high similarity (99.6%) to MK-35 isolate obtained from chicken fecal. On the other hand, DS-21(4) and DS-16(2) isolates that were obtained from beef had high similarity (84.9%) to other isolates including ATCC 43894 control isolate. The highest similarity of *E. coli* O157:H7 isolates that were obtained from cattle feces, beef, and chicken feces to human feces isolate indicated that there were both cattle and chicken were potential reservoirs of the zoonotic agen which can be transmitted to human.

Keywords: Zoonoses, *E. coli* O157:H7, *phenetic*.

PENDAHULUAN

Sampai saat ini informasi keberadaan *E. coli* O157:H7 dalam kaitannya sebagai agen zoonosis di Indonesia masih sangat jarang terungkap. Padahal *Shiga toxin* yang dihasilkan oleh bakteri ini dapat menimbulkan bahaya yang cukup fatal terutama pada anak-anak dengan tingkat morbiditas dan mortalitas yang sangat tinggi (Acheson, 2000; Centers fo Disease Control and Prevention, 2000). Hasil temuan cemaran *E. coli* O157:H7 oleh Suardana *et al.* (2010) pada daging sapi, feses sapi, feses ayam, manusia non-klinis dan manusia klinis masing-masing sebesar 2,6; 5; 2,5; 6,7; dan 15%, menunjukkan bahwa keberadaan agen zoonosis tersebut telah terdistribusi secara luas baik pada hewan maupun manusia, sehingga karakter molekuler epidemiologinya perlu dikaji secara lebih mendalam.

Kajian epidemiologi suatu agen zoonosis dengan aplikasi teknik genetik telah banyak digunakan oleh para peneliti termasuk didalamnya adalah penggunaan metode DNA *subtyping* untuk mengkarakterisasi genom bakteri seperti *pulsed-field gel electrophoresis* (FGE), *ribotyping*, *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) dan *DNA sequencing* (Hill dan Jinneman, 2000).

Strain *verocytotoxigenic E. coli* seperti *E. coli* O157:H7 dapat memiliki karakter yang bervariasi, serta dapat diklasifikasikan secara *artificial* ataupun *natural*. Klasifikasi *natural* terbagi menjadi klasifikasi *phenetic* dan *phylogenetic*. Dalam klasifikasi fenetik, mikroorganisme tersusun menjadi grup (*phena*) berdasarkan kemiripan sifat fenotip atau genotip tanpa menyinggung asal usul atau evolusi organisme tersebut, sedangkan klasifikasi filogenetik lebih didasarkan pada kesamaan genetik (*genealogik*) yang menelusuri evolusi dan asal usul organisme (Priest dan Austin,

1993). Drastini (2007) melaporkan karakter VTEC berdasarkan profil *ribotyping* menggunakan enzim restriksi *EcoR1* maupun *SalI*. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa VTEC (O157 maupun non-O157) terletak dalam klaster yang berbeda dengan O157:H7 dari manusia. Dengan enzim *EcoR1*, VTEC terletak dalam tingkat kemiripan 77,6%, sedang dengan enzim *SalI* dalam tingkat 59,9%. Peneliti lainnya, Fadil Al-Darahi *et al.*, (2008) menggunakan metode *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) berhasil menemukan 56 genotipe dari 10 isolat *E. coli* O157:H7 yang diuji dan menyimpulkan bahwa analisis PCR-RAPD merupakan metode yang terbukti dapat memberikan nilai *diversity moleculer* yang tinggi terutama dalam studi epidemiologi dari *E. coli* O157:H7.

Bertitik tolak dari permasalahan di atas dengan memperhatikan metode *randomly amplified polymorphic DNA* (RAPD) sebagai salah satu metode sidik jari DNA yang didasarkan pada reaksi PCR yang umum digunakan untuk mengklasifikasikan strain bakteri (Franklin *et al.*, 1999), serta mempertimbangkan belum adanya karakterisasi genetik *E. coli* O157:H7 isolat lokal, maka terpikirkan untuk mengetahui variasi genetik diantara isolat *E. coli* O157:H7 antara manusia dan hewan melalui pengujian dengan metode RAPD, sehingga pola epidemiologi penyebaran agen *E. coli* O157:H7 sebagai agen zoonosis dapat diteguhkan.

METODE PENELITIAN

Persiapan Isolat

Isolat *Escherichia coli* O157:H7 yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 20 isolat yang terdiri dari 11 isolat asal feses manusia klinis, 2 isolat asal feses manusia non-klinis, 2

isolat asal feses ayam, 2 isolat asal daging sapi, 2 isolat asal feses sapi dan 1 isolat kontrol ATCC 43894 diambil dari stok isolat (disimpan dalam gliserol 30% dengan suhu penyimpanan -20°C) untuk selanjutnya di kultivasi pada media *lactose broth* (LB) selama semalam pada suhu 37°C. Isolat yang tumbuh selanjutnya di konfirmasi ulang dengan *E. coli* O157 *latex agglutination test* (Oxoid, DR120M), dengan cara mereaksikan dengan pereaksi latex (1 tetes isolat ditambah 1 tetes pereaksi latex). Hasil positif ditandai dengan terbentuknya presipitasi, sesuai dengan kontrol positif yang tersedia (Oxoid, 2010). Konfirmasi juga dilakukan terhadap H7 dengan menumbuhkan isolat pada media *brain hearth infusion broth* (BHI). Isolat yang tumbuh selanjutnya diinaktivasi dengan formalin 40% dengan perbandingan 0,3 bagian formalin dalam 100 bagian BHI, untuk selanjutnya disebut sebagai antigen. Antigen ini diuji dengan antiserum H7 (BD Difco™ *E. coli* Antiserum H7, Cat.No. 221591) yang telah diencerkan dengan perbandingan 1:500. Pengujian dilakukan dengan mereaksikan 50 µl antigen dengan 50 µl antiserum di dalam plat dan diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu 50°C selama 1 jam. Hasil yang positif ditandai dengan terbentuknya butiran pasir (presipitasi) pada dasar plat (Difco, 2009).

Isolasi DNA Genomik Bakteri

Tahap isolasi DNA genomik bakteri mengacu pada prosedur Qiagen (2007). Isolat *E. coli* O157:H7 yang diinokulasi pada media LB dipanen dengan cara sentrifugasi 7500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, sedang pelet sel ditambah 180 µl *tissue lysis buffer* (Bufer ATL) dan 20 µl larutan proteinase K selanjutnya divortek selama 15 detik. Larutan kemudian ditambahkan 200 µl *lysis buffer* (Buffer AL), divortek selama 15 detik, diinkubasikan pada *waterbath* suhu 56°C selama 10 menit, ditambahkan 200 µl etanol absolut 96-100%, dan divortek selama 15 detik. *Lysate E. coli* selanjutnya digunakan untuk *binding* DNA. *Lysate* dimasukkan ke dalam *microtube* penyaring yang terletak dalam *ependorf* 2 ml (*QIAamp Mini spin column*) dan disentrifius 6000xg (8000 rpm) selama 1 menit. Sisa cairan dibuang, dan filter yang telah mengandung DNA dimasukkan ke dalam *ependorf* 2 ml yang baru dan dilanjutkan dengan tahapan *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 *ependorf* 2 ml yang baru. *Wash buffer* (buffer AW2) sebanyak 500 µl ditambahkan dan didiamkan selama 5 menit. *Ependorf* 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* (Nunc, Inc) 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 (*ependorf* telah mengandung larutan DNA murni). Untuk menghindari pengulangan *freezing* dan *thawing*, DNA murni disimpan pada 4°C untuk uji selanjutnya.

Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

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

Reaksi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan *Random Amplified Polimorphic DNA* (RAPD).

PCR-RAPD dilakukan menggunakan 4 primer *universal* pendek yaitu A-01: 5'-CAG GCC CTTC-3'; A-02: 5'-TGC CGA GCTG-3'; A-03: 5'-AGT CAG CCAC-3' dan A-04: 5'-ATT CGG GCTG-3'. Reaksi PCR dilakukan pada total volume 27 µl yang mengandung 1,0 µl DNA *template*, 12,5 µl FastStart PCR Master (Roche Cat No. 04710436001), 1,0 µl masing-masing primer dan 9,5 µl *distilled water*. Amplifikasi dilakukan pada mesin *MJ Mini Personal Thermalcyler Biorad model PTC-1148* dengan kondisi *predenaturasi* pada suhu 94°C selama 5 menit, diikuti 36 siklus dengan kondisi reaksi *denaturasi* 94°C selama 1 menit, *annealing* pada 35°C selama 30 detik, dan *polimerisasi* pada suhu 72°C selama 1 menit. Pada bagian akhir ditambahkan dengan *polimerisasi* tambahan pada suhu 72°C selama 5 menit. Setelah reaksi selesai, sebanyak 5 µl produk PCR dicampur dengan 2 µL *loading dye* (*blue / orange loading dye*) dan dielektroforesis pada gel agarose 1% (Gibco BRL Cat.No. 5510UA) yang telah diisi Ethium bromide solution 1,5 ml/

25 ml (Promega Cat.No. H5041), bersama dengan *Marker* 100 bp DNA *Ladder* (Invitrogen, Cat.No.10380-012). Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100V selama 30 menit. Visualisasi *band* /pita 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, pita yang terbentuk dikonversikan dalam bentuk matriks $n \times t$ (n = jumlah tipe pita, t = jumlah isolat) dengan metode sistematik numerik, dan dianalisis dengan Ssm serta UPGMA dalam program *Multivariate Statistical Package* (MVSP) 3.1 (Sembiring, 2002).

HASIL DAN PEMBAHASAN

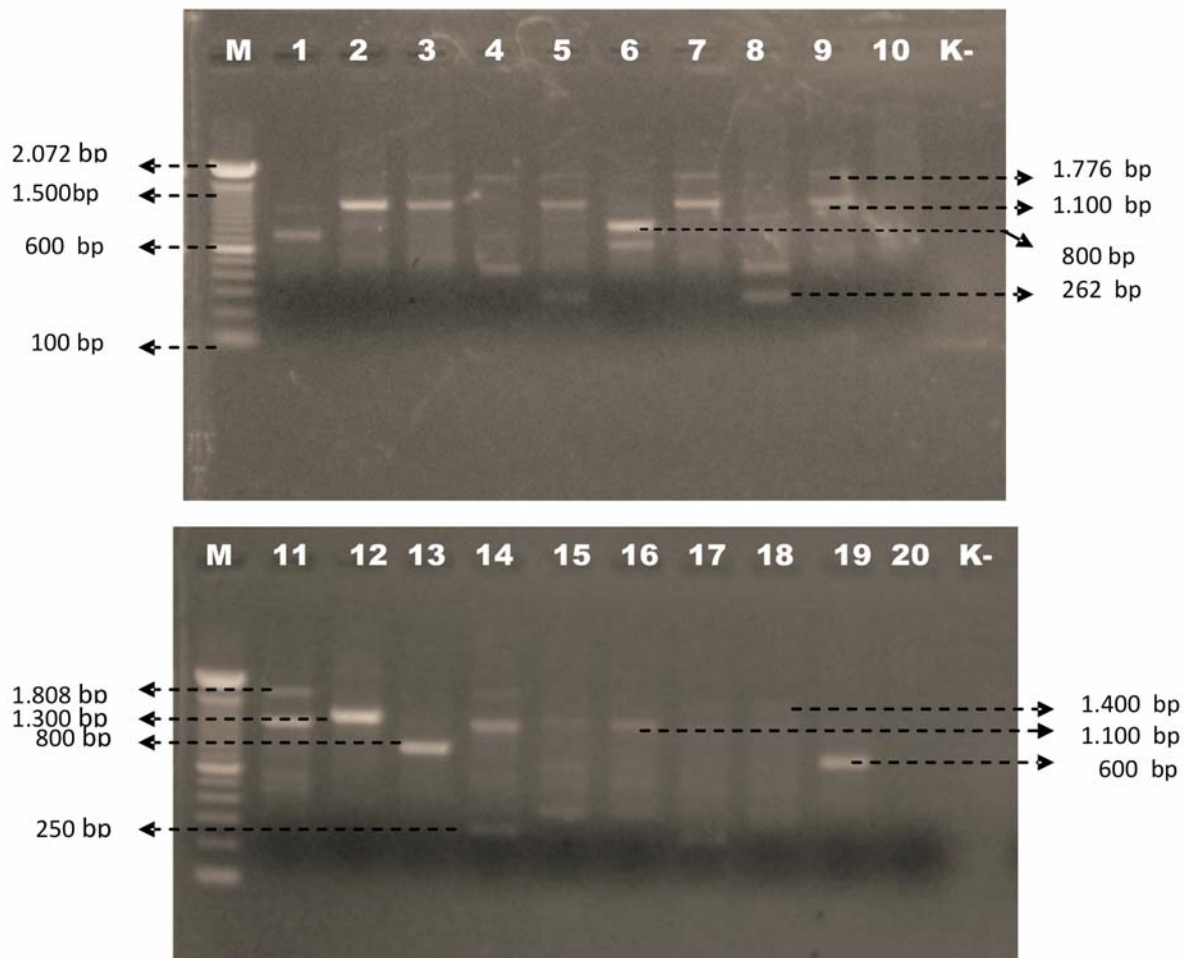
Hasil identifikasi variasi molekuler isolat *Escherichia coli* O157:H7 dengan metode RAPD seperti tersaji pada Gambar 1 dengan gambaran grafik representatifnya pada Gambar 2, serta variasi *band* / pita yang terbentuk secara ringkas tersaji pada Tabel 1.

Setelah dilakukan perhitungan variasi jumlah pita yang muncul pada Gambar 1 dan 2. didapat hasil seperti tersaji pada Tabel 1.

Hasil PCR-RAPD pada Gambar 1 yang dikonversi dengan grafik representatif Gambar 2, serta hasil perhitungan fragmen pita yang terbentuk seperti tersaji pada Tabel 1 di atas, terlihat adanya variasi fragmen dan jumlah pita diantara ke-20 isolat yang diuji. Hasil ini memperlihatkan adanya penempelan primer pendek RAPD A-01, A-02, A-03, dan A-04 yang berbeda-beda pada masing-masing isolat. Adanya variasi penempelan primer ini, dapat digunakan sebagai petunjuk adanya perbedaan variasi sekuen dari DNA genom masing-masing isolat. Dari 20 isolat yang diuji ditemukan adanya jumlah *band*/pita yang bervariasi antara 1 pita sampai 6 pita. Fragmen pita yang terbentuk juga bervariasi mulai dari 200 bp sampai 2366 bp dengan 20 macam genotipe. Glick and Pasternak (2003) mengungkapkan bahwa primer/oligonukleotida pendek yang digunakan dalam reaksi RAPD akan membentuk pasangan di banyak tempat dengan DNA kromosom. Jumlah fragmen DNA yang teramplifikasi akan tergantung pada primer dan

Tabel 1. Fragmen dan Jumlah Pita Isolat *E. coli* O157:H7 Hasil PCR-RAPD.

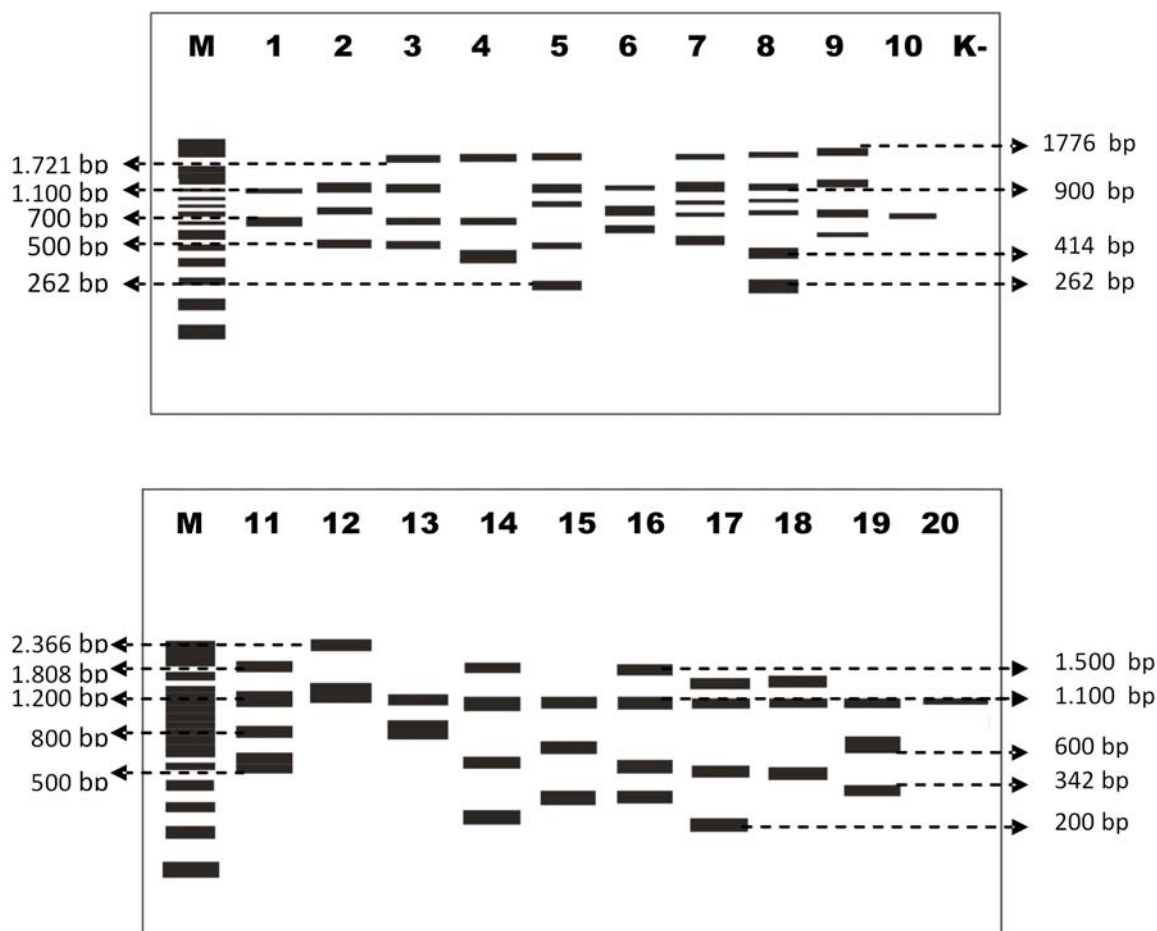
No	Isolat	Asal isolat	Daerah Pengambilan	Fragmen pita (bp)	Jumlah pita
1.	ATCC	feses manusia	USA	1100; 700	2
2.	KL 52(7)	feses manusia klinis	Karangasem	1100;800;500	3
3.	KL 87(7)	feses manusia klinis	Denpasar	1721;1100;700;500	4
4.	KL 30(4)	feses manusia klinis	Badung	1721;700;414	3
5.	KL 45(1)	feses manusia klinis	Denpasar	1721;1100;900;500;262	5
6.	KL 48(2)	feses manusia klinis	Badung	1100;800;600	3
7.	KL 85(1)	feses manusia klinis	Karangasem	1721;1100;900;737;500	5
8.	KL 83(5)	feses manusia klinis	Karangasem	1721;1100;900;737;414;262	6
9.	KL 24(5)	feses manusia klinis	Badung	1776;1127;737;538	4
10.	KL 68(1)	feses manusia klinis	Badung	700	1
11.	KL 106(3)	feses manusia klinis	Negara	1808;1200;800;553;500	5
12.	KL 55(6)	feses manusia klinis	Badung	2366;1300	2
13.	MK 35	feses ayam	Denpasar	1100;800	2
14.	MK 19(8)/4	feses ayam	Denpasar	1808;1100;500;250	4
15.	M 14(4)	feses manusia non-klinis	Badung	1100;600;300	3
16.	M 17(1)	feses manusia non-klinis	Badung	1500;1100;500;300	4
17.	DS 21(4)	daging sapi	Pasar Badung	1400;1100;429;200	4
18.	DS 16(2)	daging sapi	Pasar Badung	1400;1100;429	3
19.	SM 25(1)	feses sapi	Badung	1000;600;342	3
20.	SM7(1)	feses sapi	Badung	1100	1
Total					67



Gambar 1. Profil genom DNA isolat *E. coli* O157:H7 dengan metode RAPD pada agarose 1%. Kolom 1 kontrol positif : ATCC 43894; 2 sampai 12 Feses manusia klinis yaitu; kolom 2: KL52(7); 3: KL87(7); 4: KL30(4); 5: KL45(1); 6: KL(48(2); 7: KL85(1); 8: KL83(5); 9: KL24(5); 10: KL68(1); 11: KL106(3); dan kolom 12: KL55(6); kolom 13 sapaai 14 Feses ayam yaitu; kolom 13: MK35; 14: MK19(8)/4; kolom 15 sampai 16 Feses manusia non-klinis yaitu; kolom 15: M14(4)/ dan kolom 16: M17(1); kolom 17 sampai 18 Daging sapi yaitu; kolom 17: DS21(4) dan kolom 18: DS16(2); kolom 19-20 Feses sapi yaitu; kolom 19: SM25(1) dan kolom 20: SM7(1). M: Marker 100 bp DNA Ladder; K-: Kontrol negatif.

DNA genom yang digunakan, sehingga metode RAPD dapat digunakan untuk mengetahui karakteristik dari seluruh genom ataupun kromosom suatu individu. Prist and Austin (1993) mengungkapkan bahwa produk RAPD yang dipisahkan dengan gel agarose secara elektroforesis akan menjadi sebuah sidik jari / *fingerprint* dari suatu strain yang dicirikan oleh sejumlah pita yang muncul pada gel. Pendapat yang sama juga ditegaskan oleh Franklin *et al.* (1999) yang menyatakan bahwa individu dengan karakter sekuennya yang berbeda, akan memiliki tempat penempelan primer yang berbeda dan menghasilkan spektrum fragmen

yang berbeda pula, sehingga keadaan ini akan mencari pada individu dengan karakter genetik yang berbeda, atau merupakan suatu “sidik jari”. Akurasi RAPD sebagai salah satu metode *genotyping* yang cukup handal telah dibuktikan oleh Vogel *et al.*, (2004) yang menemukan bahwa metode RAPD memiliki nilai resolusi yang tinggi hampir sama dengan metode *Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) dan *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE). Memperhatikan adanya variasi jumlah pita dan variasi fragmen pita yang terbentuk diantara ke-20 isolat *E. coli* O157:H7 yang diuji, maka dapat disimpulkan



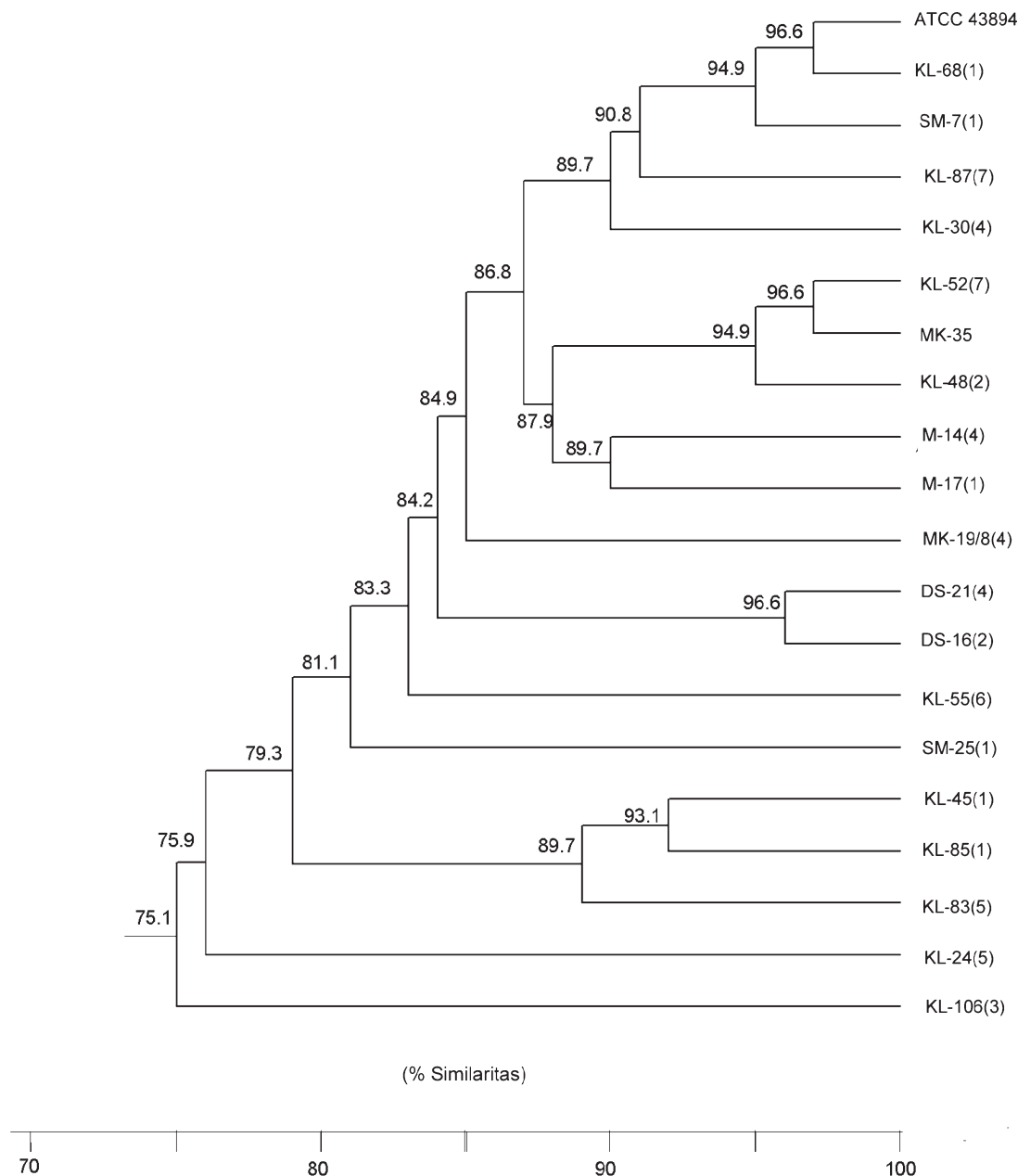
Gambar 2. Grafik representative profil genom DNA isolat *E. coli* O157:H7 dengan metode RAPD pada agarose 1%. Kolom 1 kontrol positif : ATCC 43894; 2 sampai 12 Feses manusia klinis yaitu; kolom 2: KL52(7); 3: KL87(7); 4: KL30(4); 5: KL45(1); 6: KL(48(2); 7: KL85(1); 8: KL83(5); 9: KL24(5); 10: KL68(1); 11: KL106(3); dan kolom 12: KL55(6); kolom 13 sapa 14 Feses ayam yaitu; kolom 13: MK35; 14: MK19(8)/4; kolom 15 sampai 16 Feses manusia non-klinis yaitu; kolom 15: M14(4)/ dan kolom 16: M17(1); kolom 17 sampai 18 Daging sapi yaitu; kolom 17: DS21(4) dan kolom 18: DS16(2); kolom 19-20 Feses sapi yaitu; kolom 19: SM25(1) dan kolom 20: SM7(1). M: Marker 100 bp DNA Ladder; K-: Kontrol negatif.

bahwa metode RAPD yang digunakan cukup handal sebagai metode *genotyping* yang menggambarkan adanya variasi genetik dari masing-masing isolat.

Kajian lebih lanjut yang didasarkan atas pola pita yang terbentuk berupa hasil analisis berbentuk dendogram yang menunjukkan tingkat kemiripan/similaritas di antara ke-20 isolat *E. coli* O157:H7 lengkap dengan nilai persentase kemiripannya (% similaritas) seperti tersaji pada Gambar 2.

Dendogram Gambar 2 menunjukkan bahwa dari 20 isolat lokal *E. coli* O157:H7 dengan asal sampel berbeda yakni isolat asal feses manusia klinis (penderita dengan gangguan fungsi ginjal),

isolat asal feses manusia non-klinis, isolat asal feses sapi, feses ayam dan daging sapi terbagi kedalam 15 klaster dengan 19 titik percabangan (*node*). Klaster 1 terdiri atas ATCC 43894 dan KL-68(1) dengan tingkat similaritas 96,6%. Klaster 2 yaitu SM-7(1) dengan tingkat similaritas 94,9% terhadap klaster 1; klaster 3 yaitu KL-87(7) dengan tingkat similaritas 90,8% terhadap klaster 1 dan 2; klaster 4 yaitu KL-30(4) dengan tingkat similaritas 89,7% terhadap klaster 3, 2 dan 1, demikian seterusnya dengan klaster 5 (terdiri dari KL-52(7) dan MK-35) sampai klaster 15(KL-106(3)) dengan tingkat similaritasnya masing-masing. Gambar 2 menunjukkan tingkat similaritas diantara ke-



Gambar 2. Dendrogram similaritas antara isolat *E. coli* O157:H7. Dendrogram dibuat berdasarkan *simple matching coefficient (Ssm)* dan *alographyth unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA)*.

20 isolat yang diuji berada pada kisaran 75,1 sampai 96,6%. Kisaran yang cukup tinggi tersebut menunjukkan adanya peluang untuk ditemukannya kesamaan DNA atau DNA-DNA *relatednes* dari isolat *E. coli* O157:H7 yang diuji. Pendapat ini didukung oleh Rosello-Mora dan Amann (2001) yang mengungkapkan bahwa secara umum suatu organisme di dalam spesies prokariotik dapat dikelompokkan ke dalam strain yang sama bilamana memiliki kemiripan genom 70% atau lebih besar. Dijelaskan lebih

lanjut bahwa DNA-DNA *relatednes* dengan tingkat kemiripan $\geq 70\%$ cenderung memiliki kesamaan sekuen gen 16S rDNA $>97\%$.

Ditemukannya tingkat kemiripan yang tinggi (96,6%) antara isolat *E. coli* O157:H7 asal feses manusia klinis dengan isolat asal feses sapi, demikian juga antara isolat asal manusia klinis dengan isolat asal feses ayam, mengindikasikan hewan sapi ataupun ayam berpotensi sebagai sumber penularan dari agen zoonosis *E. coli* O157:H7. Nataro dan Kaper (1998) menyatakan

bahwa hewan sapi, kambing, domba, babi, kucing, anjing dan unggas merupakan reservoir alamiah dari *E. coli* O157:H7, yang dapat berpindah ke manusia melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi.

Adanya kemiripan yang tinggi antara isolat asal feses sapi, feses ayam, daging sapi, feses manusia non-klinis maupun manusia klinis, menunjukkan isolat *E. coli* O157:H7 yang diisolasi berpeluang besar bersifat zoonosis yakni dapat menular dari hewan / produk hewan sebagai reservoirnya ke tubuh manusia dengan ataupun tanpa menunjukkan gejala klinis. Kesimpulan terjadinya penularan dengan tanpa memperlihatkan gejala klinis ini pada penderitanya didukung dengan ditemukannya kemiripan yang cukup tinggi (89,7%) antara isolat M14(4) dan M17(1) dengan isolat penderita klinis hemodialisis KL-52(7) dan KL-48(2), serta isolat asal feses ayam MK-35. Disamping itu, ditemukan juga kemiripan yang tinggi antara isolat *E. coli* O157:H7 asal manusia dengan

gejala klinis (penderita hemodialisis) dengan karakteristik penderita seperti pada Tabel 2 dengan isolat asal hewan (feses sapi dan feses ayam) ataupun dengan isolat yang berasal dari daging sapi.

Data pada Tabel 2 menegaskan bahwa isolat *E. coli* O157:H7 dapat diisolasi dari penderita sekalipun tanpa adanya kontak dengan hewan sapi, babi, ayam, kambing ataupun domba sebelum si pasien menderita gagal ginjal untuk pertama kalinya, walaupun kausa gagal ginjal tidak semata-mata disebabkan oleh agen infeksi *E. coli* O157:H7. Hasil penelitian ini mengindikasikan kemungkinan dapat terjadinya transmisi agen secara horizontal dari orang ke orang. Nataro dan Kaper (1998) menyatakan bahwa sekalipun hewan sapi, kambing, domba, babi, kucing, anjing dan unggas merupakan reservoir alamiah dari *E. coli* O157:H7, yang dapat berpindah ke manusia melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi, namun peluang terjadinya perpindahan agen dari orang ke orang juga dapat terjadi.

Tabel 2. Karakteristik Penderita Klinis Hemodialisis di RSUP Sanglah Positip *E. coli* O157:H7

No	Kode	Alamat	Gejala Klinis (sebelum cuci darah)	Telah cuci darah	Kontak langsung dengan hewan sebelum cuci darah pertama kali				Keterangan
					Sapi	Babi	Kambing/ Domba	Unggas/ Ayam	
1.	KL-52(7)	Karangasem	Muntah, mencret, dingin	Maret 2009	+	+	-	+	Petani
2.	KL-87(7)	Jl. Arjuna No. 19, Denpasar	Radang ginjal	2007	-	-	-	+	PNS (Dinas Sosial Prop.Bali)
3.	KL-30(4)	Mambal, Badung	Sakit pinggang	Juli 2007	-	-	-	-	Tukang PNS (Guru SD)
4.	KL-45(1)	Jl. Tukad Balian, Denpasar	Mual, mencret, sesak	2007	-	-	-	-	
5.	KL-48(2)	Tuban, Badung	Mual, mencret, batu ginjal	Juli 2008	+	+	-	+	Swasta
6.	KL-85(1)	Karangasem	Mual, mencret	2 tahun	+	+	-	-	Swasta
7.	KL-83(5)	Karangasem	Mual, mencret, gatal-gatal	2,5 tahun	-	+	-	-	PNS
8.	KL-24(5)	Jimbaran Badung	Komplikasi	6 bulan	-	-	-	-	Ibu Rumah Tangga
9.	KL-68(1)	Nusa Dua Badung	Bengkak, komplikasi jantung	1,5 tahun	-	-	-	+	Swasta
10.	KL-106(3)	Negara	Operasi ginjal (infeksi)	1 tahun	-	-	-	-	Pegawai Bank Mandiri
11.	KL-55(6)	Pelaga Badung	Mencret, infeksi ginjal	6 bulan	+	+	-	+	Penjual sate babi

Adanya kemiripan dari isolat lokal dengan isolat referen (kontrol ATCC 43894) mengidentifikasi bahwa isolat lokal hasil isolasi dan identifikasi berpeluang besar memiliki sifat patogenitas yang serupa dengan kejadian awal ditemukannya wabah *E. coli* O157:H7, dimana isolat referen tersebut berasal. Tingkat kemiripan/similaritas yang tinggi antara isolat kontrol ATCC 43894 dengan isolat asal feses manusia klinis KL 68(1) yang riwayat penderitanya sempat mengadakan kontak dengan ayam dan isolat asal feses sapi SM 7(1) sebesar 96,6%, mencerminkan bahwa agen zoonosis tersebut dapat ditemukan pada hospes ayam, sapi serta manusia. Sekalipun ayam bukan merupakan reservoir utama seperti halnya pada sapi, namun Schoeni dan Doyle (1994) membuktikan bahwa agen *E. coli* O157:H7 secara efektif dapat berkolonisasi pada ayam umur 1 hari dengan dosis hanya $2,6 \times 10^1$ CFU, serta dibuktikan juga kolonisasi dapat bertahan sampai 11 bulan apabila ditantang dengan dosis 10^8 CFU. Peluang sapi ataupun ayam sebagai reservoir yang dapat memindahkan agen *E. coli* O157:H7 ke manusia diperkuat oleh hasil penelitian Chinen *et al.*, (2009) yang berhasil menemukan bahwa 19 dari 279 (6,8%) sampel burger sapi dan ayam serta, 4 dari 39 (10,3%) sampel karkas ayam diketahui positif *E. coli* O157.

SIMPULAN

Hasil analisis keragaman genetik DNA genom dari isolat lokal *E. coli* O157:H7 dengan metode RAPD menunjukkan bahwa 1). DNA genom isolat lokal memiliki kemiripan dengan DNA genom *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 antara 75,1% - 96,6%; 2). Ditinjau dari sisi epidemiologi molekuler, ternak sapi dan ayam terbukti sebagai reservoir yang dapat memindahkan agen zoonosis *E. coli* O157:H7 ke manusia.

SARAN

Untuk lebih memastikan hasil pengujian, maka dipandang perlu dilakukan konfirmasi DNA genom dengan analisis 16S RNA ataupun dengan metode *genotyping* lainnya seperti *Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) dan *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE).

UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada Bapak Prof. Supar, APU atas bantuannya memberikan isolat kontrol ATCC 43894, disamping itu penulis juga mengucapkan terimakasih kepada pihak Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Gadjah 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 Beasiswa Pendidikan Pasca Sarjana (BPPS) untuk mahasiswa program Doktor.

DAFTAR PUSTAKA

- Acheson DWK. 2000. How Does *Escherichia coli* O157:H7 Testing in Meat Compare with What We Are Seeing Clinically ?. *Journal of Food Protection*. 63 (6): 819-821.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2000. *Escherichia coli* O157:H7. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/dmd/diseaseinfo/escherichiacoli.g.htm>.
- Chinen I, Epsteyn S, Melamed CL, Aguerre L, Espinosa EM, Motter MM, Baschkier A, Manfredi E, Miliwebsky E, Rivas M. 2009. Shiga Toxin_Producing *Escherichia coli* O157 in Beef and Chicken Burgers, and Chicken Carcass in Buenos Aires, Argentina. *International Journal of Microbiology*. 132: 167-171.
- Difco™ . 2009. *E.coli* H Antiserum H7. cited Desember 11, 2010. Available from: URL: <http://catalog.bd.com>
- Drastini Y. 2007. Kajian Verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) pada Ternak di Indonesia. Disertasi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Fahdil Al-Darahi K, Mahdi LK, Tariq Al-Naib K, Jubreal J. 2008. Molecular Characterization of *E. coli* O157:H7 Strains Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Journal Dohuk Univ*. 11(1): 198-204.
- Franklin RB, Taylor DR, Mills AL. 1999. Characterization of Microbial Communities Using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Microbiological Methods*. 35: 225-235.

- Glick R, Pasternak JJ. 2003. Molecular Biotechnology; Principles and Applications of Recombinant DNA. 3rdEd. ASM Press. Washington DC.
- 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, M.Lund, T.C.Baird-Parker, and G.W. Gould. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(1): 142-201
- Oxoid, 2010. E.coli O157 Latex Test Kit. cited Desember 11, 2010. Available from: <http://www.oxoid.com>
- Priest B, Austin B. 1993. Modern Bacterial Taxonomy. 2ndEd. Chapman & Hall. London.
- Rosello-Mora R, Amann R. 2001. Review. The Species Concep for Prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. 25: 39-67.
- Qiagen. 2007. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. 2nd Ed. Sample & Assay Technologies.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rdED. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Schoeni JL, Doyle MP. 1994. Variable Colonization of Chickens Perorally Inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and Subsequent Contamination of Eggs. *Journal of Applied Environmental Microbiology*. 60: 2958-2962
- Sembiring L. 2002. Sistematika Mikrobial. Petunjuk Praktikum. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Suardana IW, Artama WT, Asmara W, Daryono BS. 2010. Identifikasi *Escherichia coli* O157:H7 serta Deteksi Gen Shiga Like Toxin 1 dan 2 Asal Feses Hewan, Daging dan Feses Manusia. *Jurnal Veteriner*. 11(4): 264-270.
- Vogel BF, Fussing V, Ojeniyi B, Gram L, Ahrens. 2004. High Resolution Genotyping of *Listeria Monocytogenes* by Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis Compared to Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Random Amplified Polymorphic DNA Analysis, Ribotyping, and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal of Food Protection*. Vol 67(8): 1656-1665.