

Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* O157:H7 Pada Feses Penderita Diare dengan Metode Kultur dan PCR

Vincentia Ade Rizky¹, Sa'adah Siregar¹, Visensius Krisdianilo¹, Asvia Rahayu¹, Suventi Syafrina Ginting¹, Kartini¹

Fakultas Farmasi, Institut Kesehatan Medistra Lubuk Pakam, Jalan Sudirman
No. 38 Lubuk Pakam

e-mail: vincentiarizky@gmail.com

DOI 10.35451/jfm.v3i2.615

Abstract

Escherichia coli O157: H7 is the main cause of foodborne disease in several countries, one of which is diarrhea. The problem that often occurs in Indonesia that requires treatment and study from various aspects is Diarrhea. The conventional method of laboratory examination such as culture is a method that is often carried out, but in making the diagnosis requires a long time, the number of samples is large, and the results are less accurate because contamination can occur. Another more accurate technique for detection *E. coli* O157: H7 is the PCR technique. This study aims to identify the *Escherichia coli* O157: H7 bacteria by culture method and PCR. The results showed that the culture method and PCR of 8 isolated samples 4 showed positive results for the bacteria *E. coli* O157: H7. However, the PCR method is more selective and the time used is faster than the culture method.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, PCR, Culture method

1. PENDAHULUAN

Infeksi merupakan penyebab utama penyakit di dunia terutama di daerah tropis, seperti Indonesia (Hermayudi & Ayu, 2017). Agen penyebab infeksi antara lain bakteri *Escherichia coli* yang merupakan bakteri komensal atau flora normal di peritoneum atau usus bagian bawah (Elliott *et al.*, 2013). Bakteri *E. coli* akan bersifat patogen apabila berada ditempat yang bukan habitatnya (Brooks *et al.*, 2005).

Bakteri *E. coli* dapat mengeluarkan racun sehingga menjadi patogen dan

menyebabkan penyakit. Bakteri *E. coli* dapat memproduksi racun yang dapat menimbulkan penyakit, salah satu racun yang paling sering teridentifikasi adalah Shiga Toxinproducing *Escherichia coli* (STEC) yaitu pada bakteri *E. Coli* serotype O157:H7. (Jawetz *et al.*, 2010; Rananda *et al.*, 2016).

Bakteri *E. coli* O157:H7 merupakan penyebab utama *foodborne disease* di beberapa negara. Berdasarkan laporan dari CDC tentang insiden infeksi *Escherichia coli* O157:H7 menyatakan bahwa 8.598 kasus pada 49 negara terserang wabah penyakit

yang disebabkan oleh bakteri ini. Sebanyak 1.493 (17%) kasus, penderit masuk rumah sakit, 254 (4%) penderita teridentifikasi mengalami HUS (*Hemolytic Uremic Syndrome*), dan 40 (0,5%) kasus penderita meninggal. Selain itu di negara Prancis, terdapat 69 orang terinfeksi bakteri *E. coli* O157:H7 dan 17 orang menderita HUS. Kasus HUS di Argentina berhubungan dengan infeksi bakteri *E. coli* O157:H7 yang mencapai 400 kasus per tahunnya. Penelitian sebelumnya oleh Sartika et al. (2005) yang menunjukkan bahwa daging sapi (100%) dan susu sapi (73%) terkontaminasi oleh bakteri *E. coli* O157:H7 yang kemudian dikonsumsi oleh manusia sehingga menyebabkan penyakit diare.

Pada manusia, infeksi akibat bakteri jenis ini ada yang tidak menimbulkan gejala (asimtomatis) ataupun timbul gejala berupa diare berdarah ataupun diare tanpa darah (Dutta et al., 2011; Peter et al., 2011).

Pemeriksaan laboratorium metode konvensional seperti kultur merupakan metode yang sering dilakukan, akan tetapi dalam menegakan diagnosa butuh waktu dan umlah sampel yang banyak, serta hasil kurang akurat karena dapat terjadi kontaminasi. Teknik lain yang lebih akurat untuk mendeteksi *E. coli* O157:H7 adalah dengan teknik PCR.

Penelitian sebelumnya Bakri et al., (2010) menyatakan bahwa pasien ana (0-14 tahun) yang menderita diare dari kultur teridentifikasi sebanyak 21,42% bakteri *E.coli* O157:H7 dan 46,43% menggunakan PCR. Maka dari itu peneliti ingin meneliti kembali tentang deteksi bakteri *E. coli* O157:H7 metode kultur dan PCR.

2. METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah Penelitian Experimental yang dilakukan di Lab. Mikrobiologi dan Biologi Molekuler Institut Kesehatan Medistra Lubuk Pakam pada bulan November 2020. Sampel penelitian ialah feses penderita diare.

Alat - alat yang digunakan antara lain tabung reaksi, Erlenmeyer, gelas ukur, cawan petri, batang ose, rak tabung, bunsen, kapas steril, Laminal Air Flow, timbangan analitik, neraca analitik, kulkas, perangkat uv, elektroforesis, PCR, spin column, mini cup, dll. Bahan - bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesimen medium transport Cary-Blair, BHIB, NA, SSA, Sorbitol Mac Conkey Agar, media Peptone Water (indol), media Methyl Red-Voges Proskauer, media simons citrate, reagen kit QIAmp, dll.

Kultur Bakteri

Sampel dalam medium transport Carry-Blair diinokulasikan ke medium pengaya (media BHIB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Selanjutnya sebanyak 1 ose kemudian diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi media NA, SSA, Sorbitol Mac Conkey Agar (SMCA) selanjutnya dinkubasi ±18-24 jam pada suhu 37°C kemudian diamati pertumbuhannya.

Bakteri yang telah tumbuh pada media isolasi yaitu dengan pemeriksaan secara mikroskopis untuk menentukan sifat atau ciri hasil kultur pada media bakteri dan dilanjutkan dengan uji biokimia.

Uji Mikroskopis

Identifikasi mikroskopis dengan cara membuat sediaan kemudian dilakukan pewarnaan gram. Bakteri berwarna merah merupakan Bakteri Gram (-) serta bakteri berwarna ungu adalah bakteri Gram (+).

Uji Biokimia

Identifikasi bakteri dilanjutkan dengan tes biokimia IMVIC yaitu pengujian pada media Indol Metil Red (MR), Vogas Proskauer (VP), dan uji sitrat. Media ini ditanam bakteri kemudian dinkubasi pada suhu 37°C ±18-24 jam. Kemudian dilakukan identifikasi bakteri untuk lebih memastikan bahwa yang tumbuh adalah bakteri tersebut, dan pengamatannya disesuaikan dengan rujukan buku.

Identifikasi Molekuler

Sebanyak 100 µl isolate bakteri *E. coli* positif pada media cair dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf sebanyak 2 mL kemudian dilakukan centrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit pada suhu 5°C. Massa sel yang diperoleh selanjutnya ditambahkan TE buffer pH 8, dan dilakukan pelisisan dengan menggunakan larutan yang mengandung 1% Triton X-100 (Sigma) dalam buffer TE pH 8. Proses ini dilakukan dengan pemanasan pada air mendidih selama 15 menit dan selanjutnya dibekukan dengan cara disimpan pada suhu 20°C selama 15 menit. Lakukan proses Pemanasan dan pembekuan sebanyak 3 kali pengulangan. Primer yang digunakan adalah shiga like toxin tipe I (Stx1): LP-30: CAG TTA ATG TGG TGG CGA AGG dan LP-31: CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG: shiga like toxin tipe II (Stx2) dengan pasangan primer LP43: ATC CTA TTC CCG GGA GTT TACG dengan LP-44: GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C

dengan ukuran produk PCR yang akan dihasilkan untuk gen stx1 dan stx2 berturut-turut 348bp dan 584bp. Proses PCR diperoleh dari larutan dengan volume total 12,5 µl yang terdiri dari dNTPs 10 mM, primer forward sebanyak 25 nmol dan reserve 25 nmol, Buffer II 1x, MgCl₂ 75 mM, Amplitaq 0,45 U dan DNA sebanyak 1 µl. Tahapan amplifikasi meliputi 1x Siklus pada suhu 94°C selama 5 menit, lalu 40x Siklus suhu 94°C selama 30 detik, dan 48°C selama 30 detik dan 72 °C selama 30 detik. Terakhir 1x Siklus 72 °C selama 5 ment.

Hasil dari amplifikasi PCR selanjutnya dilakukan elektroforesis menggunakan 1% agarose dan TAE Buffer. Kemudian ditambahkan pewarna EtBr. Selanjutnya divisualisasikan dengan sinar UV illuminator dan didokumentasikan.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

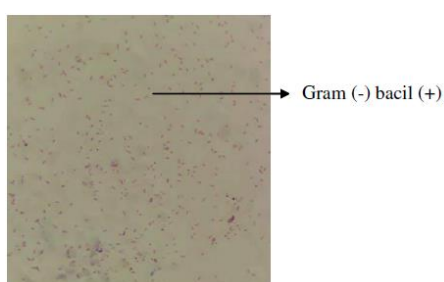
Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan secara kultur, didapatkan bahwa dari ke-8 sampel yang dilakukan pemeriksaan didapatkan hasil positif *Escherichia coli* O157:H7 sebanyak 4 sampel. Hal ini ditunjukkans pada tabel 1 dari hasil pemeriksaan mikroskopis dan biokimia yang selanjutnya dibandingkan dalam buku *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Mikroskopis dan Biokimia

Sampe l	Mikroskopi s	SMCA	Uji Biokimia			
			Indo l	M R	V P	S C
F2	Gram (-) Bacil (+)	Jernih (tidak Berwarna)	+	+	-	-
F3	Gram (-) Bacil (+)	Jernih (tidak Berwarna)	+	+	-	-
F4	Gram (-) Bacil (+)	Jernih (tidak Berwarna)	+	+	-	-

F5	Gram (-) Bacil (+)	Jernih (tidak Berwarna)	+	+	-	-
F6	Gram (-) Bacil (+)	Berwarna Merah Muda	-	-	+	+
F7	Gram (-) Bacil (+)	Berwarna Merah Muda	+	-	+	-
F8	Gram (-) Bacil (+)	Berwarna Merah Muda	-	-	-	+
F9	Gram (-) Bacil (+)	Berwarna Merah Muda	+	+	-	-

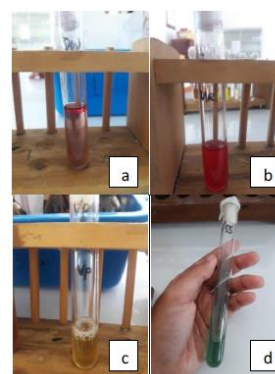
Identifikasi secara mikroskopis yang ditunjukkan pada gambar 1 ditemukan bakteri gram (-) bacil (+) yang artinya bakteri berbentuk batang pendek lurus (cocobacil) berwarna merah. Hal ini dinyatakan pula dalam penelitian Jaipah *et al.*, (2017) bahwa bakteri *Escherichia coli* adalah bakteri gram (-) berbentuk batang pendek lurus atau disebut juga dengan kokobasil. Pada saat dilakukan pewarnaan gram, bakteri *E. coli* tidak menyerap warna kristal violet, melainkan menyerap warna merah dari safranin (Rizky, 2018).



Gambar 1. Hasil Mikroskopis Sampel F2

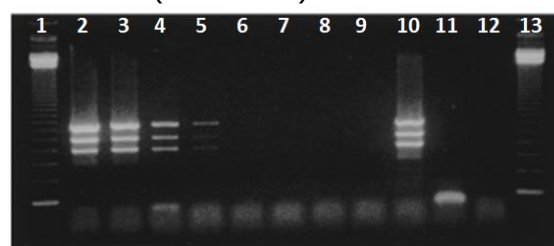
Pemeriksaan mikroskopis tidak cukup untuk mengidentifikasi bakteri *Escherichia coli* O157:H7, maka dari itu dilakukan uji SMCA dan biokimia sebagai uji konfirmasi. Berdasarkan hasil penelitian uji biokimia (gambar 2) dan SMCA terdapat 4 sampel yang

menunjukkan bahwa sampel tersebut teridentifikasi bakteri *E. coli* O157:H7. Hal ini didasarkan pada hasil penelitian uji biokimia dan SMCA yang secara berturut menunjukkan hasil : Indol (+), MR (+), VP (-), Simons citrate (-), dan SMCA jernih. Hasil dari media SMCA menunjukkan koloni berwarna jernih yang menandakan bahwa bakteri tersebut tidak dapat memfermentasi sorbitol dan bersifat motil (O157:H7). Kultur SMCA merupakan media yang digunakan untuk mengidentifikasi *E. coli* serotiper O157:H7. Sorbitol digunakan sebagai penanda atau media isolasi utama dalam mendeteksi bakteri jenis ini (Hidayati *et al.*, 2018)



Gambar 2. Hasil Uji Biokimia Sampel F2 yang secara berurut: a) Uji Indol; b) Uji Methyl Red (MR); c) Uji Voges Proskauer (VP); d) Uji Simon's Citrate

Hasil uji PCR pada pita fragmen dengan ukuran 123 bp menunjukkan bahwa sampel F2, F3, F4 dan F5 terdapat bakteri *Escherichia coli* O157:H7, sedangkan pada sampel yang lain tidak ditemukan bakteri ini (Gambar 3).



Gambar 3. Hasil Pemeriksaan Elektroforesis yang menunjukkan amplifikasi DNA multipleks PCR yang telah diekstraksi, secara berurut: Jalur 1&13 Marker DNA 123-bp; Jalur 2-9 Sampel; Jalur 10 Positif kontrol strain *Escherichia coli* O157:H7; Jalur 11 Negatif kontrol *Escherichia coli* ATCC 25922.

Hasil pemeriksaan PCR telah terbukti spesifik dalam mendeteksi bakteri *E. coli* serotipe O157:H7. Metode PCR merupakan salah satu metode molekuler yang telah banyak menjadi pilihan klinis beberapa tahun terakhir. Metode ini memiliki tingkat sensitivitas yang sama atau lebih besar dari pemeriksaan kultur. Pada penelitian ini metode PCR dengan menggunakan primer *Escherichia coli* O157:H7 mampu mendeteksi keberadaan bakteri ini dengan waktu yang lebih cepat yaitu selama 1 hari, sedangkan metode kultur membutuhkan waktu yang cukup lama yaitu sekitar 5-6 hari. Hal ini sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan Morin *et al.*, (2004) yang melaporkan bahwa deteksi bakteri *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio Cholera* dan *Salmonella typhi* menggunakan metode PCR mampu mendeteksi dan mengidentifikasi bakteri patogen baik pada sampel klinik, air, maupun makanan (Jayanti, 2018).

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan dibandingkan dengan penelitian lain dapat disimpulkan bahwa teknik identifikasi bakteri *Escherichia coli* O157:H7 dalam feses penderita diare dengan menggunakan metode molekuler yaitu PCR sudah terbukti lebih sensitif dan hasil yang dikeluarkan relative cepat namun dengan biaya yang

mahal jika dibandingkan dengan metode konvensional. Oleh karena itu dapat direkomendasikan dan digunakan oleh tenaga kesehatan dalam mendeteksi dini sehingga akan membantu penegakan diagnosa lebih cepat dan menentukan pengobatan secara lebih efektif.

DAFTAR PUSTAKA

- Bakri Z, Hatta M & Nasrum M. (2010). DETEKSI KEBERADAAN BAKTERI *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 PADA FESES PENDERITA DIARE DENGAN METODE KULTUR DAN PCR. *JST Kesehatan*; (5), 2:184-192
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA (2005). *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, dan Adelberg. Edi Nugroho (alih bahasa)*. Jakarta : Salemba Medika
- Dutta T.K., Roychoudhury S.P., Bandyopadhyay Wani S.A., and I. Hussain. (2011). DETECTION AND CHARACTERIZATION OF SHIGA TOXIN PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* (STEC) & ENTEROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* (EPEC) IN POULTRY BIRDS WITH DIARRHOEA. *Indian J. Med. Res*; 133: 541-545.
- Elliott T, Worthington T, Osman H, Gill M (2013). *Mikrobiologi Kedokteran & Infeksi Edisi 4*. Jakarta : EGC
- Hermayudi dan Ayu, P.A. (2017). *Penyakit daerah tropis*. Yogyakarta: 2017.
- Hidayatu W., Temaja I.G.R.M., dan Fatmawati N.N.D. (2018). KARAKTERISTIK FENOTIP ISOLAT KLINIK *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 PADA MEDIA SORBITOL MAC CONKEY AGAR (SMAC). *J. Agric.Sci. and Biotechnol*, 7 (1).
- Jaipah N, Saraswati I, Hapsari R (2017). UJI EFEKTIFITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK BIJI

- PEPAYA (*CARICA PAPAYA L.*) TERHADAP PERTUMBUHAN *ESCHERICHIA COLI* SECARA IN VITRO. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*, ISSN : 2540 – 8844, 6 (2)
- Jawetz, M. A. (2010). *Mikrobiologi Kedokteran. (25 ed)*. (G. F. Brooks, K. C. Carroll, J. S. Butel, S. A. Morse, T. A. Mietzner, Penyunt, A. W. Nugroho, D. Ramadhani, H. Santasa, N. Yasdelita, & K. W. Nimala, penerj). New York: Mc Graw Hill.
- Jayanti, D. D. (2018). DETEKSI *ESCHERICHIA COLI* O157 PADA BERBAGAI AIR MINUM DI KELURAHAN SEKARAN GUNUNG PATI SEMARANG. Universitas Negeri Semarang
- Morin NJ, Gong Z & Li XF. 2004. REVERSE TRANSCRIPTION-MULTIPLEX PCR ASSAY FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF *ESCHERICHIA COLI* O157: H7, *VIBRIO CHOLERAE* O1, AND *SALMONELLA* TYPHI. *Clinical Chemistry*. 50(11): 2037-2044.
- Peter C.H., Cuncell F.T., Keys C., and Monday S.R. (2011). VIRULENCE CHARACTERIZATION OF SHIGA-TOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES FROM WHOLESALE PRODUCE. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (1): 343-345.
- ESCHERICHIA COLI PADA PENANAMAN MENGGUNAKAN TEKNIK SENKELIT (CALIBRATED LOOP) DAN MIKROPIPET (PIPET DILUTION METHOD) METODE SPREAD PLATE. UKMC Palembang
- Sartika, Indrawani, dan Sudiarti. (2005). ANALISIS MIKROBIOLOGI *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 PADA HASIL OLAHAN HEWAN SAPI DALAM PROSES PRODUKSINYA. *Jurnal Makara Kesehatan*, 9 (1): 23-28.
- Vos, P. *et al.* (2009). *BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*. 2nd edn, *Springer-Verlag New York*. 2nd edn. Springer-Verlag New York. doi: 10.1007/978-0-387-68489-5.
- Rananda RM, Djamal A, Julizar. 2016. IDENTIFIKASI BAKTERI *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 DALAM DAGING SAPI YANG BERASAL DARI RUMAH POTONG HEWAN LUBUK BUAYA. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 5(3): 614-617
- Rizky, V. A. (2018). PERBEDAAN JUMLAH KOLONI BAKTERI