ISSN : 1411 - 8327

Isolasi dan Identifikasi *Escherichia coli* O157:H7 pada Daging Sapi di Kabupaten Badung Provinsi Bali

(ISOLATION AND IDENTIFICATION Escherichia coli O157:H7 ON BEEF AT BADUNG REGENCY PROVINCE OF BALI)

I WAYAN SUARDANA[1], BAMBANG SUMIARTO[2] DAN DENNY WIDAYA LUKMAN[3]

[1] Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner FKH-UNUD, Jl. PB.Sudirman Denpasar, Denpasar- Bali. Tlp.(0361) 223791. E-mail : wayansuardana@plasa.com
[2] Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner FKH-UGM, Jl. Olah Raga, Karang Malang, Yogyakarta.Tlp. (0274) 563083
[3] Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner FKH-IPB, Jl. Agathis, Darmaga Bogor. Tlp. (0251) 625588, 629470(285). E-mail : dennylukman@hotmail.com

ABSTRAK

Keamanan bahan pangan merupakan masalah yang amat penting bagi konsumen dan industri pangan. Cemaran bakteri *Escherichia coli* dan *Coliform* dianggap sebagai indikator sanitasi dalam proses pengolahan bahan pangan. Pelacakan bakteri patogen dalam pangan juga telah dilakukan secara rutin, termasuk yang bersifat zoonosis seperti *Escherichia coli* O157:H7. Bakteri ini menghasilkan toksin yang dikenal dengan *Shiga toxin*. Toksin ini dapat menimbulkan diare berdarah, *colitis haemorhagi* dan *hemolitic uremic syndrome / HUS* pada manusia. Dalam penelitian ini dipelajari hubungan antara tingkat cemaran dan insidensi *Coliform, E. coli, E. coli* O157 dan *E.coli* O157:H7 pada daging sapi. Bakteri pertama ditumbuhkan pada media EMBA, selanjutnya dipupuk pada media SMAC dan diakhiri dengan uji aglutinasi lateks untuk memastikan keberadaan bakteri *E.coli* O157 dan uji antiserum H7 untuk memastikan isolat yang diisolasi merupakan isolat *E.coli* O157:H7. Hasil isolasi dan identifikasi terhadap 89 sampel daging sapi diperoleh hasil rata-rata tingkat cemaran *Coliform* dan *E.coli* sebesar $93{,}01 \pm 2{,}64 \times 10^3$ cfu/g dan $47{,}82 \pm 32{,}34 \times 10^2$ cfu/g. Pengujian dengan Spearman's rho menunjukkan bahwa tingkat cemaran *Coliform* menunjukkan adanya korelasi yang lemah ($P>0.05$) terhadap munculnya cemaran *E.coli, E.coli O157* maupun terhadap *E.coli O157 : H7* dan baru terlihat adanya korelasi yang sangat kuat ($P<0.01$) bilamana telah berhasil ditemukan bakteri *E.coli* dengan kemunculan *E.coli O157* maupun *E.coli O157:H7*. Pengujian dengan uji Wilcoxon menunjukkan tingkat cemaran bakteri *coliform* sangat nyata ($P<0.01$) lebih besar jika dibandingkan dengan tingkat cemaran *Coliform, E.coli, E.coli* O157 dan *E.coli* O157:H7.

Kata-kata kunci : *Coliform, E.coli, E. coli* O157:H7, daging sapi

J Vet 2007 8 (1) : 16-23

ABSTRACT

The food safety is an important for both consumers and industries. *Coliform* and *Escherichia coli* have been used as sanitary indicator of food processing industries. The detection of foodborne pathogens, including those capable of infecting human such as *Escherichia coli* O157:H7 have also been conducted. The bacteria produce toxin konown as Shiga toxin which can cause bloody diarrhea to more serious clinical conditions such as hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. In the this study the correlation of contamination levels with incidence of *Coliform, E.coli, E.coli O157* and *O157:H7* in beef were examined. The bacteria were firstly cultured in Eosin Methylene Blue Agar (EMBA) medium, then in Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) medium and finally tested by Latex agglutination test to confirm the presence of *E.coli O157*. A complete assay was carried by H7 antiserum for the presence of *E.coli* O157:H7. From 89 beef samples examined, it was shown that the average of *Coliform* and *E.coli* contaminations were $93{,}01 \pm 2{,}64 \times 10^3$ cfu/g and $47{,}82 \pm 32{,}34 \times 10^2$cfu/g repectively. Analysis by Spearman's rho test indicated that there was not significant ($P>0.05$) correlation between *Coliform* contamination levels and the presence of *E.coli, E.coli O157* and *O157:H7*. On the other hand, *E.coli* contamination levels correlated significantly ($P<0.01$) with the presence of *E.coli O157* and *E.coli O157:H7*. Wilcoxon test indicated the percentage of *Coliform* was significantly higher ($P<0.01$) than the percentage *E.coli, E.coli O157* and *E.coli O157 : H7* contamination.

Key words : *Coliform, E.coli, E. coli* O157:H7, beef.

J Vet 2007 8 (1) : 16-23

PENDAHULUAN

Sebagai kuman patogen, *Escherichia coli* sangat terkenal karena kemampuannya menyebabkan penyakit saluran cerna pada manusia. Lima kelas (virotipe) *E. coli* meliputi virotipe *enteropathogenic E.coli* (EPEC), *entero-agregative E.coli* (EaggEC), *enteroinvasive E. coli* (EIEC), *enterotoxigenic E.coli* (ETEC) dan *enterohemorrhagic E.coli* (EHEC) dan setiap virotipe memiliki ciri-ciri patogenitas tersendiri (Todar, 1997). EHEC memiliki daya invasi yang *moderat* (biasa). Tidak memiliki antigen kolonisasi, tetapi fimbrienya diduga berperan besar dalam menginvasi inang. Bakteri ini tidak menyerang mukosa sel seperti *Shigella*, tetapi strain EHEC menghasilkan toksin yang identik dengan toksin dari *Shigella dysentriae* type 1 sehingga dikenal sebagai *Shiga* toksin atau istilah *Verocytotoxin Escherichia coli* (VTEC) (Heuvelink *et al.*, 1999; Acheson, 2000).

Salah satu strain EHEC yang bersifat zoonosis adalah serotipe O157:H7. Penyidikan epidemiologis menunjukkan bahwa sapi, kambing, domba, babi, ayam, anjing dan kucing sering membawa VTEC O157 dalam tinjanya dan merupakan sumber infeksi (Beutin *et al.*, 1993). Armstrong *et al.*, (1996) menyatakan bahwa sapi merupakan *reservoir* utama dari VTEC O157 dan dipercaya bahwa tinja sapi merupakan sumber infeksi pada manusia. Di Amerika Serikat EHEC belakangan ini dilaporkan sebagai penyebab penyakit yang serius pada manusia dengan tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi terutama pada anak-anak. Gejala klinis yang dapat diamati adalah diare biasa sampai berdarah, *colitis hemorrhagic* dan *hemolytic uremic syndrome* (HUS). HUS menyebabkan 5-10% kematian dan menimbulkan kerusakan yang nyata pada saluran ginjal pasien.

Mengingat EHEC merupakan bakteri yang amat penting pada manusia dan sapi diduga sebagai hewan pembawa kuman ini, maka dilakukan penelitian tentang *E.coli O157:H7* dalam tinja sapi di Kabupaten Badung Propinsi Bali, serta hubungan antara tingkat infeksi *Coliform*, *E.coli*, *E.coli* O157 dan *E.coli* O157:H7 pada daging sapi.

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel

Sampel daging sapi diambil dari Rumah Pemotongan Hewan (RPH) Pesanggaran, Mambal, Pasar Kereneng dan Pasar Badung. Sampel selanjutnya dibawa dengan termos isi es untuk analisis laboratorik di laboratorium Kesmavet FKH-Unud dan uji isolasi *E.coli* O157 dan *E.coli* O157:H7.) dilakukan di Laboratorium Kesmavet FKH-UGM.

Berdasarkan estimasi prevalensi kejadian penyakit sebesar 5% dan *error* 5%, maka jumlah sampel yang diperlukan untuk tingkat kepercayaan 95% adalah minimal 76 sampel namun dalam penelitian ini digunakan sebanyak 89 sampel (Martin *et al.*, 1987).

Isolasi dan Identifikasi

Pemeriksaan *Coliform* dan *E.coli*

Untuk pemeriksaan *Coliform* maupun *E. coli*, sampel daging terlebih dahulu digerus dan diencerkan dengan larutan *buffered peptone water* dengan perbandingan 1:9, selanjutnya dilakukan pengenceran secara berseri, untuk selanjutnya dari pengenceran yang diinginkan (10^2 dan 10^3) banyak 0,1 ml ditanam pada 15 ml media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) dengan metode sebar, selanjutnya semua koloni yang tumbuh setelah diinkubasikan pada suhu 37ºC selama 24 jam dihitung dengan *Quebec colony counter*. Koloni yang tumbuh dengan warna hijau metalik dengan titik hitam pada bagian tengahnya dihitung dan diidentifikasi sebagai koloni *E.coli*, sedangkan koloni lainnya diidentifikasi sebagai koloni *Coliform*. Koloni *E.coli* yang tumbuh dikoleksi dengan diinokulasikan pada media nutrient agar miring untuk pemeriksaan selanjutnya (Fardiaz, 1990).

Pemeriksaan *Fecal coli*

Dari media EMBA yang positip dilanjutkan dengan uji *Indol* (SIM), *Methyl Red, Voges Proskauer* dan *Citrate* (IMVIC) dengan menginokulasikan masing-masing satu ose kedalam tabung yang berisi *Tryptone Broth* untuk uji Indol, MR-VP Medium untuk uji *Methyl Red* dan *Voges Proskauer* serta kedalam *Koser Citrate Medium* untuk uji penggunaan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon. Semua tabung diinkubasikan pada suhu 35^{0}C selama 2 hari, kecuali medium MR-VP untuk uji *Methyl Red* (dengan waktu inkubasi 5-7 hari). Setelah itu dari tabung positip pada uji IMVIC diambil satu *ose* dan diinokulasikan pada media *nutrient* agar miring untuk pemeriksaan selanjutnya (Fardiaz, 1990).

Identifikasi Serotipe *E. coli* O157

Hasil positip dari media EMBA setelah dilanjutkan dengan uji-uji IMVIC yang ditanam pada media nutrient agar miring, diinokulasikan pada media selektif *Sorbitol MacConkey Agar* (SMAC). Setelah diinkubasikan pada suhu 37^{0}C selama 20 – 24 jam dideteksi adanya *E.coli O157* dengan ciri-ciri koloni jernih, tidak berwarna atau (Sorbitol negatif) (Oxoid, 1998).

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

Untuk konfirmasi yang lebih meyakinkan bahwa koloni tersebut adalah *E.coli O157,* maka diuji lebih lanjut dengan menggunakan *E.coli O157 Latex Agglutination Test* (Oxoid DR620 M) dengan cara mengencerkan 1 *loop* koloni bakteri dengan 1 tetes NaCl fisiologis untuk selanjutnya direaksikan dengan 1 tetes pereaksi lateks. Hasil uji positip ditandai dengan terbentuknya presipitasi sesuai dengan kontrol positip (DR 623M), serta dibandingkan juga dengan kontrol negatif (DR 624M). (Oxoid, 1998).

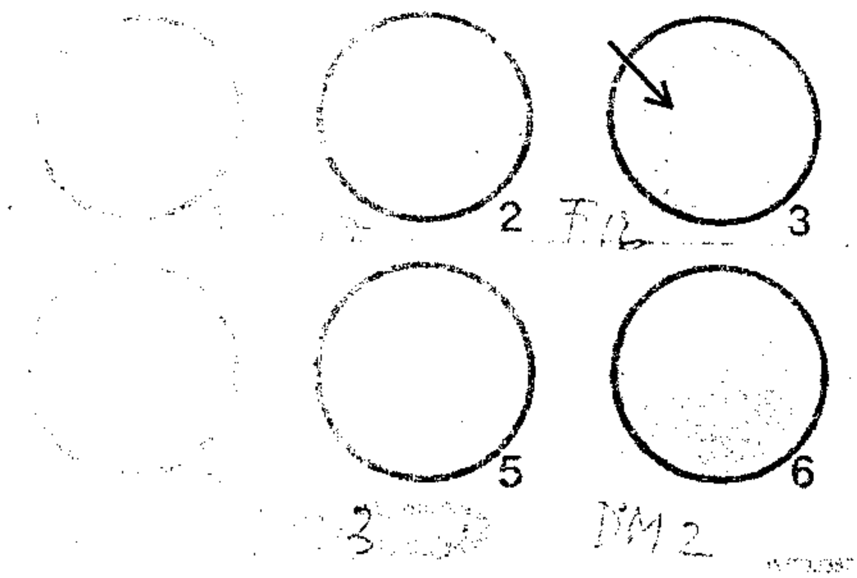
Uji Serologis *E.coli* O157:H7 dengan Antiserum H7

Pengujian untuk melihat antigen *fagella* H7, dilakukan dengan cara uji aglutinasi dengan antiserum H7 (Difco™ *E.coli* Antisera), dengan terlebih dahulu dilakukan penumbuhan pada media *motility* dengan cara menanam koloni bakteri pada media *motility* dengan 2 kali *pasase* berturut-turut, untuk selanjutnya dilakukan pembiakan pada media BHI cair (*Brain Heart Infusion broth*) dengan suhu inkubasi 35$\pm$2 ^{0}C selama 18-24 jam. Selanjutnya koloni yang tumbuh diinaktivasi dengan menggunakan formalin 0,3%. Langkah selanjutnya adalah mempersiapkan larutan Difco *E.coli* H7 antiserum H7 1 : 500 untuk digunakan sebagai sumber antibodi. Ambil 0,5 ml biakan bakteri ditambah 0,5 ml antiserum dan dicampur secara merata. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu 50$\pm$2 ^{0}C selama 24 jam. Hasil yang positip ditunjukkan dengan terjadinya aglutinasi >25% dari jumlah sel, dan adanya kekeruhan pada bagian supernatant cairan (BD Difco, 2003).

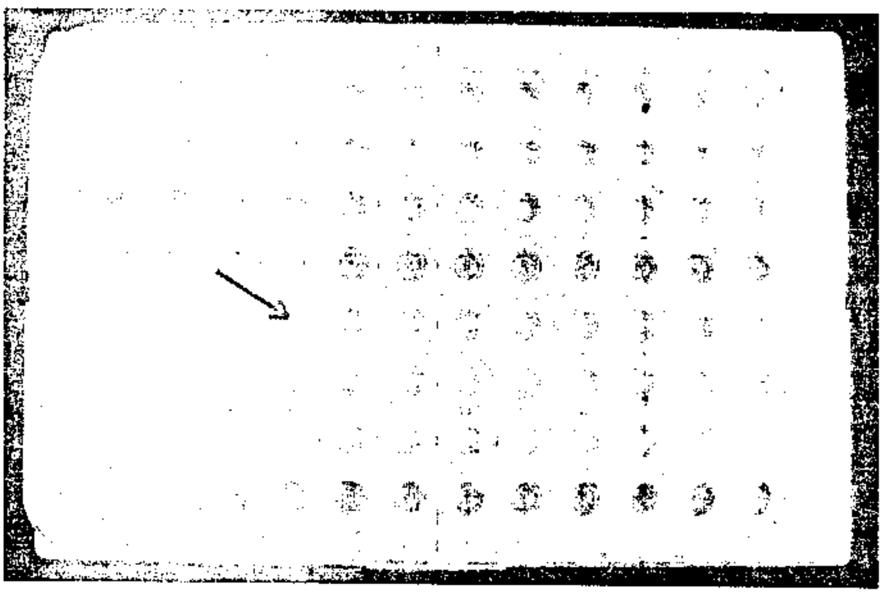
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi dan Identifikasi Coliform, *E.coli*, *E.coli* O157 dan *E.coli* O157:H7

Hasil isolasi dan identifikasi *Coliform* dan *E.coli* pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) menun-jukkan bahwa koloni *E.coli* berwarna hijau metalik dengan titik hitam dibagian tengahnya, dengan diameter 2-3 mm. Hasil isolasi menunjukkan bahwa dari 89 sampel daging yang diperiksa ternyata seluruh sampel (89 sampel) positif tercemar *Coliform*, 18 sampel positif *E.coli* dengan tingkat cemaran masing masing sebesar $93{,}01 \pm 2{,}64 \times 10^3$ cfu/g dan $47{,}82 \pm 32{,}34 \times 10^2$cfu/g. Pengujian lebih lanjut untuk



Gambar 1. Isolat yang Menunjukkan Hasil Uji Positif *E.coli* O157 pada Uji Latex



Gambar 2. Isolat yang Menunjukkan Hasil Uji Positif *E.coli* O157:H7 dengan Antiserum Flagella H7

mendeteksi kehadiran *E.coli* patogen yakni *E.coli* O157 dan *E.coli* O157:H7 menunjukkan bahwa sebanyak 11 isolat positif *E.coli* O157 (Gambar 1) dan 5 isolat positif *E.coli* O157:H7 (Gambar 2).

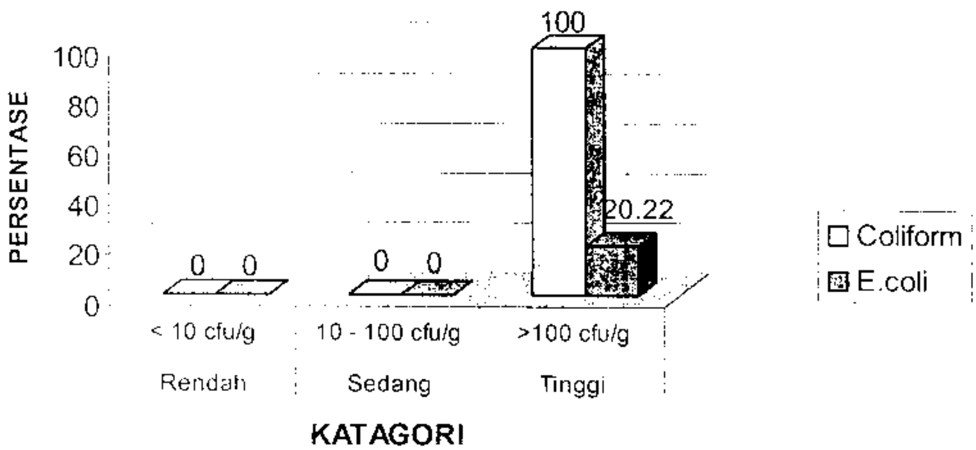
Gambar 1 menunjukkan bahwa isolat nomor 3 dan 4 memperlihatkan adanya presipitasi pada kertas Lateks setelah sebelumnya ditanam pada media *Sorbitol McConkey Agar* (SMAC). Hasil pengujian ini meneguhkan bahwa isolat yang diuji adalah *E.coli* O157.

Gambar 2 menunjukkan bahwa isolat *E.coli* O157 memperlihatkan adanya presipitasi pada plate sebagai hasil reaksi antigen dengan antibodi. Hasil reaksi ini menunjukkan bahwa isolat yang diuji merupakan serotipe *E.coli* O157:H7.

Persentase Perbandingan *Coliform* dan *E.coli* pada Daging Sapi

Persentase perbandingan *Coliform* dan *E.coli* dari 89 sampel daging yang diuji seperti tersaji pada Gambar 3.

Dari Gambar 3 terlihat bahwa dari seluruh sampel yang diuji, berhasil ditemukan adanya bakteri *Coliform* (100%) sedangkan cemaran *E.coli* sebesar 20,22%. Pengujian lebih lanjut dengan uji Wilcoxon menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata (P<0,01) antara tingkat cemaran *Coliform* dan cemaran *E.coli*. Setelah diklasifikasikan berdasarkan atas katagorinya ternyata jumlah cemaran *Coliform* termasuk kedalam katagori cemaran tinggi (>100 cfu/g) begitu pula halnya dengan cemaran *E.coli*. Adanya kontaminasi yang cukup tinggi dari bakteri *Coliform* maupun *E.coli* pada daging sapi, terkait erat dengan masih rendahnya masalah sanitasi dalam proses penanganan daging. Berdasarkan atas hasil pemantauan peneliti selama proses penelitian, penanganan daging di RPH baik RPH Mambal maupun Pesanggaran, sapi-sapi yang dipotong sebelum proses pemotongan tidak dibersihkan secara sempurna, tinja sapi masih terlihat menempel pada permukaan kulit, bahkan proses pemotongan di RPH Mambal dilakukan di lantai (tidak digantung). Proses penyiapan daging di pasar-pasar juga kurang memperhatikan aspek sanitasi dan *hygiene*, karena daging-daging yang dipersiapkan untuk dijual oleh pedagang tidak ditutup dan disimpan dalam suhu kamar (tidak pada suhu dingin), dan akibat dari suhu penyimpanan ini akan berdampak pada perkembangbiakan bakteri secara cepat. Soeparno (2005) menyatakan bahwa selain faktor nutrisi, pertumbuhan



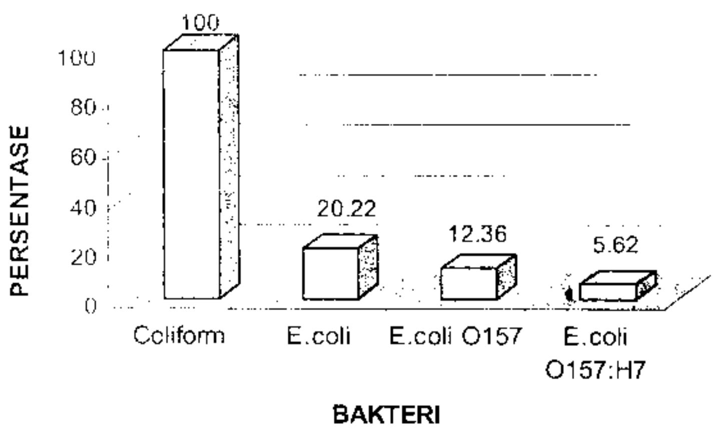
Gambar 3. Persentase Perbandingan *Coliform* dan *E.coli* pada Daging Sapi

mikroorganisme dalam daging juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan khususnya temperatur. *Coliform* ataupun *E.coli* sebagai mikroorganisme *mesophilik* akan tumbuh secara optimal pada suhu 25°C – 40°C.

Persentase Perbandingan antara Kemunculan Coliform, *E.coli*, *E.coli* O157 dan *E.coli* O157:H7 pada Daging Sapi

Persentase perbandingan kemunculan antara *coliform*, *E.coli* dengan kehadiran virotipe *enterohaemorrhagic* khususnya dari serotipe *E.coli* O157 dan *E.coli* O157:H7 tersaji pada Gambar 4.

Data pada Gambar 4 menunjukkan bahwa dari seluruh sampel positif *Coliform* (100%) ternyata 22% positif ditemukan spesies *E.coli*. Dari seluruh sampel (89 sampel) juga berhasil dideteksi serotipe *E.coli* patogen yakni *E.coli* O157 sebesar 12,36% dan *E.coli* O157:H7 sebesar 5,62%. Pengujian lebih lanjut dengan uji korelasi *Spearman's rho* terlihat bahwa tingkat cemaran *Coliform* menunjukkan adanya korelasi yang lemah (P>0.05) terhadap kemunculan *E.coli*, *E.coli O157* maupun terhadap *E.coli O157 : H7*, dengan nilai korelasi *Spearman's rho* masing-masing 0,40, 0,25 dan –0,174. Hasil uji korelsi ini menunjukkan bahwa kehadiran *Coliform* pada daging sapi yang diperiksa, tidak dapat memprediksi kehadiran *E.coli*, *E.coli* O157 terlebih lagi *E.coli* O157:H7. Sementara itu kehadiran *E.coli* baru menunjukkan adanya korelasi yang sangat kuat (P<0.01) terhadap kehadiran *E.coli O157* maupun *E.coli O157:H7* dengan nilai koefisien *rho* masing-masing sebesar 0,711 dan 0,474. Begitu juga halrya untuk *E.coli* O157 dengan *E.coli* O157:H7, menunjukkan adanya hubungan yang sangat kuat (P<0.01) dengan nilai koefisien rho sebesar 0,650. Hasil uji *Spearman* ini menunjukkan bahwa kehadiran cemaran *E.coli* O157 maupun *E.coli* O157:H7 pada daging sapi, akan terkait erat dengan ditemukannya bakteri *E.coli* atau dengan kata lain, adanya cemaran *E.coli* pada daging dapat memberikan kontribusi yang sangat besar untuk ditemukannya *E.coli enteropathogenic* seperti *E.coli* O157:H7. Cukup tingginya persentase kehadiran cemaran *E.coli* khususnya *E.coli O157 : H7* pada daging sapi, mengindikasikan bahwa daging sapi mutlak diwaspadai sebagai sumber penularan STEC (*Shiga toxin Escherichia coli*).



Gambar 4. Persentase Perbandingan antara Kemunculan Bakteri Coliform, *E.coli*, *E.coli O157* dan *E.coli O157 : H7* pada Daging Sapi

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Hasil isolasi dan identifikasi menunjukkan bahwa kehadiran serotipe *E. coli* patogen yakni *E.coli* O157:H7 pada daging sapi di Kabupaten Badung, Propinsi Bali adalah sebesar : 5,62%. Kehadiran serotipe ini cukup kuat ditunjukkan oleh kehadiran spesies *E.coli* pada produk daging yang diuji, mengingat cemaran *E.coli* yang ditemukan termasuk dalam katagori cemaran tinggi (>100 cfu/g).

Saran

Perlu dilakukan tindakan sanitasi dan higiene yang lebih baik sebagai upaya mengurangi munculnya serotipe patogen *E.coli* O157:H7 pada daging sapi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada pihak Dirjen DIKTI yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Hibah Pekerti (Angkatan III) tahun 2005.

DAFTAR PUSTAKA

Acheson, D.W.K., 2000. How Does *Escherichia coli* O157:H7 Testing in Meat Compare with What We Are Seeing Clinically ?. *J. Food Protection*. 63 (6) : 819-821.

Anonimous. 1998. *Food Borne Pathogens Monograph Number 5. Escherichia coli. Shigella Species*. D.E.Post. Technical Support Manager. Oxoid.

Armstrong, G.L., J.Hollingsworth, and J.G. Morris, Jr. 1996. Emerging Foodborne Pathogens : *Escherichia coli* O157:H7 as a Model of Entry of a New Pathogen into The Food Supply of The Developed World. *Epidemiol.Rev.* 18 : 29-51.

Atalla, H.N., R. Johnson, S. McEwen, R.W. Usborne and C.L. Gyles. 2000. Use of Shiga Toxin (Stx) Enzyme Linked Immunosorbent Assay and Immuno-blot for Detection and Isolation of Stx Producing *Escherichia coli* from Naturally Contaminated Beef. ?. *J. Food Protection*. 63 (9) : 1167-1172..

Beutin, L., D.Geier, H.Steinruck, S. Zimmermann, and F.Scheutz, 1993. Prevalence and Some Properties of Verotoxin (*Shiga like toxin*)-producing *Escherichia coli* in Seven Different Species of Healthy Domestic Animals. *J.Clin. Microbiol*. 31(9) : 2483-2488.

Difco. 2003. *BD DifcoTM E.coli Antisera*. Becton, Dickinson and Company 7 Loventon Circle Sparks, Maryland 21152 USA.

Fardiaz, S., 1990. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Diraktorat Jenderal Pendidikan Tinggi PAU Pangan dan Gizi. Institiut Pertanian Bogor. Hal.184

Heuvelink, A.E., J.T.M. Zwartkruis Nahuis, R.R.Beumer and E.D.Boer, 1999. Occurrence and Survival of Verocytotoxin Producing *Escherichia coli* O157 in Meats Obtained from Retail Outlets in The Netherlands. *J. Food Protection*. 62 (10) : 1115-1121.

Martin, S.W., A. Meek, and P.Willeberg, 1987. *Veterinary Epidemiology*. Ames. Iowa: Iowa State University Press.

Oxoid. 1998. *The Oxoid Manual*. 8th Ed. Compiled by E.Y.Bridson (former Technical Director of Oxoid).

Soeparno. 2005. *Ilmu dan Teknologi Daging*. Gajah Mada University Press.

Todar, K., 1997. Bacteriology 330 Lecture Topics : Pathogenic *E. coli*. University of Wisconsin Department of Bacteriology. http // www . bact . wisc.edu / Bact 330 / Lecturecoli.