

# *ESCHERICHIA COLI:* Patogenitas, Analisis dan Kajian Risiko

Winiati P. Rahayu | Siti Nurjanah | Ema Komalasari

# ESCHERICHIA

# COLI: Patogenitas, Analisis dan Kajian Risiko

Winiati P. Rahayu  
Siti Nurjanah  
Ema Komalasari



**Penerbit IPB Press**  
IPB Science Park Taman Kencana,  
Kota Bogor - Indonesia

C.01/05.2018

# Daftar Isi

Kata Pengantar .....	v
Daftar Isi .....	vii
Daftar Tabel .....	ix
Daftar Gambar .....	xi
I. Pendahuluan .....	1
II. Karakteristik Bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	5
III. Genetika <i>Escherichia coli</i> .....	13
IV. Patogenitas <i>Escherichia coli</i> .....	21
V. Prevalensi <i>Escherichia coli</i> Patogen pada Pangan .....	41
VI. Regulasi Cemaran <i>Escherichia coli</i> pada Pangan .....	51
VII. Pengendalian Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> .....	59
VIII. Analisis <i>Escherichia coli</i> Patogen pada Pangan .....	77
IX. Kajian Risiko <i>Escherichia coli</i> .....	127

# DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Waktu Generasi <i>E. coli</i> O157:H7 pada media TSB dengan beberapa suhu yang berbeda .....	6
Tabel 2.2 Serotipe .....	7
Tabel 2.3 Ketahanan <i>E. coli</i> patogen terhadap asam .....	10
Tabel 2.4 Pertumbuhan <i>E. coli</i> pada berbagai suhu, pH, dan jenis asam.....	11
Tabel 4.1 Persamaan dan Perbedaan EPEC tipikal dan EPEC atipikal .....	31
Tabel 4.2 Faktor virulensi dan enterotoksin EAEC.....	39
Tabel 5.1 Prevalensi bakteri <i>E. coli</i> pada pangan .....	49
Tabel 5.2 Salad yang positif mengandung bakteri <i>E. coli</i> patogen .....	52
Tabel 6.1 Batas cemaran <i>E. coli</i> dalam pangan di Indonesia.....	58
Tabel 6.2 Batas cemaran <i>E. coli</i> dalam pangan .....	60
Tabel 7.1 Produk bakteriofag komersial.....	77
Tabel 8.1 Media pengkayaan untuk <i>E. coli</i> patogen.....	86
Tabel 8.2 Target gen <i>E. coli</i> patogen pada analisis PCR.....	90
Tabel 8.3 Kelebihan metode multipleks .....	91
Tabel 8.4 Aplikasi mPCR dalam identifikasi dan deteksi <i>E. coli</i> patogen .....	93
Tabel 8.5 Perbandingan hasil metode ekstraksi DNA bakteri .....	102
Tabel 8.6 Pemilihan sekuen primer dengan nilai Tm yang sama .....	107
Tabel 8.7 Sekuen dan karakteristik primer yang digunakan dalam deteksi <i>E. coli</i> patogen .....	109
Tabel 8.8 Perbedaan dye dan probe .....	124
Tabel 9.1 Daftar situs yang dapat diakses untuk mengumpulkan informasi terkait bakteri patogen.....	140
Tabel 9.2 Karakterisasi bahaya <i>E. coli</i> patogen .....	142

# DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1 Keragaman genom <i>E. coli</i> .....	16
Gambar 3.2 Map sirkular genom <i>E. coli</i> O157:H7 strain EDL933 .....	17
Gambar 3.3 Peta plasmid ETEC.....	18
Gambar 3.4 Perbandingan gen GOS1 dan GOS2 dengan Plasmid 55989p (a); dan plasmid p042 (b) .....	18
Gambar 4.1 <i>Fimbriae</i> pada permukaan sel <i>E. coli</i> .....	24
Gambar 4.2 Evolusi Patogenitas <i>E. coli</i> .....	25
Gambar 4.3 Skema patogenesis ETEC .....	28
Gambar 4.4 Attaching dan effacing oleh EPEC pada kultur mukosa usus manusia.....	30
Gambar 4.5 Skema Patogenesis EPEC .....	32
Gambar 4.6 Skema transmisi EHEC .....	34
Gambar 4.7 (a) attaching-effacing oleh EHEC; (b) struktur toksin Shiga; (c) mekanisme patogenesis toksin shiga .....	35
Gambar 4.8 Skema Patogenesis EIEC .....	37
Gambar 4.9 Skema Patogenesis EAEC.....	40
Gambar 4.10 Skema Patogenesis DAEC .....	41
Gambar 7.1 Cara kerja HHP pada produk pangan.....	69
Gambar 7.2 Mekanisme ultrasound dalam inaktivasi mikroba.....	70
Gambar 8.1 Skema deteksi <i>E. coli</i> patogen (O157:H7) pada pangan .	88
Gambar 8.2 Pengaruh konsentrasi primer terhadap amplifikasi .....	106
Gambar 8.3 Perbandingan suhu annealing terhadap annealing.....	121
Gambar 8.4 Contoh hasil analisis multipleks PCR pada deteksi <i>E. coli</i> .	122
Gambar 8.5 Perbedaan fluoresensi antara simpleks dan multipleks...	125
Gambar 8.6 Kurva pelelehan stx1, stx2, dan eae pada bakteri EHEC...	126
Gambar 8.7 (a) Kurva pelelehan dupleks rt-PCR pada ETEC; (b) kurva pelelehan tripleks rt-PCR pada EHEC.....	126
Gambar 8.8 Kurva standar target gen (a) LT; (b) ST; (stx1); (d) stx2; (e) eae .....	128

# I.

## PENDAHULUAN

*Escherichia coli* merupakan salah satu bakteri koliform yang termasuk dalam famili Enterobacteriaceae. Enterobacteriaceae merupakan bakteri enterik atau bakteri yang dapat hidup dan bertahan di dalam saluran pencernaan. *Escherichia coli* merupakan bakteri berbentuk batang bersifat Gram-negatif, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan merupakan flora alami pada usus mamalia (Yang dan Wang 2014). Beberapa strain bakteri ini memberikan manfaat bagi manusia, misalnya mencegah kolonisasi bakteri patogen pada pencernaan manusia. Namun, ada beberapa kelompok lain yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia, yang dikenal sebagai *E. coli* patogen. *Escherichia coli* patogen pertama kali teridentifikasi pada tahun 1935 sebagai penyebab diare (Manning 2010). *Escherichia coli* patogen penyebab diare atau disebut juga sebagai *diarrheagenic E. coli* (DEC) terdiri dari enam jenis, yaitu *enterotoxigenic E. coli* (ETEC), *enteropathogenic E. coli* (EPEC), *enterohemorrhagic E. coli* (EHEC), *enteroinvasive E. coli* (EIEC), *enteroaggregative E. coli* (EAEC), dan *diffusely adherent E. coli* (DAEC) (Kaper *et al.* 2004). Empat jenis *E. coli* yaitu ETEC, EPEC, EHEC, dan EIEC diketahui merupakan bakteri penyebab penyakit yang berasosiasi dengan pangan (*foodborne illness*) (FDA 2011). Beberapa hasil penelitian juga menunjukkan bahwa EAEC merupakan bakteri yang mengontaminasi pangan dan menyebabkan diare (Kagambega *et al.* 2012).

*Escherichia coli* dibagi menjadi 3 kelompok besar berdasarkan interaksinya dengan inang (manusia), yaitu (1) non patogen (komensal), (2) patogen saluran pencernaan, dan (3) patogen diluar saluran

pencernaan (ekstraintestinal). Klasifikasi ini terutama didasarkan pada ada atau tidak adanya daerah DNA yang sering dikaitkan dengan patotipe tertentu. Bakteri *E. coli* juga dikenal sebagai bakteri indikator sanitasi dan higiene, yaitu bakteri yang keberadaannya dalam suatu produk pangan menunjukkan indikasi rendahnya tingkat sanitasi yang diterapkan. Keberadaan bakteri ini sering dikaitkan dengan adanya kontaminasi yang berasal dari kotoran (feses), karena *E. coli* pada umumnya adalah bakteri yang hidup pada usus manusia (maupun hewan) sehingga keberadaan bakteri tersebut pada air atau pangan menunjukkan adanya proses pengolahan yang mengalami kontak dengan kotoran. Menyangkut keamanan pangan, telah diketahui bahwa *E. coli* menyumbang sejumlah kasus penyakit enterik bagi anak-anak di beberapa negara berkembang. *Escherichia coli* merupakan etiologi utama penyebab diare (Parashar *et al.* 2003). Pada beberapa kasus dapat menimbulkan gejala *haemolytic uraemik syndrom* (HUS) yang dapat berakibat gagal ginjal. Infeksi tersebut bahkan dapat menyebabkan kematian (FDA 2012).

Beberapa tahun belakangan ini, temuan berupa informasi keracunan pangan akibat bakteri *E. coli* meningkat dengan pengaruh yang signifikan terhadap kesehatan (FAO 2011). Bayi dan anak-anak merupakan populasi paling rentan terpapar bakteri *E. coli*. Hal ini diperkuat dengan laporan kejadian keracunan atau infeksi oleh *E. coli* banyak ditemukan pada anak-anak. Contoh pangan yang tercemar *E. coli* patogen adalah daging, susu, sayuran, air minum, pangan siap saji yang diproses minimal, serta jajanan pinggir jalan yang banyak digemari oleh anak-anak (Manning 2010; Ram *et al.* 2011; Sen *et al.* 2011; Mohammed 2012; Russo *et al.* 2014; Frisca *et al.* 2007). Hasil temuan tersebut menunjukkan perlunya tingkat kewaspadaan serta proses pengolahan serta produksi yang baik yang disesuaikan dengan standar, karena faktor-faktor yang berkontribusi terhadap kontaminasi *E. coli* dalam pangan adalah tidak terpenuhinya parameter proses pengolahan,

seperti suhu pemasakan, nilai pH, aktivitas air, serta proses penyimpanan yang tidak benar.

Buku ini ditulis untuk memaparkan mengenai bakteri *E. coli* patogenik secara komprehensif, mulai dari karakteristik, genetika, patogenisitas, prevalensi, regulasi, cara pengendalian pertumbuhan, metode deteksi, sampai dengan kajian risiko *E. coli* dalam pangan. Setiap bab dalam buku diharapkan dapat memberikan pemahaman kepada pembaca mengenai bakteri *E. coli* patogen sehingga para pembaca mampu mewaspadai serta menangani atau mengendalikan keberadaan dan pertumbuhan bakteri ini sehingga kasus infeksi dan keracunan *E. coli* melalui pangan dapat dihindari.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [FDA] Food and Drug Administration. 2011. *Bacteriological Analytical Manual. Diarrheagenic Escherichia coli. Chapter 4A*. Food and Drug Association (FDA). <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>. Diakses pada 07 September 2015.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2012. *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, 2<sup>nd</sup> ed*. Silver Spring: FDA.
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2011. *Preventing E. coli in Food*. Food and Agricultural Organization (FAO). [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/fcc/news/1\\_FAO\\_Preventing-E.Coli-inFood\\_FCC\\_2011.06.23.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/fcc/news/1_FAO_Preventing-E.Coli-inFood_FCC_2011.06.23.pdf). Diakses pada 09 Januari 2018.
- Frisca, Lay BW, Waturangi DE. 2007. Identification of class 1 integron *Escherichia coli* from street foods in Jakarta. *Microbiol Indones*. 1 (1): 15-18.

- Kagambega A, Martikainen O, Lienemann T, Siitonen A, Traore AS, Barro N, Haukka K. 2012. Diarrheagenic *Escherichia coli* detected by 16-plex PCR in raw meat and beef intestines sold at local markets in Ougadougou, Burkina Faso. *Int J of Food Microbiol.* 153: 154-158
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2: 123-140
- Manning SD. 2010. *Deadly Diseases and Epidemics: Escherichia coli Infection*, Ed ke-2. New York: Chelsea Publishers.
- Mohammed MAM. 2012. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from meat products sold at Mansoura city, Egypt. *Food Control.* 25: 159-164
- Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 9(5): 565-572
- Ram S, Vajpayee P, Dwivedi PD, Shanker R. 2011. Culture-free detection and enumeration of STEC in water. *J Ecotoxicol Environ Saf.* 74: 551-557
- Russo P, Botticlla G, Capozzi V, Massa S, Spano G, Beneduce L. 2014. A fast, reliable, and sensitive method for detection and quantification of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in ready-to-eat fresh cut products by MPN-qCR. BioMed Research International. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/608296>
- Sen K, Sinclair JL, Boczek L, Rice EW. 2011. Development of a sensitive detection method for stressed *E. coli* O157:H7 in source and finished drinking water by culture-qPCR. *Environ Sci Technol.* 45:2250–2256.
- Yang X, Wang H. 2014. *Pathogenic E. coli*. Lacombe Research Centre, Lacombe. Canada.

## II.

# KARAKTERISTIK BAKTERI

## *ESCHERICHIA COLI*

Genus *Escherichia* merupakan bagian dari *Escherichiae* yang termasuk pada famili Enterobacteriaceae dan pertama kali diisolasi pada tahun 1885 oleh seorang bakteriologis asal Jerman bernama Theodor Escherich (Manning 2010). *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang dengan ukuran berkisar antara 1.0-1.5  $\mu\text{m}$  x 2.0-6.0  $\mu\text{m}$ , tidak motil atau motil dengan flagela serta dapat tumbuh dengan atau tanpa oksigen, bersifat fakultatif anaerobik dan dapat tahan pada media yang miskin nutrisi. Karakteristik biokimia *E. coli* lainnya adalah kemampuannya untuk memproduksi indol, kurang mampu memfermentasi sitrat, bersifat negatif pada analisis *urease*.

Bakteri *E. coli* umum hidup di dalam saluran pencernaan manusia atau hewan. Secara fisiologi, *E. coli* memiliki kemampuan untuk bertahan hidup pada kondisi lingkungan yang sulit. *Escherichia coli* tumbuh dengan baik di air tawar, air laut, atau di tanah. Pada kondisi tersebut *E. coli* terpapar lingkungan abiotik dan biotik (Anderson *et al.* 2005). Penyakit yang ditimbulkan oleh *E. coli* disebabkan karena kemampuannya untuk beradaptasi dan bertahan pada lingkungan yang berbeda. Ada beberapa jenis kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan bagi *E. coli* untuk dapat tetap bertahan, misalnya lingkungan asam (pH rendah) seperti pada saluran pencernaan manusia, perubahan suhu, serta tekanan osmotik. Kemampuan *E. coli* untuk bertahan hidup selama pendinginan dan pembekuan telah terbukti menjadikan *E. coli* toleran terhadap kondisi kering.

*Escherichia coli* dapat hidup dan bertahan pada tingkat keasaman yang tinggi di dalam tubuh manusia. *E. coli* juga dapat hidup dan bertahan di luar tubuh manusia yang penyebarannya melalui feses. Kedua habitat hidup *E. coli* ini cukup berlawanan. Saluran pencernaan manusia merupakan habitat yang relatif stabil, hangat, bersifat anaerob, dan kaya nutrisi. Sementara itu, di luar saluran pencernaan, kondisi lingkungan dapat sangat beragam, jauh lebih dingin, aerobik, serta kandungan nutrisi yang lebih sedikit.

*Escherichia coli* memiliki waktu generasi sekitar 30 sampai 87 menit bergantung pada suhu. Waktu generasi merupakan waktu yang dibutuhkan bagi sel *E. coli* untuk membelah diri menjadi dua kali lipat. Suhu optimum bagi pertumbuhan *E. coli* adalah 37 °C dengan waktu generasi tersingkat, yaitu selama 30 menit (Tabel 2.1).

Tabel 2.1 Waktu generasi *E. coli* O157:H7 pada media TSB pada berbagai suhu

Suhu (°C)	Waktu Generasi (menit)
2	Tidak ada pertumbuhan
25	87.6
30	34.8
37	30.0
40	38.0
45	72.6
45.5	Tidak ada pertumbuhan

Sumber: Doyle dan Schoeni (1984)

*Escherichia coli* juga merupakan bakteri indikator kualitas air minum karena keberadaannya di dalam air mengindikasikan bahwa air tersebut terkontaminasi oleh feses, yang kemungkinan juga mengandung mikroorganisme enterik patogen lainnya. Bakteri *E. coli* yang ada di dalam air umumnya *E. coli* non-patogen tetapi terkadang ditemukan pula strain patogen seperti enterotoksigenik dan *E. coli* yang memproduksi *shiga-toxin* (Enterohemoragik).

*Escherichia coli* patogenik dapat dibedakan berdasarkan patogenitasnya seperti diuraikan dalam Bab Pendahuluan, yaitu enterotoksigenik *E. coli* (ETEC), enteropatogenik *E. coli* (EPEC), enterohemoragik *E. coli* (EHEC), enteroinvasif *E. coli* (EIEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), dan difusif adheren *E. coli* (DAEC). *Escherichia coli* juga dapat dikarakterisasi dengan skema serotipe berdasarkan pada keberadaan atau tipe tiga antigen dasar, yaitu lipopolisakarida antigen somatik (O), antigen flagelar (H), dan antigen kapsular (K)(CFSPH 2009). Pembagian serotipe ini didasarkan pada studi yang telah dikembangkan oleh Kauffman sejak tahun 1947 untuk *Salmonella* yang kemudian diaplikasikan pada *E. coli* (McClure 2005). Serotipe O:H menjadi standar dalam karakterisasi *E. coli* patogen dan sangat penting dalam mendeteksi suatu kasus infeksi atau keracunan, pengawasan epidemiologi, diferensiasi taksonomi *E. coli*, deteksi serotipe patogen dalam spesies, serta untuk studi evolusi.

Skema serotipe *E. coli* terdiri dari 188 kelompok O, mulai dari O1 sampai O188, kecuali O31, O47, O67, O72, O94, dan O122, serta 53 antigen H, terdiri dari H1 sampai H56 kecuali H13, H22, dan H50 (Joensen *et al.* 2015). Tabel 2.2 menunjukkan kombinasi spesifik antara antigen O dan H pada kelompok *E. coli* berdasarkan patogenitasnya. Serotipe tertentu *E. coli* dikaitkan dengan suatu sindrom klinis tertentu, seperti pada kelompok EHEC. Serotipe O157:H7 dikenal sebagai *E. coli* patogen penyebab sindrom hemolitik uremik, yaitu suatu penyakit yang dicirikan dengan anemia hemolitik, gagal ginjal akut (uremia) dan menurunnya jumlah keping darah.

Tabel 2.2 Serotipe *E. coli* patogen

Kategori	Serogrup	Berasosiasi dengan antigen H
ETEC	O6	H16
	O8	H9
	O11	H27

Tabel 2.2 Serotipe *E. coli* patogen (Lanjutan)

Kategori	Serogrup	Berasosiasi dengan antigen H
	O15	H11
	O20	NM
	O25	H42, NM
	O27	H7
	O78	H11, H12
	O128	H7
	O148	H28
	O149	H10
	O159	H20
	O173	NM
EPEC	O55	H6, NM
	O86	H34, NM
	O111	H2, H12, NM
	O119	H6, NM
	O125	H21
	O126	H27, NM
	O127	H6, NM
	O128	H2, H12
	O142	H6
EHEC	O26	H11, H32, NM
	O55	H7
	O111	H8, NM
	O113	H21
	O117	H14
	O157	H7
EAEC	O3	H2
	O15	H18
	O44	H18
	O86	NM

Tabel 2.2 Serotipe *E. coli* patogen (Lanjutan)

Kategori	Serogrup	Berasosiasi dengan antigen H
EIEC	O77	H18
	O111	H21
	O127	H2
	O28	NM
	O29	NM
	O112	NM
	O124	H30, NM
	O136	NM
	O143	NM
	O144	NM
	O152	NM
	O159	H2, NM
	O164	NM
	O167	H4, H5, NM

Ket: NM = Non motil

Sumber: Nataro dan Kaper (1998)

*Escherichia coli* yang terpapar oleh kondisi lingkungan yang tidak sesuai, akan menghasilkan ekspresi gen khusus, mengalami mutasi adaptif, dan mengalami perubahan morfologi sel. Kebanyakan respon tersebut dipengaruhi oleh faktor sigma ( $\sigma^S$ ) spesifik yang merupakan suatu regulator. Gen spesifik ini terdiri dari gen pengendali koordinasi/*regulon* yang mengkode protein yang bertanggung jawab terhadap proteksi sel (McClure 2005). *Escherichia coli* memiliki lebih dari 50 regulon yang disebut *general stress response* (GSR) dengan beberapa fungsi pertahanan sel seperti untuk ketahanan terhadap tekanan osmotik, panas, pH, stres oksidatif, dan kekurangan nutrisi (Hengge 2011).

Beberapa strain *E. coli* non patogen, umumnya bersifat kurang tahan terhadap asam dibandingkan dengan strain *E. coli* patogen. Strain *E. coli* O157:H7 (EHEC) diketahui dapat tumbuh pada pH 4.6 bahkan

beberapa strain dapat bertahan pada pH 2.5 (Vimont *et al.* 2007). Salah satu contoh *E. coli* patogen kelompok EHEC yang dapat bertahan pada pH 2.5 adalah *E. coli* O157:H7 strain AD305 (Benjamin dan Datta 1995). Benjamin dan Datta (1995) melakukan studi untuk melihat ketahanan beberapa serotipe *E. coli* patogen kelompok EHEC terhadap asam. Hasilnya ditunjukkan pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Ketahanan *E. coli* patogen terhadap asam

Serotipe	Strain	Ketahanan (%) <sup>a</sup>	
		pH 2.5	pH 3.0
O157:H7	AD305	100	100
O157:H7	AD314	0.1	28
O157:H7	AD316	10	26
O157:H7	AD317	72	80
O157:H7	AD318	17	32
O157:H7	AD319	0.65	44
O26:H	AD320	16	53
O26:H30	AD306	3	36
O26:H11	AD307	26	74
O111:NM	AD308	0.43	58
O111:NM	AD313	0.38	35
O22:H8	AD309	6	38
O15:H27	AD310	20	40
O165:H25	AD312	62	76

<sup>a</sup>Persentase *E. coli* yang bertahan hidup dihitung berdasarkan jumlah koloni setelah inkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam dalam media LB yang ditambah HCl sampai pH mencapai 2.5 dan 3.0.

(sumber: Benjamin dan Datta 1995)

Pengaruh suhu dan pH terhadap pertumbuhan *E. coli* dapat dilihat pada Tabel 2.3. *E. coli* dapat tumbuh dengan baik pada suhu 37 oC dengan minimal pH 4.5 dan lebih resisten terhadap penggunaan asam sitrat dibanding dengan asam asetat (Conner dan Kotrola 1995).

Pertumbuhan *E. coli* berdasarkan perbedaan suhu ditunjukkan pada Tabel 2.4. Hasil studi Conner dan Kotrola (1995) mendukung studi yang telah dilakukan oleh Doyle dan Schoeni (1984).

Tabel 2.4. Pertumbuhan *E. coli* pada berbagai suhu, pH, dan jenis asam

Suhu (°C)	pH	Pertumbuhan <i>E. coli</i> O157:H7 pada media TSBYE	
		Asam Sitrat	Asam Asetat
4	4.0	-	-
	4.5	-	-
	5.0	-	-
	5.5	-	-
10	4.0	-	-
	4.5	-	-
	5.0	-	-
	5.5	+++	-
25	4.0	-	-
	4.5	-	-
	5.0	+++	+
	5.5	+++	+++
37	4.0	-	-
	4.5	+++	-
	5.0	+++	+
	5.5	+++	+++

Ket: (-) : tidak ada pertumbuhan; (+): tumbuh pada 1-5 sumur uji; (+++) : tumbuh pada 10 sumur uji.

(Sumber: Conner dan Kotrola 1995).

Stres lingkungan lain yang di hadapi *E. coli* adalah tekanan osmotik. Stres ini banyak terjadi dalam bahan pangan dengan kandungan gula atau garam yang tinggi serta nilai  $a_w$  yang rendah. Keberadaan gula dan garam dalam pangan dapat menurunkan aktivitas air dan meningkatkan tekanan osmotik sehingga dapat menghambat pertumbuhan *E. coli*. Glass *et al.* (1992) menyatakan bahwa strain EHEC O157:H7 tumbuh dengan baik pada lingkungan dengan kandungan NaCl

2.5 %, dan menjadi lambat pada NaCl 6.5 %, serta tidak terjadi pertumbuhan pada NaCl 8.5 %. Pada lingkungan dengan tekanan osmotik tinggi, sel *E. coli* akan menggunakan sistem osmoregulasi untuk menjaga tekanan osmotik internal. *E. coli* baik yang bersifat komensal maupun patogen memiliki transporter osmoprotektan (ProP dan ProU) untuk osmolit organik seperti betain dan karnitin (Ly *et al.* 2004). Sistem tersebut membantu bakteri bertahan pada kondisi stres yang ekstrim, seperti kondisi asam, kekeringan, dan yang lainnya. Pada *E. coli* patogen, sistem transporter osmoprotektan ini diyakini memiliki peranan penting dalam pertumbuhan pada kondisi pangan dengan  $A_w$  rendah.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Anderson KL, Whitlock JE, Harwood VJ. 2005. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3041–3048
- Benjamin MM, Datta AR. 1995. Acid Tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ Microbiol.* 61(4): 1669-1672
- [CFSPH] Center of Food Security and Public Health. 2009. Enterohemorrhagic *E. coli* Infection. Iowa: College of Veerinary Medicine Iowa State University
- Conner DE, Kotrola JS. 1995. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic condition. *J. Appl Env Microbiol.* 61(1): 382-385
- Doyle MP, Schoeni JL. 1984. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *J Appl Environ Micrbiol.* 4 8(4):855-856.
- Glass KA, Loeffelholz JM, Ford JP, Doyle MP. 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl Environ Microbiol.* 58: 2513-2516.

- Hengge R. 2011. The general stress response in Gram negative bacteria. Di dalam *Bacterial Stress Response 2<sup>nd</sup> ed.* Storz G, Hengge R, editor. Washington: ASM Press
- Joensen KG, Tetzschner AMM, Iguchi A, Aarestrup FM, Scheutz F. 2015. Rapid and easy *In Silico* serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome in sequencing data. *J. Clinical Microbiology.* 53(8):2410-2426
- Ly A, Henderson J, Lu A, Culham DE, Wood JM. 2004. Osmoregulatory systems of *Escherichia coli*: identification of betaine-carnitine-choline transporter family member *BetU* and distributions of *betU* and *trkG* among pathogenic and nonpathogenic isolates. *J. Bacteriol.* 186: 296–306.
- Manning SD. 2010. *Deadly Diseases and Epidemics: Escherichia coli Infection*, Ed ke-2. New York: Chelsea Publishers.
- McClure P. 2005. *Escherichia coli*: virulence, stress response and resistance. Di dalam *Understanding Pathogen Behaviour, Virulence, Stress Response, and Resistance.* Griffiths M, editor. New York: CRC Press
- Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Review.* 11(1): 142-201
- Vimont A, Vernozy-Rozand C, Montet MP, Bavai C, Fremaux B, Delignette-Muller ML. 2007. Growth of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and bovine feces background microflora in various enrichment protocols. *Vet. Microbiol.* 123: 274–281.

### III.

## GENETIKA

# *ESCHERICHIA COLI*

*Escherichia coli* termasuk salah satu mikroba pertama yang telah diketahui sekuen basa penyusun genomnya secara lengkap yaitu *E. coli* K12. Bakteri *E. coli* merupakan mikroba yang paling banyak diteliti untuk studi genetika. Penggunaan mikroorganisme seperti *E. coli* untuk melakukan manipulasi dengan merekayasa, memperkembangbiakkan bahkan membunuh sel-sel tersebut, tidak melanggar etika. Hal ini berbeda dengan penggunaan organisme tingkat tinggi sebagai model seperti tikus atau monyet yang memiliki aturan dan etika tertentu dalam proses penggunaannya.

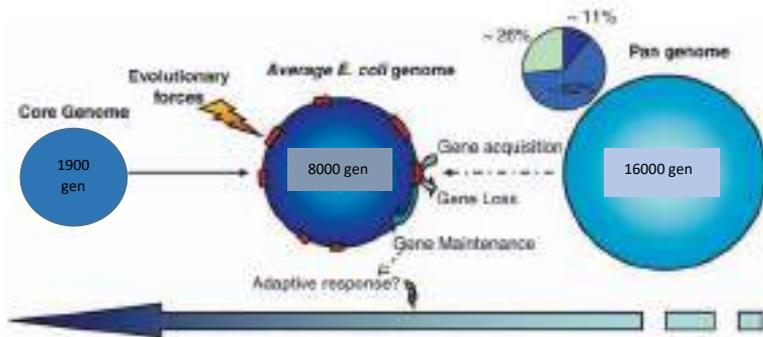
Kemampuan *E. coli* untuk bertahan pada berbagai kondisi lingkungan adalah salah satu keuntungan yang menyebabkan seringnya penggunaan *E. coli* sebagai organisme model. Organisme model adalah spesies yang dipelajari secara ekstensif untuk memahami fenomena tertentu, dengan tujuan hasil yang diperoleh dapat diterapkan untuk spesies yang lain. *E. coli* juga dapat tumbuh dengan cepat (dengan waktu generasi sekitar 20-30 menit) ketika dikulturkan pada media pertumbuhan dan selnya tidak menggumpal (Cronan 2014). Hal ini bermanfaat dalam suatu penelitian dengan waktu singkat untuk menghasilkan generasi berikutnya. Secara genetik, *E. coli* dapat dimanipulasi dengan mudah. *Escherichia coli* banyak digunakan sebagai vektor untuk menyisipkan gen-gen tertentu yang diinginkan untuk dikembangkan dalam teknologi rekayasa genetika. Beberapa penelitian di bidang kesehatan, seperti pembuatan insulin bagi para penderita

diabetes banyak yang menggunakan *E. coli* sebagai model organismenya (Choi *et al.* 2012; Chalmeh *et al.* 2013).

Telah diuraikan sebelumnya tentang klasifikasi *E. coli* baik berdasarkan interaksinya dengan inang, berdasarkan patogenisitas atau berdasarkan *serotyping*. Genom *E. coli* memiliki daerah konservatif dan daerah yang berbeda. Setiap strain *E. coli* memiliki perbedaan deretan gen dengan strain lainnya. Strain patogen memiliki genom hingga 20 % lebih besar dibandingkan dengan strain K-12 yang bersifat non patogen (Lukjancenکو *et al.* 2010; Tenaillon *et al.* 2010).

Genom *E. coli* (kromosom dan plasmid) memiliki panjang antara 4.5 sampai 5.5 juta pasang basa (Mbp) mengkode sekitar 4 500-5 500 gen (Rasko *et al.* 2008). Panjang kromosom *E. coli* 1 000 kali lebih panjang dibandingkan selnya. Genom *E. coli*, baik yang bersifat patogen maupun non patogen menunjukkan adanya segmentasi yang kompleks. Keduanya saling membagi sekuen utama yang saling linear kecuali pada beberapa titik replikasi (Perna *et al.* 2001).

Urutan genom *E. coli* telah diketahui secara lengkap dan hasilnya menunjukkan banyak keragaman pada spesies ini. Informasi genetik *E. coli* secara keseluruhan diperoleh dari kromosom dan plasmid yang dimilikinya. Informasi tentang patogenitasnya dapat diperoleh pada bagian kromosom atau plasmid yang merupakan kumpulan gen penyandi sifat virulensi atau dikenal dengan nama *pathogenicity island* (PAI) (Dobrindt 2005). Pengujian terhadap identitas *E. coli* pada 95% panjang nukleotida berkisar antara 16 148 gen dengan keragaman genom *E. coli* hasil analisis terhadap 22 strain berkisar antara 4 116 - 5 379 gen. Sebanyak 8 573 gen termasuk ke dalam gen mosaik dan hanya 1996 gen yang ditemukan di setiap strain dan dapat didefinisikan sebagai gen inti, yang merupakan 37-49 % dari genom (Gambar 3. 1).

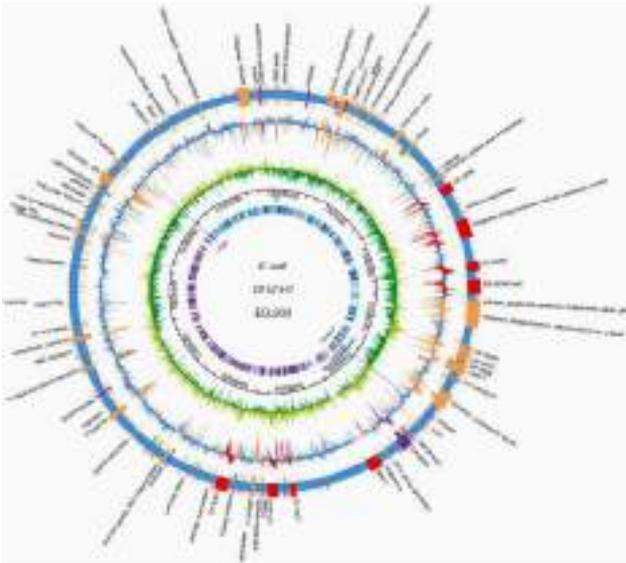


Gambar 3. 1 Keragaman genom *E. coli*  
(Sumber: van Elsas *et al.* 2011)

Pangenom atau jumlah total gen pada *E. coli* dapat mencapai lebih dari 20 000 gen. Strain *E. coli* dengan daerah DNA spesifik, beberapa diantaranya berkontribusi terhadap virulensi. Beberapa daerah genomik pada strain *E. coli* patogen mewakili suatu elemen genetik yang bersifat *mobile*, seperti kumpulan gen penyandi sifat virulensi yang disebut PAI (Perna *et al.* 2001). Secara umum, banyak gen-gen toksin spesifik dinyatakan sebagai bagian dari PAI, seperti sekresi tipe III (LEE/ *locus of enterocyte effacement*) pada *E. coli* EDL933 (EHEC) (Gambar 3.2) dan enterotoksin (autotransporter) pada *E. coli* E2348/69 (EPEC).

Kromosom *E. coli* berbentuk sirkular atau berbentuk lingkaran dengan memiliki utas ganda. Secara umum jumlah basa nitrogen pada kromosom *E. coli* patogen lebih besar dari pada strain non-patogen, hal ini karena ada penambahan beberapa sekuen yang menyandi daerah virulensi. Sebagai contoh, *Escherichia coli* K-12 strain MG1655 yang bersifat non patogen memiliki ukuran kromosom sebesar 4 639 221 pb (Blattner *et al.* 1997), diduga mengandung 4 296 gen yang mengkode 108 RNA dan 4 151 protein (Zhou dan Rudd 2013). *Escherichia coli* O157:H7 Sakai strain EDL933 yang bersifat patogen memiliki ukuran

kromosom sekitar 5 498 450 pb (Perna *et al.* 2001), ETEC strain H10407 memiliki ukuran kromosom sebesar 5 153 435 pb (Crossman *et al.* 2010), dan EAEC (*E. coli* O42) memiliki ukuran kromosom 5 241 977 pb dengan ukuran plasmid sekitar 113 346 pb (Chaudhuri *et al.* 2010).



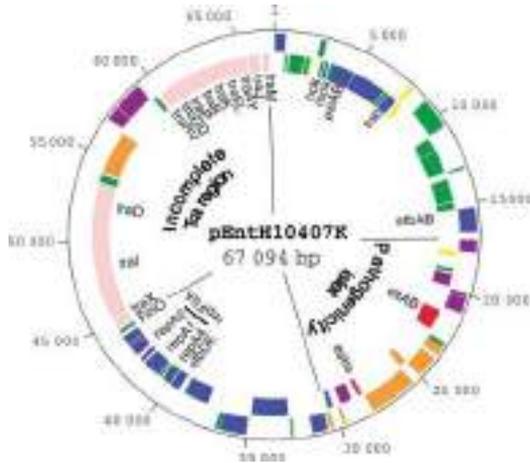
Gambar 3.2 Map sirkular genom *E. coli* O157:H7 strain EDL933  
(Sumber: Perna *et al.* 2001)

Selain kromosom, *E. coli* juga memiliki plasmid yang mengandung informasi genetik di dalamnya. Plasmid merupakan DNA ekstrakromosomal yang dapat ditemukan pada sel hidup. Plasmid sering ditemukan pada *E. coli* baik dari sampel klinis atau lingkungan, dan profil plasmid saat ini digunakan untuk menyelidiki struktur genetik populasi bakteri (Perna *et al.* 2001). Umumnya, plasmid mengkode gen-gen yang diperlukan agar dapat bertahan pada keadaan yang kurang menguntungkan termasuk gen-gen pengkode sifat virulensi tertentu

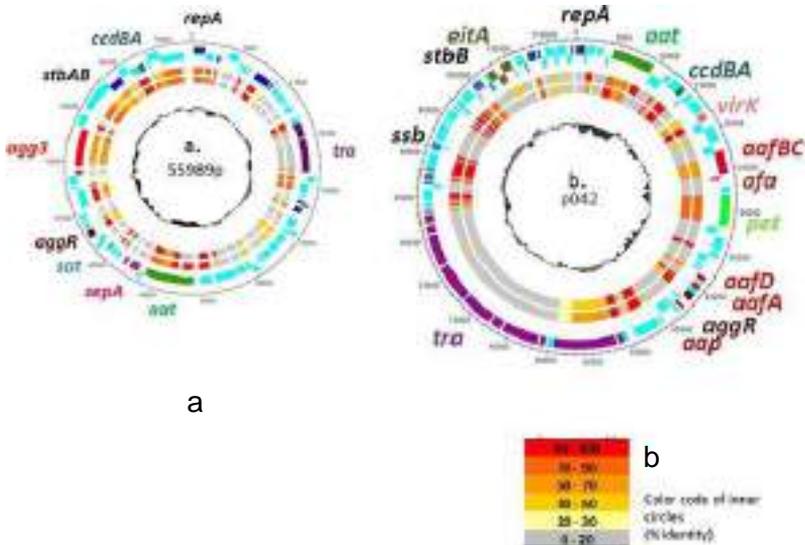
seperti pada beberapa *E. coli* patogen. Plasmid ditemukan dalam bentuk DNA utas ganda yang sebagian besar tersusun menjadi superkoil.

Salah satu plasmid yang telah dianalisis adalah plasmid E24377A (pE23477A\_70; pE23477A\_74; pE23477A\_79) (Rasko *et al.* 2008) dan pCss165 (Wajima *et al.* 2013). Kedua plasmid tersebut diketahui merupakan plasmid yang ada pada kelompok ETEC dan mengkode beberapa gen pembawa sifat virulensi, seperti enterotoksin ST dan LT. Agar lebih jelas, peta plasmid dapat dilihat pada Gambar 3.3. Plasmid pE24377A\_74 mengkode suatu protein yang disebut ETEC autotransporter A (*EatA*). *EatA* merupakan faktor pembawa toksin (Roy *et al.* 2011) yaitu protease serin yang berperan penting dalam virulensi ETEC dan ditemukan pada 61% isolat ETEC (Patel *et al.* 2004). Hasil studi Ochi *et al.* (2009) terhadap analisis sekuen enterotoksin plasmid (plasmid ENT) pada ETEC yang berukuran 65 147 pb, teridentifikasi sekitar 100 frame pembacaan terbuka (ORFs) yang mengkode polipeptida, termasuk daerah yang mengkode toksin labil panas (LT) dan toksin stabil panas (ST). Toksin LT berada pada posisi 21 772-21 348 (LT-B) dan 22 549-21 719 (LT-A). Sementara untuk gen ST terletak pada posisi 28 394-28 176.

Salah seorang peneliti dari Jerman yaitu Brzuszkiewicz *et al.* (2011) mempublikasikan hasil studinya yang membandingkan dua strain *E. coli* penyebab keracunan pangan (GOS 1 dan GOS 2). Hasilnya menunjukkan plasmid pada *E. coli* GOS1 dan GOS2 memiliki 46 gen yang sama dengan plasmid EAEC (plasmid 55989p). Pemetaan data *E. coli* GOS1 dan GOS2 pada plasmid referensi p042 juga menunjukkan sejumlah besar protein homolog (Gambar 3.4).



Gambar 3.3 Peta plasmid ETEC  
(Sumber: Ochi *et al.* 2009)



Gambar 3.4 Perbandingan gen GOS1 dan GOS2 dengan Plasmid 55989p (a); dan plasmid p042 (b)  
(Sumber: Brzuszkiewicz *et al.* 2011)

## DAFTAR PUSTAKA

- Blattner FR, Plunket III G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Callado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, *et al.* 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 277: 1453-1462
- Brzuszkiewicz E, Thurmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer FD, Boelter J, Petersen H, Gottschalk G, Daniel R. 2011. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*. 193: 883-891
- Chalmeh A, Badiei K, Pourjafar M, Nazifi S. 2013. Anti-inflammatory effects of insulin regular and flunixin meglumine on endotoxemia experimentally induced by *Escherichia coli* serotype O55:B5 in an ovine model. *Inflamm Res*. 62: 61-67
- Chaudhuri RR, Sebaihia M, Hobman JL, Webber MA, Leyton DL, Goldberg MD, Cunningham AF, Scott-Tucker A, Ferguson PR, Thomas CM, *et al.* 2010. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain O42. *Plos One*. 5(1):1-19
- Choi SP, Park YC, Lee JH, Sim SJ, Chang HN. 2012. Effect of L-arginine on refolding of lysine-tagged human insulin-like growth factor 1 expressed in *Escherichia coli*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 35: 255-263
- Cronan JE. 2014. *Escherichia coli* as an experimental organism. Molecular Biology. John Wiley and Sons Ltd. Advanced article. doi: 10.1002/9780470015902.a0002026.pub2.
- Crossman LC, Chaudhuri RR, Beatson SA, Wells TJ, Desvaux M, Cunningham AF, Petty NK, Mahon M, Brinkley C, Hobman JL *et al.* 2010. A commensal gone bad: complete genome sequence of

- the prototypical enterotoxigenic *Escherichia coli* strain H10407. *J Bacteriol.* 192(21): 5822-5831
- Dobrindt U. 2005. Pathogenomics of *Escherichia coli*. *Int J Of Med Microbiol.* 295: 357-371
- Luckjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW. 2010. Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microbial Ecology.* 61: 708-720
- Ochi S, Shimizu T, Ohtani K, Ichinose Y, Arimitsu H, Tsukamoto K, Kato M, Tsuji T. 2009. Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* ENT plasmid. *DNA Research.* 16: 299-309
- Patel SK, Dotson J, Allen KP, Fleckenstein JM. 2004. Identification and molecular characterization of EatA, an autotransporter protein of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 72. 1786–1794.
- Perna N, Plunkett G, Burland V, Mau B, Glasner J, Rose D, Mayhew G, Evans P, Gregor J, Kirkpatrick H *et al.* 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Nature.* 410: 240-240
- Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GSA, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, Crabtree J, Sperandio V, Ravel J. 2008. The pan-genome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolate. *J Bacteriol.* 190: 6881-6893
- Roy K, Kansal R, Bartels SR, Hamilton DJ, Shaaban S, Fleckenstein JM. 2011. Adhesin degradation accelerates delivery of heat-labile toxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 286. 29771–29779.
- Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology.* 8: 207-217

- van Elsas JD, Semenov AV, Costa R, Trevors JT. 2011. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME journal*. 5: 173-183
- Wajima T, Sabui S, Kano S, Ramamurthy T, Chatterjee NS, Hamabata T. 2013. Entire sequence of the colonization factor coli surface antigen 6-encoding plasmid pCss165 from an enterotoxigenic *Escherichia coli* clinical isolate. *Plasmid*. 70: 343-352
- Zhou J, Rudd KE. 2013. EcoGene 3.0. *Nucleid Acids Research*. 41: 613-624

# IV.

## PATOGENITAS

### *ESCHERICHIA COLI*

*Escherichia coli* umumnya bersifat tidak berbahaya dan hidup dalam pencernaan manusia. Apabila *E. coli* yang awalnya bersifat non patogen memperoleh tambahan gen virulensi dari mikroorganisme lain melalui mekanisme perpindahan gen (transformasi), perpindahan plasmid (konjugasi) atau perpindahan gen melalui bakteriofage (transduksi) akan berubah menjadi bakteri patogen. Penyakit yang diakibatkan *E. coli* patogen berbeda tergantung virulensi dan mekanisme patogenezisnya.

Patogenitas merupakan kemampuan suatu organisme untuk menimbulkan penyakit. *E. coli* dapat menimbulkan suatu gejala penyakit bila mampu masuk ke tubuh inangnya dan mampu beradaptasi serta bertahan di dalam tubuh manusia, kemudian menyerang sistem imun dan akhirnya menimbulkan penyakit. Mekanisme patogenezis ini dilakukan melalui beberapa tahapan seperti bakteri patogen lainnya. Tahapan tersebut adalah kolonisasi pada titik tertentu di bagian sel permukaan usus (sel mukosa), pembelahan sel, perusakan sel usus, melintasi sel usus dan memasuki aliran darah, penambatan ke organ target dan akhirnya menyebabkan kerusakan organ. Sebagian besar strain *E. coli* patogen merusak sel inang pada bagian luar, tetapi EIEC merupakan patogen intraseluler yang mampu menyerang dan bereplikasi di dalam sel mukosa usus dan makrofag (Kaper *et al.* 2004).

Penempelan *E. coli* pada permukaan mukosa usus dilakukan menggunakan pilus (atau disebut pili jika jumlahnya banyak) (Gambar

4.1). Pili merupakan tonjolan dari dinding sel bakteri yang antigennya disebut antigen *fimbriae*. Setiap jenis *E. coli* memiliki struktur *fimbriae* unik yang bervariasi dalam ukuran serta fungsi dan dikodekan oleh gen virulensi yang berbeda. Hal ini menyebabkan mekanisme yang bervariasi pada setiap kelompok *E. coli* patogen sebagai penyebab kerusakan pada sel inang.

Sifat patogenik *E. coli* dikelompokkan ke dalam beberapa jenis berdasarkan pada mekanisme patogenitas, virulensi, dan sindrom klinis yang ditimbulkan (Kaper *et al.* 2004). Seperti telah disebutkan sebelumnya, berdasarkan patogenitasnya, *E. coli* dibedakan ke dalam enam jenis yaitu enterotoksigenik *E. coli* (ETEC), enteropatogenik *E. coli* (EPEC), enterohemoragik *E. coli* (EHEC), enteroinvasif *E. coli* (EIEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), dan difusi adheren *E. coli* (DAEC).



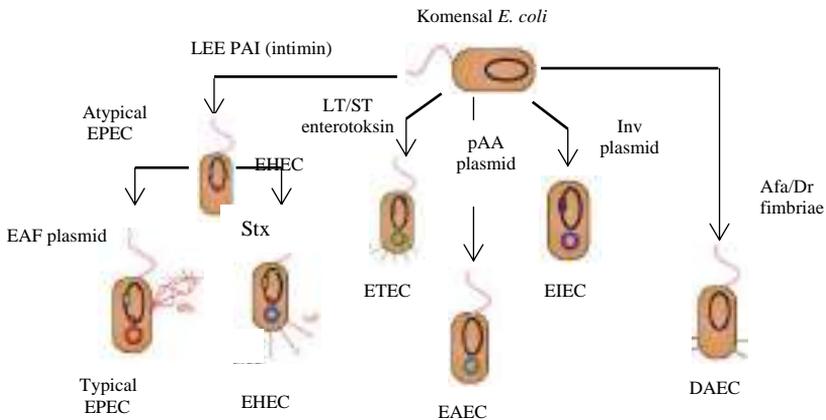
Gambar 4.1 *Fimbriae* pada permukaan sel *E. coli*  
(Sumber: Manning 2010)

## VIRULENSI

Patogenitas *E. coli* patogen ditentukan berdasarkan faktor atau gen virulensi spesifik yang dimiliki bakteri tersebut. Gen virulensi ini terdapat pada kromosom atau plasmid indigenus atau pun berasal dari mikroorganisme lainnya. Kombinasi gen virulensi ini akan menentukan patotipe *E. coli*, dan masing-masing patotipe menyebabkan gejala klinis tertentu yang berbeda. Studi genetik terkait faktor virulensi terus

berkembang baik pada strain *E. coli* komensal maupun patogen. Strain *E. coli* patogen mungkin berasal dari strain komensal dengan perolehan virulensi dari kromosom ataupun ekstrakromosom, adanya perubahan genom yang dapat meningkatkan patogenitas (mutasi patoadaptif), atau dari mutasi acak yang dapat meningkatkan adaptasi pada lingkungan patogen (Torres *et al.* 2010). Perubahan sifat patogenitas dapat berlaku *reversible*, strain patogen juga dapat berubah menjadi non patogen (komensal) karena hilangnya faktor virulensi dalam sel.

Dari enam jenis *E. coli* patogen, masing-masing memiliki gen virulensi yang spesifik, tetapi beberapa diantaranya juga dapat memiliki faktor virulensi yang sama, seperti EPEC dan EHEC yang sama-sama memiliki intimin (suatu protein yang memungkinkan bakteri patogen untuk menempel pada usus dan menimbulkan luka). Gambar 4.2 menunjukkan evolusi *E. coli* komensal menjadi patogen yang dipengaruhi oleh keberadaan gen virulensi tertentu.



Gambar 4.2 Evolusi patogenitas *E. coli*  
(Sumber: Williams *et al.* 2010)

Sifat virulensi pada enam patotipe *E. coli* ditentukan oleh suatu elemen tertentu yang berbeda, seperti faktor pelekatan sel pada EPEC

(*Effect Adherence Factor* = EAF), kemampuan memproduksi toksin (*shiga-like* toksin) pada EHEC, keberadaan plasmid invasi (*inv*) pada EIEC, kemampuan memproduksi enterotoksin (LT/ST) pada ETEC, serta keberadaan *fimbriae* (Afa/Dr) pada DAEC.

#### SINDROM KLINIS YANG DITIMBULKAN

Gejala klinis yang ditimbulkan oleh strain *E. coli* patogen umumnya bertanggung jawab atas tiga tipe infeksi pada manusia, yaitu infeksi pada saluran pencernaan yang mengakibatkan diare, infeksi saluran kemih, dan meningitis neonatal. Infeksi pada saluran pencernaan yang sering dikaitkan dengan pangan disebabkan oleh kelompok *diarrheagenic E. coli*, seperti EHEC, ETEC, EIEC yang bertanggung jawab terhadap diare akut dan parah, sementara itu kelompok EPEC, EAEC, dan DAEC berasosiasi dengan diare sedang hingga kronis. Infeksi saluran kemih disebabkan oleh kelompok *uropathogenic E. coli* (UPEC) dan meningitis disebabkan oleh kelompok *neonatal meningitis E. coli* (NMEC). Keduanya merupakan jenis infeksi yang terjadi diluar saluran pencernaan atau dikenal dengan *extracellular pathogenic E. coli* (ExPEC) (Kaper *et al.* 2004; Croxen dan Finlay 2010). Kelompok UPEC dan ExPEC tersebut tidak dibahas di dalam buku ini.

#### MEKANISME PATOGENESIS

##### 1. Enterotoksigenik *E. coli* (ETEC)

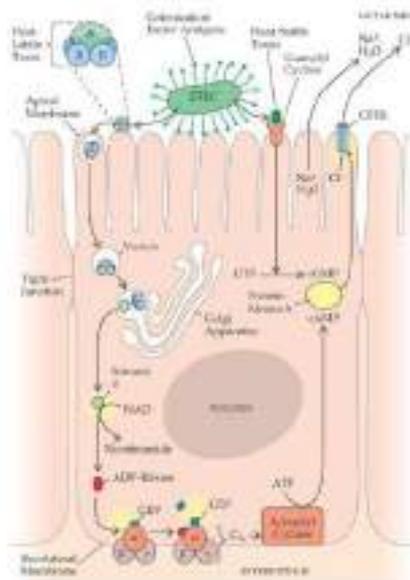
Enterotoksigenik *E. coli* merupakan penyebab diare tidak hanya pada manusia tetapi juga pada hewan. Setelah masuk ke dalam sistem pencernaan, ETEC akan menempel pada sel-sel yang melapisi mukosa usus kecil melalui interaksi yang dimediasi oleh faktor kolonisasi (*colonization factor* = CFs). Setelah itu, ETEC akan memproduksi enterotoksin. Faktor kolonisasi ini menggambarkan tiga tipe *fimbriae* berbeda dan sangat penting untuk proses penempelan pada permukaan mukosa usus kecil. Disamping itu, faktor kolonisasi yang berbeda ini bervariasi jumlahnya untuk setiap populasi dan beberapa kombinasi

faktor menyebabkan peningkatan virulensi. Faktor kolonisasi pada ETEC telah diketahui ada sekitar 25 jenis (Montzer 2016).

Selama berkolonisasi dalam sel mukosa usus, ETEC mengeluarkan toksin yang terdiri dari dua jenis, yaitu yang tidak tahan panas (*heat labile toxin* = LT) dan yang tahan panas (*heat stabile toxin* = ST). Strain ETEC dapat memproduksi salah satu atau kedua toksin tersebut, dan dapat menginduksi diare. struktur dan sifat imunologi enterotoksin LT dari ETEC mirip dengan enterotoksin yang diproduksi oleh *V. cholera* (Flores dan Okhuysen 2010). Enterotoksin LT dibagi menjadi dua tipe, yaitu LT-I dan LT-II. Enterotoksin LT-I umumnya ditemukan/menginfeksi baik manusia (LTh) maupun hewan babi (LTp), sementara itu enterotoksin LT-II umumnya hanya ditemukan pada hewan. Enterotoksin ST juga dibagi menjadi dua tipe, STa dan STb. STa sering ditemukan pada isolat ETEC yang menginfeksi manusia (STh) maupun hewan (STp). Sementara itu STb hanya ditemukan pada isolat ETEC yang menginfeksi hewan (babi dan sapi). Studi mengenai dosis infeksi ETEC terhadap manusia menunjukkan bahwa ETEC dapat menyebabkan diare pada dosis sekitar  $1 \times 10^6$  sampai  $1 \times 10^{10}$  CFU (Flores dan Okhuysen 2010; Porter *et al.* 2011; Feng 2015).

Enterotoksigenik *E. coli* ditularkan melalui rute *fecal-oral*. Penularan ETEC terhadap bayi ataupun anak-anak umumnya terjadi karena pangan maupun air di daerah tersebut terkontaminasi ETEC dengan konsentrasi yang cukup tinggi. Feng (2015) menyatakan infeksi ETEC lebih sering disebabkan oleh konsumsi dari air yang telah terkontaminasi serta pangan seperti kol, peterseli, ketumbar, kecambah, dan bayam. Mekanisme toksisitas ETEC melibatkan beberapa elemen seperti faktor kolonisasi (CFs), reseptor yang dapat mengenali CFs, dan enterotoksin yang dihasilkan. Toksikoinfeksi strain ini umumnya bertanggung jawab terhadap diare yang dialami oleh para wisatawan dari negara-negara maju yang menerapkan kebersihan yang baik yang mengunjungi negara-negara dengan standar kebersihan yang buruk.

Proses infeksi dimulai dengan kolonisasi ETEC pada usus halus dengan adanya CFs. Ketika sudah melekat, ETEC akan mengeluarkan enterotoksin LT dan atau ST. Enterotoksin LT berikatan dengan GM1, yaitu sejenis glikoprotein yang berfungsi sebagai reseptor. Toksin LT kemudian akan bergerak ke retikulum endoplasma. Enterotoksin LT akan mengikat ribosa adenosin difosfat (ADP) sehingga menghambat kegiatan GTPase (pemecah protein G). Akibatnya, protein G ini mengikat dan merangsang adenilil siklase sel epitel sehingga menyebabkan peningkatan jumlah adenil monofosfat (AMP). Peningkatan AMP akan menyebabkan peningkatan sekresi sel-sel kelenjar di dalam usus, yaitu merangsang sekresi  $\text{Cl}^-$  (hipersekresi) dengan membuka saluran klorida pada sel kriptas dan menghambat absorpsi  $\text{Na}^+$  dari lumen ke dalam sel epitel usus.



Gambar 4.3 Skema patogenesis ETEC  
(Sumber: anon)

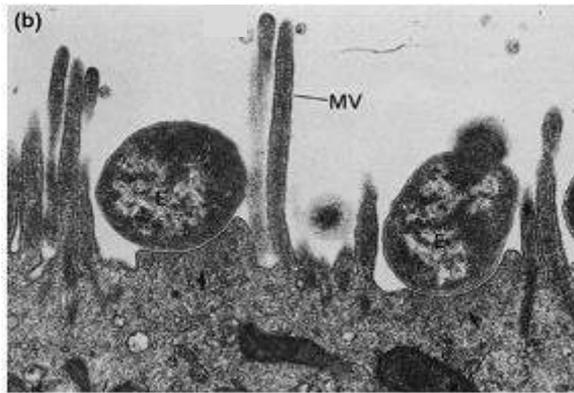
Sementara itu enterotoksin ST bekerja mengaktifkan guanilat siklase C (GC-C) yang akan meningkatkan cGMP dan kemudian mengaktifkan protein kinase sehingga menyebabkan akumulasi cairan dan elektrolit di dalam lumen usus serta menghalangi proses penyerapan (absorpsi). Peningkatan kadar elektrolit dan air di dalam lumen usus inilah yang dapat menyebabkan diare. Diare dapat bertahan hingga 19 hari dan umumnya tidak disertai demam. Timbulnya penyakit dapat terjadi 8 sampai 44 jam setelah konsumsi makanan yang terkontaminasi ETEC. Mekanisme patogenesis ETEC dapat dilihat pada Gambar 4.3

## 2. Enteropatogenik *E. coli* (EPEC)

Enteropatogenik *E. coli* (EPEC) merupakan penyebab diare yang umumnya terjadi di negara-negara berkembang (Kaper *et al.* 2004). Enteropatogenik *E. coli* menyebabkan diare yang cukup parah pada bayi dan dapat berlangsung selama lebih dari 2 minggu serta menyebabkan kematian jika terjadi dehidrasi parah. Pada orang dewasa, penyakit ini ditandai dengan diare berat, mual, muntah, kram perut, sakit kepala, demam, dan menggigil. Waktu untuk timbulnya penyakit adalah 17 sampai 72 jam; durasi penyakit adalah 6 jam sampai 3 hari. EPEC dapat menyebabkan penyakit yang akan berkembang pada manusia ketika ditransmisikan oleh air yang terkontaminasi feces.

Karakteristik utama dari EPEC adalah kemampuannya untuk menginduksi luka (*attaching-effacing*) pada saluran pencernaan dengan cara merusak mikrovili usus (Gambar 4.4). Enteropatogenik *E. coli* di bagi menjadi dua subgrup, yaitu EPEC tipikal (tEPEC) dan EPEC atipikal (aEPEC) (Bouzari *et al.* 2011). Perbedaan utama antara tEPEC dan aEPEC adalah faktor pelekatan EPEC berupa plasmid (EAF = EPEC *adherence factor plasmid*) yang ada pada kelompok tEPEC. Plasmid EAF mengkode tipe IV fimbria yang disebut *bundle-forming pilus (bfp)* yang berperan dalam proses pelekatan EPEC ke permukaan usus. Selain perbedaan keberadaan faktor pelekatan, perbedaan utama dari tEPEC dan aEPEC

adalah dari pola pelekatan. Persamaan dan perbedaan lainnya dapat dilihat pada Tabel 4.1.



Gambar 4.4 *Attaching* dan *effacing* oleh EPEC pada kultur mukosa usus manusia

(Sumber: Chen dan Frankle 2005)

Kemampuan menimbulkan luka yang dimiliki oleh EPEC diakibatkan karena adanya komponen genetik berupa lokus dan dikenal sebagai lokus pemindah enterosit (LEE). Lokus ini dikodekan oleh sistem sekresi tipe III (T3SS) yang ditemukan pada beberapa bakteri Gram negatif, termasuk *E. coli*. Sistem sekresi tipe III berperan sebagai alat pengangkut protein bakteri melewati membran dalam dan luar dari sel inang. Protein yang disekresikan oleh sistem ini contohnya adalah protein efektor. Pada EPEC contoh dari protein efektor tersebut adalah *Tir*, *Map*, dan *EspF* (Dean dan Kenny 2009). Ketika *Tir* masuk ke dalam sel membran inang, *Tir* bertindak sebagai reseptor bagi intimin sehingga menarik bakteri EPEC untuk menempel pada sel.

Tabel 4.1 Persamaan dan Perbedaan EPEC tipikal dan EPEC atipikal

Jenis	EPEC tipikal	EPEC atipikal
Serotipe paling umum	O55:H6, O55:NM, O86:H34, O111:H2, O111:NM, O119:H6, O127:H6, O127:H40, O142:H6, O142:H34	O26:H11, O55:H7, O55:H43, O86:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125:H6, O128:H2
<i>Attaching-effacing</i> (A/E)	Ya	Ya
Plasmid EAF ( <i>BFP expression</i> )	Ada	Tidak ada
Gen Stx	Tidak	Tidak
Pola Pelekatan	Lokalisasi	Lokalisasi, Agregatif, difusi
LEE <i>region</i>	Ada	Ada
Pembawa	Manusia	Manusia, hewan

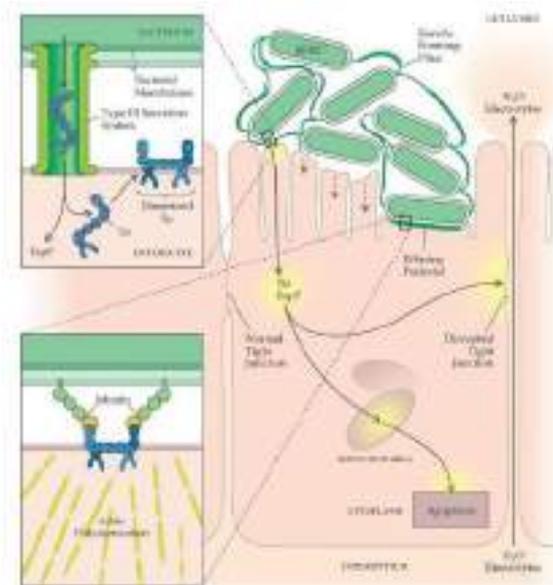
Ket: NM = Non motil

(Sumber: Gomes *et al.* 2010)

Intimin (*eae*) merupakan sejenis protein integral membran dan merupakan faktor virulensi yang dimiliki oleh EPEC sehingga keberadaannya pada EPEC sering dijadikan sebagai target gen untuk proses deteksi dan identifikasi. Sementara itu, efektor *EspF* memiliki beberapa peran dengan target utama adalah mitokondria serta dapat merusak sambungan sel (*tight junction/Tj*), mikrovili, dan menghambat pengangkutan air serta menghambat fagositosis. Diare yang ditimbulkan sebagai akibat dari adanya infeksi *E. coli* umumnya disebabkan karena kerusakan sel yaitu rusaknya penyangga sel (*tight junction*). Rusaknya sambungan sel oleh *EspF* mengakibatkan hilangnya fungsi penahan sel dan menginduksi kematian sel inang melalui apoptosis.

Peningkatan permeabilitas yang disebabkan karena rusaknya penyangga sel (Tj) akan mengubah mekanisme pengangkutan ion. Hasil uji in vitro menunjukkan bahwa keberadaan bakteri EPEC pada sel epitel hasil kultur dapat meningkatkan jumlah kalsium yang berakibat pada

penghambatan absorpsi  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  dan menstimulasi sekresi klorida oleh enterosit. Efek cepat pada sekresi ion, seperti  $\text{Cl}^-$  atau  $\text{HCO}_3^-$ , memicu onset awal diare. Mekanisme patogenesis EPEC dapat dilihat pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5. Mekanisme patogenesis EPEC  
(Sumber: Anon)

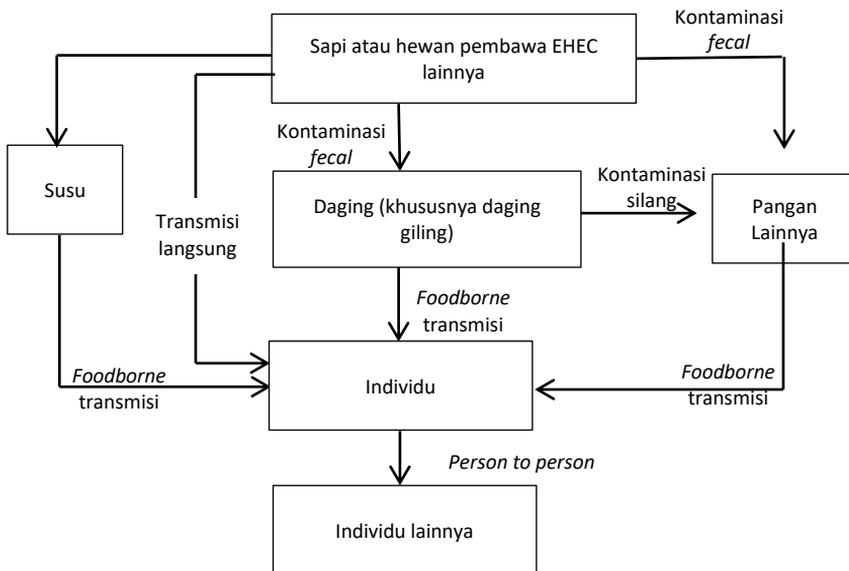
### 3. Enterohemoragik *E. coli* (EHEC)

Enterohemoragik *E. coli* merupakan kelompok *E. coli* yang dapat menyebabkan diare atau kolitis berdarah pada manusia yang dapat berujung pada sindrom hemolitik uremik (*Hemolytic Uremic Syndrom/HUS*). Sindrom HUS merupakan penyebab dari gagal ginjal akut pada anak-anak dan kematian pada orang dewasa. Pada orang dewasa, tingkat kematian akibat HUS dapat mencapai 50 % (CFSPH 2009). *Escherichia coli* O157:H7 telah diakui sebagai penyebab sindrom ini sejak

tahun 1955 dan merupakan serogrup EHEC yang paling sering menginfeksi saluran pencernaan yaitu dengan persentase sekitar 60-70 % (Watahiki *et al.* 2014). Serogroup lain yang juga dapat menjadi penyebab diare berdarah dan HUS termasuk anggota EHEC adalah strain O26, O91, O103, O104, O111, O113, O117, O118, O121, O128, dan O145. Gejala yang ditimbulkan akibat mengonsumsi makanan yang terkontaminasi EHEC ditandai dengan kram perut parah, diikuti dengan diare berdarah. Masa inkubasi biasanya sekitar 3-9 hari. Penyakit lainnya karena mikroba ini adalah gangguan pada sistem saraf pusat yang menyebabkan pasien mengalami pembekuan darah di otak dan dapat menyebabkan kematian.

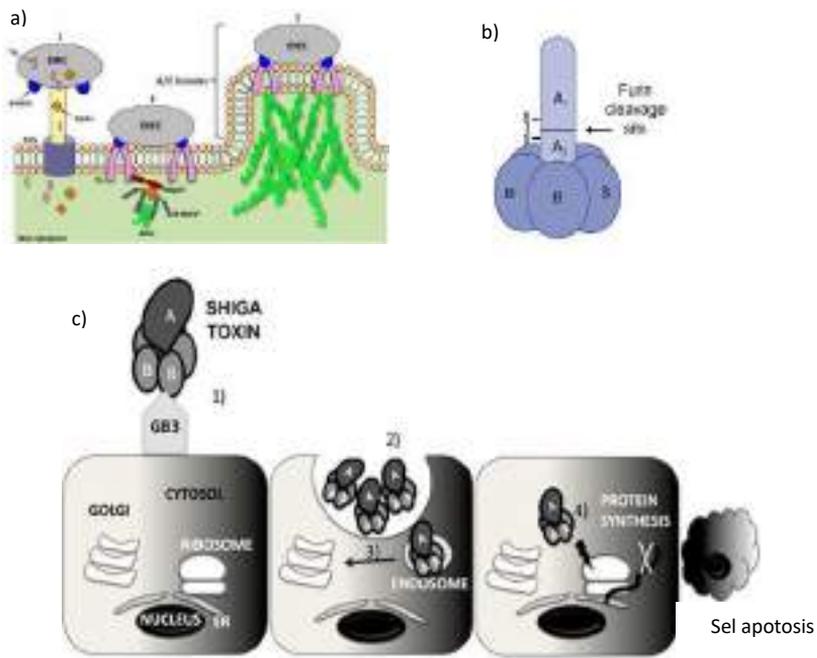
Enterohemoragik *E. coli* ditransmisikan melalui rute *fecal-oral*. Pangan yang berasal dari hewan, seperti daging, produk susu yang tidak dipasteurisasi, atau sayuran yang telah terkontaminasi merupakan pembawa transmisi utama dari penyebaran EHEC ke manusia (Karmali 2004). Gambar 4.6 menunjukkan skema transmisi EHEC pada manusia. Strain EHEC memiliki faktor virulensi yang berbeda-beda. Faktor virulensi utama EHEC yaitu *shiga-like* toksin 1 (*stx1*) dan *shiga-like* toksin 2 (*stx2*), serta lokus pemindah enterosit (LEE) yang bertanggungjawab terhadap adhesi intimin pada sel inang.

Mekanisme patogenesis intimin dari EHEC menyerupai dengan yang terjadi di EPEC. Bakteri EHEC juga memiliki kemampuan untuk menyebabkan luka pada usus dengan mengikis atau menghancurkan mikrovili karena sama sama memiliki komponen genetik lokus pemindah enterosit (LEE) yang mengekspresikan intimin dan *Tir* melalui sistem sekresi tipe III (T3SS). Bakteri EHEC yang sudah menempel pada membran inang menyebabkan polimerisasi aktin dan akan merusak sitoskeleton yang berperan dalam menyokong dan mempertahankan bentuk sel (Gambar 4.7a).



Gambar 4.6 Skema transmisi EHEC  
(Sumber: Manning 2010)

Selain intimin, EHEC juga memproduksi toksin shiga yang dikodekan oleh bakteriofag yang menginfeksi bakteri. Struktur dari toksin shiga terdiri dari satu sub unit A (A1 dan A2) dengan ukuran sekitar 32 kDa dan 5 sub unit B dengan ukuran 7.7 kDa (Gambar 4.7b). Shiga toksin dapat menghambat sintesis protein dan menginduksi terjadinya apoptosis. Toksin shiga pada EHEC ada 2 jenis, yaitu toksin shiga 1 (stx1) dan toksin shiga 2 (stx2). Stx1 dan Stx2 hanya membagi 55% sekuen asam amino yang sama dan stx1 yang dihasilkan EHEC menyerupai dengan stx yang dihasilkan dari *Shigella* dengan perbedaan hanya terletak pada asam amino tunggal pada katalitik sub unit A.



Gambar 4.7. (a) attaching-effacing oleh EHEC; (b) struktur toksin shiga; (c) mekanisme patogenesis toksin shiga

Mekanisme patogenesis EHEC dimulai dengan berikatannya sub unit B toksin dengan reseptor pada permukaan membran sel inang. Reseptor yang berperan dalam ikatan tersebut adalah reseptor *globotriaosylceramide* (Gb3) dan *globotetraosylceramide* (Gb4) (Betz *et al.* 2011). Toksin yang telah menempel pada membran kemudian melakukan endositosis dan kemudian dipindahkan dari endosom ke jaringan trans golgi. Pada jaringan ini, sub unit A dari toksin pecah menjadi 2 bagian, yaitu A1 dan A2 oleh enzim furin. Sub unit A1 pada toksin berperan dalam menghambat sintesis protein dan menyebabkan kematian sel (apoptosis) (Rahal *et al.* 2012). Toksin shiga mampu menembus monolayer epitel usus kemudian menyebar melalui aliran darah. Infeksi yang lebih parah yang ditimbulkan oleh EHEC seperti

hemolitik uremik (HUS) menunjukkan bahwa toksin shiga telah menyerang ginjal atau sistem syaraf pusat.

#### **4. Enteroinvasif *E. coli* (EIEC)**

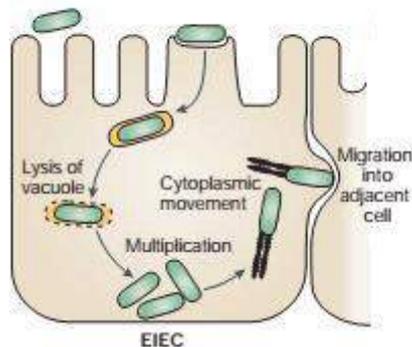
Enteroinvasif *E. coli* pertama kali diidentifikasi pada tahun 1944, yang awalnya disebut "*paracolon bacillus*", tetapi hasil analisis lanjut menyatakan bakteri tersebut sebagai *E. coli* O124. Enteroinvasif *E. coli* bersifat non motil, tidak dapat memfermentasi laktosa, dan bersifat *anaerogenik*. Selain itu, patogenesis EIEC cukup berbeda jika dibandingkan dengan *E. coli* lainnya tetapi identik dengan shigellosis (yang disebabkan oleh *Shigella*) yaitu infeksi disebabkan oleh penetrasi bakteri dan kerusakan mukosa usus. Studi filogenetik terbaru menunjukkan bahwa *Shigella* dan EIEC membentuk sifat umum dan karakteristik yang sama (Croxen dan Finlay 2010). Van den Beld dan Reubsaet (2012) menyebutkan bahwa strain EIEC memiliki beberapa karakteristik biokimia seperti strain *E. coli* patogen lainnya tetapi EIEC juga mempunyai kemampuan untuk menyebabkan disentri dengan mekanisme invasi yang sama seperti *Shigella*.

Gejala yang ditimbulkan ketika seseorang terinfeksi EIEC adalah menggigil, demam, sakit kepala, nyeri otot, kram perut, dan diare. Penyakit dapat timbul 8 sampai 24 jam setelah konsumsi makanan atau air yang mengandung EIEC. Studi menunjukkan bahwa untuk menimbulkan penyakit pada orang dewasa, maka setidaknya diperlukan  $10^6$  sel EIEC (FDA 2011). Penularan EIEC umumnya berasosiasi dengan air atau pangan yang terkontaminasi feces serta penularan *person-to-person*. Jumlah kasus infeksi akibat EIEC cukup rendah jika dibandingkan dengan kasus yang diakibatkan *E. coli* lainnya. Pada tahun 2012 dilaporkan terjadi 109 kasus infeksi di Itali, dan 6 kasus diakibatkan oleh EIEC (O96:H19) yang mengkontaminasi sayuran yang disajikan di kantin (Escher *et al.* 2014).

EIEC memiliki kemampuan untuk menyerang (menginvasi) sel jaringan kolon. Kemampuan ini disebabkan karena adanya faktor

virulensi spesifik berupa plasmid invasi (*invasion plasmid = Ip*) dengan berat molekul 220 kb yang dikode oleh sistem sekresi tipe III (T3SS) pada lokus eksresi membran *Ipa* yang diperlukan untuk proses invasi, ketahanan sel, serta apoptosis makrofag (Croxen dan Finlay 2010). Selain itu, EIEC juga menghasilkan satu atau lebih sitotoksin yang dapat merusak sel sehingga menimbulkan penyakit yang lebih serius (Pawloski *et al.* 2009).

Tahap pertama dari patogenesis EIEC adalah dimulai dengan terjadinya penetrasi sel EIEC ke dalam sel epitelia, diikuti oleh lisis vakuola. Ketika di dalam sel, EIEC menggandakan diri kemudian bergerak menuju sitoplasma dan menginvasi sel di sampingnya. Pergerakan dari EIEC di dalam sel dibantu oleh aktin yang terbentuk pada EIEC. Bakteri EIEC juga mampu menginfeksi makrofag dan menginduksi kematian sel melalui apoptosis (Gambar 4.8).



Gambar 4.8 Skema patogenitas EIEC  
(Sumber: Kaper *et al.* 2004)

### 5. Enteroagregatif *E. coli* (EAEC)

Enteroagregatif *E. coli* pertama kali diidentifikasi pada tahun 1983 dan diketahui sebagai penyebab diare pada tahun 1987 (Boisen *et al.* 2013). Enteroagregatif *E. coli* merupakan jenis *E. coli* yang berkaitan erat

dengan diare akut pada anak-anak serta penyebab dari kasus diare *traveller* kedua setelah ETEC (Croxen dan Finlay 2010). Selain itu, EAEC diketahui pula dapat menyebabkan inflamasi karena infeksi, namun mekanisme yang lebih rinci dari patogenesis EAEC masih terbatas. Dosis infeksi EAEC bergantung pada jenis virulensi yang dimiliki oleh bakteri tersebut. Kebanyakan orang yang terinfeksi EAEC akan mengalami diare yang disertai dengan darah serta lendir. Pada banyak kasus, diare akan berlangsung selama lebih dari 14 hari (Manning 2010). Penularan EAEC umumnya bersifat *fecal-oral*. Beberapa hasil studi menunjukkan potensi risiko penyebaran infeksi EAEC melalui pangan. Sebuah studi menunjukkan bahwa EAEC dapat bertahan dalam pangan yang memiliki pH rendah, seperti saus yang ditambahkan pada salad di Amerika (Adachi *et al.* 2002), berpotensi dapat bertahan pada sereal hasil fermentasi yang digunakan sebagai makanan balita (Kingamkono *et al.* 1999) serta dapat mengkontaminasi keju yang tidak dipasteurisasi (Scavia *et al.* 2008).

Enterogregatif *E. coli* merupakan patotipe dari *diarrheagenic E. coli* dengan karakteristik utamanya adalah pola pelekatan yang bersifat agregasi (*aggregative adherence* = AA), yaitu terikatnya bakteri EAEC ke sel epitel menyerupai tumpukan bata. Pola pelekatan tersebut dikode oleh gen yang berada pada plasmid sehingga disebut gen *pAA*. Plasmid berukuran 100 kb ini adalah gen yang diperlukan untuk biogenesis AAF (*adherence aggregative fimbriae*). Faktor virulensi EAEC lainnya berupa enterotoksin yang dihasilkan oleh organisme ini, yaitu toksin stabil panas agregatif (EAST-1) yang dikode oleh gen *astA* yang terdapat pada plasmid yang sama seperti gen *fimbriae*. Tetapi plasmid yang membawa gen virulensi EAEC ini juga dapat ditemukan di banyak isolat komensal *E. coli*. Beberapa virulensi dari EAEC dapat dilihat pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Faktor virulensi dan enterotoksin EAEC

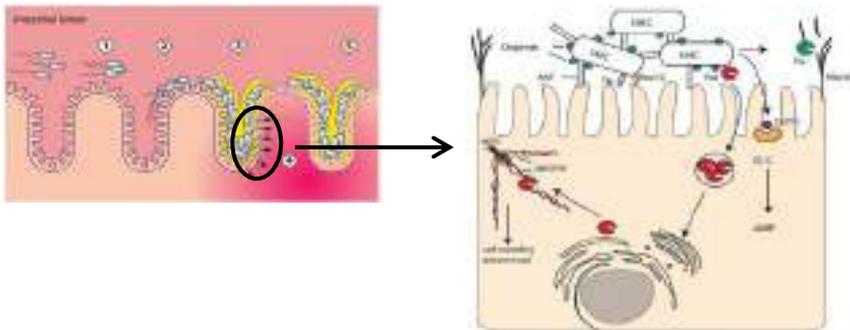
Virulensi	Fungsi	Lokasi
aggR	Aktivator transkripsi dari gen virulensi	Plasmid
AAF/1– AAF/IV	Pelekatan frimbria secara agregatif (4 jenis)	Plasmid
Aap	Protein antiagregasi dispersin	Plasmid
aatA	Protein transporter dispersin	Plasmid
fis	Regulasi ekspresi AAF	Kromosom
shf	Protein holomog pengkode Shigella flexneri	Plasmid
yafK	Regulasi ekspresi AAF	Kromosom
astA	Enterotoksin stabil panas EAST1	Plasmid
pet	Plasmid pengkode toksin	Plasmid
sepA	Protein ekstraseluler Shigella	Plasmid
sat	Toksin sekresi autotransporter	Kromosom
set	Enterotoksin Shigella 1	Kromosom
pic	Protein yang terlibat dalam kolonisasi EAEC	kromosom

Sumber: Jensen *et al.* 2014

Identifikasi EAEC dapat dilakukan dengan menggunakan DNA probe (yang diberi kode CVD432) dari plasmid pAA yang merupakan target gen spesifik bagi EAEC yang memiliki sensitivitas yang sangat bervariasi pada kisaran antara 20-89 % (Okeke 2009). Probe CVD432 menunjukkan kesesuaian dengan gen *aatA*, yang mengkode protein dispersin (Aap) yang juga diregulasi oleh *aggR*, yaitu merupakan aktivator transkripsi gen virulensi.

Mekanisme patogenesis EAEC meliputi 5 tahap, yaitu (1) bakteri EAEC yang ada pada saluran pencernaan; (2) penempelan bakteri ke mukosa usus oleh suatu faktor penempelan AAFs; (3) kenaikan produksi lendir (mucus) oleh EAEC menyebabkan pembentukan biofilm di atas

permukaan sel mukosa; (4) pelepasan toksin dari EAEC yang menginduksi kerusakan sel dan meningkatkan sekresi; (5) pembentukan biofilm tambahan. Mekanisme patogenesis disajikan pada Gambar 4.9. Sekresi toksin pada tahap ke 4 patogenesis EAEC berperan penting pada terjadinya diare.



Gambar 4.9 Tahap patogenesis EAEC

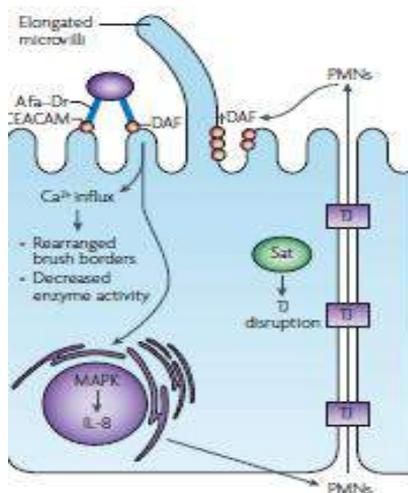
Sumber: Jensen *et al.* 2014

## 6. Difusi Adheren *E. coli* (DAEC)

*Escherichia coli* patogen ke enam yang termasuk dalam kelompok *E. coli* penyebab diare adalah DAEC. Faktor-faktor virulensi yang dimiliki DAEC berbeda dengan gen virulensi yang ditemukan pada *E. coli* lainnya (EAEC, ETEC, atau EPEC). Patogenitas dari DAEC belum terlalu banyak dikaji. Ada dua kategori DAEC yang telah teridentifikasi, pertama, DAEC yang mengekspresikan adhesin Afa/Dr, yaitu kelompok DAEC yang mempunyai struktur *fimbriae* yang langsung menempel pada sisi spesifik sel inang atau disebut *fimbriae* F1845. Sebanyak 75 % strain DAEC mempunyai F1845, (Garcia-Angulo *et al.* 2013). Kelompok DAEC yang kedua tidak mengekspresikan Afa/Dr, tetapi mengekspresikan gen *aida* menyandi adhesin yang terlibat dalam penempelan secara difusi (AIDA). AIDA merupakan protein (*autotransporter*) yang dikode oleh plasmid berukuran 100 kDa. *E. coli* jenis DAEC merupakan penyebab

diare pada anak-anak usia 18 bulan sampai 5 tahun (Le Bouguenec dan Servin 2006). Pada orang dewasa, keberadaan DAEC dalam tubuh (saluran pencernaan) tidak menimbulkan gejala infeksi (asimtomatik), hal tersebut karena anak-anak dibawah 5 tahun masih memiliki struktur dan fungsi epitel usus yang belum kokoh. Hasil identifikasi pada anak-anak yang terinfeksi DAEC (anak-anak yang mengalami diare) menunjukkan bahwa gen *sat* ditemukan pada hampir semua strain DAEC yang mengandung virulensi Afa/Dr.

Mekanisme patogenesis DAEC dimulai dengan menempelnya Afa dan Dr dengan suatu faktor yang disebut DAF, yang ditemukan dipermukaan usus. Menempelnya Afa-Dr dan DAF menyebabkan agregasi dari molekul DAF di bawah bakteri. Penempelan tersebut juga memicu sinyal pengatur  $Ca^{2+}$ , sehingga dapat menyebabkan kerusakan mikrovili dan mengakibatkan penurunan aktivitas enzim yang terlibat dalam proses sekresi dan absorpsi usus, dan akhirnya memicu terjadinya diare. Mekanisme patogenesis disajikan pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10 Skema patogenitas DAEC (Sumber: Croxen dan Finlay 2010)

## DAFTAR PUSTAKA

- Adachi JA, Mathewson JJ, Jiang ZD, Ericsson CD, DuPont HL. 2002. Enteric pathogens in Mexican sauces of popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *Annals of Internal Medicine*. 136: 884–887.
- Boisen N, Krogfelt KA, Nataro JP. 2013. Enteroagregative *Escherichia coli*. Di dalam *Escherichia coli Pathotypes and Principles of Pathogenesis*, 2<sup>nd</sup> ed. Donnenberg MS, Editor. Elsevier Academic Press.
- Bouzari S, Aslani MM, Oloomi M, Jafari A, Dashti A. 2011. Comparison of multiplex PCR with serogrouping and PCR-RFLP of *fliC* gene for the detection of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Braz J Infect Dis*. 15(4): 365-369
- [CFSPH] Center of Food Security and Public Health. 2009. Enterohemorrhagic *E. coli* Infection. Iowa: College of Veerinary Medicine Iowa State University.
- Croxen MA, Finlay BB. 2010. Molecular mechanism of *Escherichia coli* pathogenicity. <http://www.nature.com/review/micro>. doi:10.1038/nrmicro2265
- Dean P, Kenny B. 2009. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr opin Microbiol*. 12: 101-109
- Escher M, Scavia G, Morabito S, Tozzoli R, Maugliani A, Cantoni S, Fracchia S, Bettati A, Casa R, Gesu GP *et al*. 2014. A severe foodborne outbreak of diarrhoea linked to a canteen in Italy caused by enteroinvasive *Escherichia coli*, an uncommon agent. *Epidemiol Infect*. 142: 2559-2566
- [FDA] Food and Drug Administration. 2011. BAM: Diarrheagenic *Escherichia coli*.

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>.

- Feng P. 2015. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fresh produce: A food safety dilemma. Di dalam: *Enterohemorrhagic Escherichia coli and other Shiga Toxin Producing E. coli*. Sperandio V dan Hovde CJ, editor. Amerika: ASM Press.
- Flores J, Okhuysen PC. 2010. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Di dalam: *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Torres AG ,Editor. Bentham Science Publisher Ltd
- Garcia-Angulo VA, Farfan MJ, Torres AG. 2013. Hybrid and potentially pathogenic *Escherichia coli* strains. Di dalam *Escherichia coli Pathotypes and Principles of Pathogenesis*, 2<sup>nd</sup> ed. Donnenberg MS, Editor. Elsevier Academic Press.
- Gomes TAT, Pedrajo BG. 2010. Enteropathogenic *Escherichia coli*. Di dalam: *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Torres AG, editor. Bentham Science Publisher Ltd.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2: 123-140
- Karmali MA. 2004. Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Mol Biotechnol.* 26: 117-122
- Kingamkono R, Sjögren E, Svanberg U. 1999. Enteropathogenic bacteria in faecal swabs of young children fed on lactic acid-fermented cereal gruels. *Epidemiol Infect.* 122: 23-32.
- LeBouguenec C, Servin AL. 2006. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 256:185–194. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00144>.
- Manning SD. 2010. *Deadly Diseases and Epidemics: Escherichia coli Infection*, Ed ke-2. New York: Chelsea Publishers
- Montzer A. 2016. Whole genome sequencing of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): identification of ETEC lineages and novel colonization factors. Thesis. University of Gothenburg.

- Navarro-Garcia F, Ellias WP, Flores J, Okhuysen PC. 2010. Enteroagregative *Escherichia coli*. Di dalam Pathogenic *Escherichia coli* in Latin Amerika. Torres AG (ed). Betham Books.
- Okeke IN. 2009. Diarrheagenic *Escherichia coli* in sub-Saharan African: status, uncertainties, and necessities. *J Infect Dev Ctries*. 3(11): 817-842.
- Pawloski SW, Warren CA, Guerrant R. 2009. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. *Gastroenterology*. 136: 1874-1886
- Porter CK, Riddle MS, Tribble DR, Bougeois AL, McKenzie R, Isidean SD, Sebeny P, Savarino SJ. 2011. A systematic review of experimental infections with enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Vaccine*. 29: 5869 - 5885
- Scavia G, Staffolani M, Fisichella S, Striano G, Colleta S, Ferri G, Escher M, Minelli F, Caprioli A. 2008. Enteroagregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. *J Med Microbiol*. 57(9): 1141-1146
- Torres AG, Hernande MMPA, Laguna YM. 2010. Overview of *Escherichia coli*. Di dalam: *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Torres AG, editor. Bentham Science Publisher Ltd.
- Van den Beld MJC, Reubsaet FAG. 2012. Differentiation between Shigella, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *Eur. J Clin Microbiol Infect. Dis*. 31: 899-904
- Watahiki M, Isobe J, Kimata K, Shima T, Kanatani JI, Shimizu M, Nagata A, Kawakami K, Yamada M, Izumiya H *et al*. 2014. Characterization of enterohemorrhagic coli O111 and O157 strains isolated from outbreak patients in Japan. *J Clin Microbiol*. 52(8): 2757-2763
- [WHO] World Health Organization. 1987. Programme for control of diarrhoeal disease. Manual for laboratory investigation of acute enteric infections. Geneva: Switzerland.
- Williams ND, Torres AG, Lloyd SJ. 2010. Evolution and epidemiology of diarrheagenic *Escherichia coli*. Di dalam: Torres AG, editor.

*Pathogenic Escherichia coli in Latin America.* USA: Bentham Science Publisher Ltd. hlm 8-24.

## V.

# PREVALENSI *ESCHERICHIA COLI* PATOGEN PADA PANGAN

Kasus keracunan pangan yang terjadi di Indonesia maupun Internasional selalu dikaitkan dengan konsumsi pangan atau air yang terkontaminasi oleh mikroba patogen atau senyawa toksik. *Escherichia coli* patogen merupakan salah satu mikroba yang sering diduga menjadi penyebab keracunan yang ditandai dengan gejala diare. Kasus keracunan yang dilaporkan pada tahun 1975 di Amerika Serikat disebabkan karena air yang terkontaminasi ETEC. Demikian juga kasus keracunan yang dilaporkan pada tahun 1982 di Korea disebabkan konsumsi hamburger yang terkontaminasi EHEC O157:H7 (Jo 2004), kasus tersebut bahkan mendapat perhatian besar dari berbagai pihak. Setidaknya telah terjadi sekitar 350 wabah EHEC O157:H7 yang dikaitkan dengan konsumsi pangan atau air di Amerika Serikat antara tahun 1982 - 2002, dan diperkirakan strain O157:H7 menyumbang sekitar 50 % dari total infeksi yang disebabkan oleh EHEC (Clive dan Peter 2009). Selain itu, beberapa wabah keracunan juga dikaitkan dengan konsumsi produk pangan yang terkontaminasi ETEC dan EPEC seperti keju, mayonais, kepiting, dan salad.

Kejadian keracunan pangan dapat berasal dari bahan baku yang terkontaminasi sejak awal dan tidak hilang selama proses pengolahan, atau disebabkan oleh adanya kontaminasi silang pasca pengolahan atau karena penanganan yang salah selama distribusi. Bahan baku yang terkontaminasi *E. coli* patogen merupakan faktor yang menyebabkan terdapatnya *E. coli* pada produk akhir, terutama jika proses pengolahan

yang dilakukan tidak mampu menghilangkan kontaminan ini. Beberapa bahan baku utama yang menyebabkan kasus keracunan pangan yang pernah dilaporkan diantaranya yaitu susu mentah, daging sapi mentah, serta buah-buahan dan sayuran mentah. Sumber utama kontaminasi pada bahan baku tersebut berasal dari kontaminasi *E. coli* dari kotoran hewan. Kasus keracunan pangan akibat keju berasal dari bahan baku susu yang tidak dipasteurisasi yang telah terkontaminasi *E. coli* patogen (CDC 1999). Demikian juga kasus keracunan pangan dari jus apel disebabkan karena apel yang terkontaminasi dan tidak melalui proses pasteurisasi (Besser *et al.* 1993). Salah satu penyebab kontaminasi *E. coli* pada daging olahan disebabkan karena proses pemasakan daging sapi yang kurang matang (Kassenborg *et al.* 2004). Sebuah survei di USA pada tahun 1996 menunjukkan bahwa 19.7 % penduduk mengonsumsi hamburger dengan daging yang belum matang (*undercooked*) (USDA-FSIS 2001). Di Irlandia, survei pada 500 orang menunjukkan bahwa 87 % konsumen telah mempersiapkan burger daging sapi secara matang (*well done*), 12 % dengan tingkat kematangan sedang (*medium rare*), dan 1 % masih mentah (*rare*) (Mahon *et al.* 2003).

Air menjadi salah satu penyebab keracunan oleh *E. coli* patogen. Secara umum, kurang lebih sepertiga penduduk dunia menderita berbagai penyakit yang ditularkan melalui air minum yang terkontaminasi oleh mikroba (World Health Organization 2006). Setiap tahun diperkirakan sekitar 13 juta orang meninggal akibat infeksi yang berasal dari air minum, 2 juta diantaranya adalah bayi dan anak-anak. Mengonsumsi air yang terkontaminasi oleh mikroba patogen, baik air minum atau air yang ditambahkan ke dalam pangan dapat menimbulkan berbagai penyakit gastrointestinal (WHO 2006). Standar air minum yang digunakan tidak boleh mengandung *E. coli* dan bebas dari bakteri koliform atau dinyatakan sebagai 0 CFU/100 mL sampel air (WHO 2004).

Proses pembekuan air pada pengolahan es batu tidak membunuh semua bakteri, banyak bakteri yang dapat bertahan hidup pada suhu yang rendah untuk jangka waktu yang relatif lama. Studi

identifikasi *E. coli* patogen pada minuman es dan sumber cemarannya menunjukkan bahwa 1 dari 25 sampel minuman es di Kota Bogor terkontaminasi *E. coli* jenis EHEC. Berdasarkan hasil analisis sumber cemaran kontaminasi *E. coli* berasal dari es batu, air, serta perlengkapan dan fasilitas sanitasi yang digunakan untuk membuat minuman es (Nurjanah *et al.* 2017).

Studi di beberapa negara menunjukkan bahwa es batu yang digunakan sebagai pangan yang dibuat oleh pabrik es mengandung *E. coli* dan bakteri koliform. Kehadiran bakteri tersebut disebabkan rendahnya kualitas sumber air atau kurangnya higiene dalam pembuatan dan pengelolaannya. Sebagai contoh, satu es dari delapan rumah makan di China mengandung bakteri *E. coli* penyebab penyakit gastrointestinal (Segall 2008). Di Indonesia, penelitian Nababan *et al.* (2017) melaporkan bahwa 6.34% sampel minuman es teridentifikasi positif mengandung bakteri *E. coli* dan 0.7% diantaranya merupakan jenis ETEC.

Peluang kejadian (prevalensi) kontaminasi bakteri *E. coli* dan *E. coli* patogen pada beberapa produk pangan dan atau air di berbagai negara sangat bervariasi. Kejadian cemaran *E. coli* cukup tinggi pada beberapa jenis pangan, seperti daging, susu, sayuran, dsb. Prevalensi *E. coli* pada beberapa produk pangan dari berbagai negara disajikan pada Tabel 5.1.

Hasil survei produk pangan di 16 negara anggota Uni Eropa pada tahun 2006 yang dirangkum oleh EFSA (2007b) menunjukkan adanya *E. coli* patogen (EHEC) dalam daging dan produk daging mentah, meskipun dengan prevalensi yang rendah. Di Indonesia prevalensi bakteri *E. coli* dalam produk pangan hewani khususnya daging sapi dan daging ayam (Tabel 5.1) diidentifikasi cukup tinggi, namun tidak ada jenis *E. coli* patogen yang teridentifikasi (Dewantoro *et al.* 2009).

Tabel 5.1 Prevalensi bakteri *E. coli* pada pangan

Jenis Pangan	Prevalensi (%)	Referensi
<b>Daging :</b>		
Daging sapi (Eropa)	0.3 (n=4443)	EFSA (2007)
Daging sapi cincang (Eropa)	1.9 (n=3064)	
Daging domba (Eropa)	1.8 (n=381)	
Daging babi (Eropa)	0.8 (n=3057)	
Daging ayam (Indonesia)	DKI Jakarta (31.25) Serang (27.78) Bekasi (27.27) Bogor (12.50)	Dewantoro <i>et al.</i> (2009)
<b>Susu :</b>		
Susu sapi (Trinidad)	27.7 18.5	Adesiyun <i>et al.</i> (1997)
Susu domba (Spanyol)	3.51 (n=84)	Caro <i>et al.</i> (2006)

Tabel 5.1 Prevalensi bakteri *E. coli* pada pangan (Lanjutan)

Jenis Pangan	Prevalensi (%)	Referensi
<b>Sayuran:</b>		
Sayuran mentah (Republik Ceko)	26.4 (n=91)	(Alena <i>et al.</i> 2013)
Kecambah (Republik Ceko)	53.3	
Selada (Republik Ceko)	38.9	(Seowa <i>et al.</i> 2012)
Sayuran organik	40.0	(Almualla <i>et al.</i> 2010)
Salad (Uni Emirat Arab)	20.0	(Abadias <i>et al.</i> 2008)
Salad (Spanyol)	16.7	(Sagoo <i>et al.</i> 2003)
Salad (United Kingdom/UK)	1.3	
Salad (Meksiko)	7	(Javier <i>et al.</i> 2012)
<b>Air dan Es:</b>		
Air minum isi ulang (Indonesia)	31.6	(Athena 2003)
Es balok (Indonesia)	46.4	(Taniawati 2001)
Es Krim (Indonesia)	37.5 (n=8)	(Purnamasari 2009)
Jus buah (Indonesia)	100.0 (n=20)	(Mukhlisoh 2009)
Minuman es (Indonesia)	6.34	(Nababan <i>et al.</i> 2017)

Tingkat prevalensi bakteri *E. coli* di Indonesia yang tinggi, dikarenakan oleh proses penanganan hewan yang belum baik. Kontaminasi *E. coli* pada daging ayam umumnya berasal dari ruangan, peralatan maupun meja tempat pemotongan ayam, serta air yang digunakan selama proses pemotongan hingga pengolahan daging ayam. Selain itu, peningkatan jumlah *E. coli* juga dipengaruhi oleh faktor intrinsik dari produk pangan tersebut.

Pertumbuhan mikroba patogen menjadi lebih besar dari kontaminasi awal dapat terjadi selama distribusi dan penyimpanan, baik di produsen maupun di ritel. Sebagai contoh karena penanganan dan penggunaan suhu penyimpanan yang tidak tepat, penanganan daging yang tidak tepat selama pengemasan, atau adanya kebocoran dari bahan. *Escherichia coli* O157:H7 terdapat pada permukaan karkas daging sapi akibat dari kontaminasi silang dari kulit sapi atau isi ususnya. Sebuah survei di USA untuk memperkirakan korelasi *E. coli* O157:H7 dalam kotoran dan kulit ternak yang disembelih di pabrik pengolahan daging. Hasilnya menunjukkan *E. coli* O157:H7 pada kotoran dan kulit ternak secara signifikan berkorelasi dengan kontaminasi pada karkas. Sebanyak 28 % feses dan 11 % kulit ternak diketahui terkontaminasi EHEC O157 (Elder *et al.* 2000). Proses pembuangan bagian karkas yang terlihat kotor, pencucian karkas dengan air panas, pencucian dengan dekontaminan asam organik dapat mengurangi jumlah *E. coli* O157: H7.

Produk hewani lainnya seperti susu mentah dapat terkontaminasi oleh *E. coli* patogen melalui kotoran sapi yang mencemari ambung dan puting sapi selama proses pemerahan. Oleh karena itu mengonsumsi susu mentah dan olahannya yang terbuat dari susu mentah dapat terinfeksi oleh *E. coli* patogen. Selain pangan hewani, kontaminasi *E. coli* juga dapat terjadi pada sayuran mentah, terutama daun-daunan hijau, kecambah, ataupun pada air minum dan es. Keracunan pangan yang berasal dari sayuran mentah yang terkontaminasi oleh bakteri patogen terus meningkat di berbagai negara berkembang dan menyebabkan kematian, morbiditas, serta kerugian

ekonomi (Harapas *et al.* 2010). Sayuran dan buah mentah serta jus yang tidak dipasteurisasi rentan terhadap kontaminasi *E. coli*. Sayuran hasil pertanian dapat terkontaminasi oleh bakteri patogen ketika tumbuh, selama pemanenan, pencucian, pengupasan, pengemasan, dan persiapan untuk dikonsumsi (Sivapalasingam *et al.* 2004).

Tabel 5.2 Salad yang positif mengandung bakteri *E. coli* patogen

<b>Tipe Salad</b>	<b>Komposisi Salad</b>	<b><i>E. coli</i> yang teridentifikasi</b>	<b>Virulensi</b>
Bayam	Bayam mentah ,	1, ETEC	<i>ST</i>
	tomat, jamur	1, Non-O157 STEC	<i>stx1</i>
<i>Mixed</i>	Selada, alpukat,	2, Non-O157 STEC, EIEC	<i>stx1 –</i>
	tomat, mentimun,	1, Non-O157 STEC	<i>stx2, ial,</i>
	kol, wortel, kecambah gandum,		<i>stx1</i>
<i>Mixed</i>	Selada, alpukat,	2, EIEC	<i>ial</i>
	kecambah, tomat,	1, Non-O157 STEC	<i>stx1</i>
	mentimun, wortel, bawang		

Keterangan : ETEC : *enterotoxigenic E. coli*, STEC : *Shiga toxin-producing E. coli*, EIEC : *enteroinvasive E. coli*, ST : *heat-stable enterotoxin*, *stx1*: *Shiga toxin 1*, *stx2* : *Shiga toxin 2*, *ial* : *invasion associated loci*.

Sumber: Javier *et al.* (2012)

Beberapa kasus keracunan pangan yang diakibatkan oleh ETEC atau EHEC di Eropa, Amerika, dan Jepang disebabkan karena konsumsi sayuran, kecambah, dan jus buah segar. Kasus keracunan pangan yang dilaporkan pada bulan Mei 2011 yaitu terjadinya *Hemolytic Uremic Syndrom* (HUS) di Jerman disebabkan oleh strain EHEC yang mengkontaminasi kecambah (Tzschoppe *et al.* 2011). Tabel 5.2 memperlihatkan kontaminasi salad oleh *E. coli* patogen. Kontaminasi bakteri *E. coli* pada sayuran mungkin berasal dari air yang

terkontaminasi dan tanah atau kondisi selama proses penanaman yang memungkinkan untuk pertumbuhan mikroba.

## DAFTAR PUSTAKA

- Besser RE, Lett SM, Weber JT, Doyle MP, Barrett TJ, Wells JG. 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA*. 269: 2217–2220.
- Beuchat LR. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect*. 4: 413 - 423.
- Cameron S, Walker C, Beers M. *et al*. 1995. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* outbreak in South Australia associated with the consumption of Mettwurst. *Communicable Disease Intelligence*. 19(3): 70 –71.
- Clive WB, Peter JM. 2009. *Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and control, second Ed*. Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition. CRC Press New York.
- Dewantoro GI, Adiningsih MW, Purnawarman T, Sunartatie T, Afiff U. 2009. Prevalance of *Escherichia coli* in frozen chicken meat which was transported through Merak pork. *J. Ilmu Pertanian Indo*. 14(3): 211-216.
- [EFSA]. European Food Safety Authority. 2007a. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal*. 130: 165 – 78.
- [EFSA]. European Food Safety Authority. 2007b. Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types; Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards, *The EFSA Journal* 579: 1– 61.

- Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, Barkocy-gallagher GA, Koohmaraie M, Laegreid WW. 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proceedings of the national academy of Sciences* 97(7):2999–3003.
- Harapas D, Premier R, Tomkins B, Franz P, Ajlouni S. 2010. Persistence of *Escherichia coli* on injured vegetable plants. *Int. J. Food Microbiol.* 138: 232–237.
- Javier CR, Jorge FCC, Eligio MR, Daniel LH. 2012. Presence of faecal coliforms *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *Int. J. Food microbiol.* 156: 176-180.
- Jo, MY. 2004. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. *Int J Food Microbiol.* 95:41 - 49.
- Kassenborg HD, Hedberg CW, Hoekstra M, Evans MC, Chin AE, Marcus R, Vugia DJ, Smith K, Ahuja SD, Slutsker L, Griffin PM. 2004. Farm visits and undercooked hamburgers as major risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: Data from a case-control study in 5 FoodNet Sites. *CID.* 38: s271-s278.
- Mahon D, Cowan C, Henschion M. 2003. Mince beef and beefburger consumption and handling practices of Irish consumers. *Technical report, Teagas, Ashtown Food Research Centre, Ashtown, Dublin 15, Ireland.*
- Nababan H, Rahayu WP, Waturangi DE, Suratmono S, Puspitasari R, Indrotristanto N, Nikastri E, Yuliangsih S, Pusparini N. 2017. Critical points and the presence of pathogenic bacteria in iced beverage processing lines. *The journal of Infection in Developing Countries* 1196: 493-500.
- Sivapalasingam S, Friedman CR, Cohen L, Tauxe RV. 2004. Fresh Produce: a Growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J Food Prot.* 67: 2342–2353.

- Tzschoppe M, Martin A, Beutin L. 2012. A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative ehec O104:h4 strain from Ready-to-eat vegetables. *Int. J. Food microbiol.* 152: 19 – 30.
- [USDA-FSIS]. 2001. Draft risk assessment of the public health impact of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. Available from (<http://www.fsis.usda.gov/>), last accessed: Okt 2015.

# VI.

## REGULASI CEMARAN *ESCHERICHIA COLI* PADA PANGAN

*Escherichia coli* patogen merupakan salah satu bakteri yang berbahaya. Apabila masuk ke dalam saluran pencernaan melalui makanan yang dikonsumsi dapat menyebabkan penyakit atau sampai kematian bila tidak tertangani bahkan untuk strain tertentu pada dosis yang sangat rendah. Dengan mempertimbangkan bahaya yang ditimbulkan akibat kontaminasi *E. coli* patogen pada pangan, maka pemerintah melalui Kementerian Kesehatan Republik Indonesia dan Badan Pengawas Obat-obatan dan Makanan (BPOM) membuat aturan tingkat maksimum cemaran *E. coli* patogen pada produk pangan, agar menjamin bahwa pangan yang dikonsumsi benar-benar aman dari ancaman bakteri *E. coli* patogen. Aturan tersebut harus diimplementasi oleh produsen pangan.

Di Indonesia regulasi terkait keberadaan *E. coli* dalam pangan telah diatur melalui Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 1096/Menkes/Per/VI/2011 tentang higiene sanitasi jasaboga yang mensyaratkan bahwa angka bakteri *E. coli* pada pangan adalah 0 per g contoh pangan. Hal ini berarti dalam pangan tidak boleh terdapat bakteri *E. coli*. Selain itu berdasarkan Peraturan Kepala BPOM No. HK.00.06.1.52.4011 (2009) juga telah mengatur batas maksimum cemaran *E. coli* pada beberapa produk pangan. Saat ini batas cemaran terbaru yang diberlakukan adalah PerKa BPOM No 16 tahun 2016

tentang Cemaran dalam Pangan dan Kriteria sampling seperti dapat dilihat pada Tabel 6.1.

Regulasi Uni Eropa No. 99/2003 (EC 2003) memberlakukan investigasi epidemiologi secara menyeluruh terhadap kasus keracunan pangan yang terjadi untuk mengidentifikasi sumber kontaminan, serta pola penyebarannya. Selain itu, semua pelaku bisnis pangan harus memenuhi persyaratan dalam hal praktik kebersihan yang baik sesuai dengan regulasi No. 852/2004 (EC 2004) yaitu untuk mencegah kontaminasi pangan yang berasal dari hewan dan tumbuhan, serta harus menerapkan prosedur pengolahan pangan berdasarkan prinsip-prinsip HACCP untuk memantau secara efektif risiko yang mungkin timbul. Standar untuk keberadaan *E. coli* pada pangan telah ditetapkan dalam regulasi No. 2073/2005 (EC 2005) yang ditujukan untuk buah dan sayuran siap santap, jus, daging, produk susu, produk telur, krustasea dan kekerangan (Tabel 6.2). Pangan yang mengandung *E. coli* penghasil toksin shiga (STEC/EHEC) dianggap tidak aman untuk konsumsi manusia dan harus ditarik dari pasar sesuai dengan regulasi No. 178/2002 (EC 2002).

Setelah kasus KLB besar yang terjadi di Perancis dan Jerman akibat *E. coli* yang memproduksi toksin Shiga pada kecambah pada bulan Mei 2011, *Europa Food Safety Authority* (EFSA) memberikan persyaratan tambahan pada produk kecambah seperti pada Tabel 6.2. Negara-negara Eropa sangat mewaspadaai penyebaran bakteri *E. coli* terutama dari strain baru. Negara-negara Eropa bahkan melarang mengimpor sayuran dari luar kawasan Eropa. Mewabahnya penyakit mematikan akibat strain baru *E. coli* dipastikan karena konsumsi sayuran yang tidak dicuci. Penyakit yang dapat timbul oleh bakteri ini sangat berbahaya dan mematikan, karena bakteri ini resisten terhadap antibiotik.

Tabel 6.1 Batas cemaran *E. coli* dalam pangan di Indonesia

No.	Kategori Pangan	Jenis Pangan Olahan	n	c	m	M
1	Produk-produk susu dan analognya	Keju tanpa pemeraman, dibuat dari susu pasteurisasi	5	3	10	10 <sup>2</sup>
2	Buah dan sayuran	Buah beku; buah kering; kelapa parut kering; buah dalam cuka, minyak dan larutan garam; buah bergula	5	2	10	10 <sup>2</sup>
		buah dalam kemasan (pasteurisasi); Jem, jeli, dan marmalad; Nata de coco	5	0	<3 APM/g	NA
		Sayuran beku; sayuran kering yang siap diolah;	5	1	<3 APM/g	NA
3	Serealia dan produk serealia	Tepung dan pati	5	2	7.4 APM/g	11 APM/g
		Tahu segar	5	0	<3 APM/g	NA

Tabel 6.1 Batas cemaran *E. coli* dalam pangan di Indonesia (Lanjutan)

No.	Kategori Pangan	Jenis Pangan Olahan	n	c	m	M
4	Daging	Produk olahan daging, daging unggas dalam bentuk utuh atau potongan	5	2	10 koloni/g	10 <sup>2</sup> koloni/g
5	Ikan	Krustase (udang laut, lobster, kepiting rajungan)	5	1	<3 APM	3.6 APM/g
6	Minuman	Air mineral alami	5	0	-/250 mL	NA
		Sari buah dan sari sayuran tidak dipasteurisasi	5	2	10 <sup>2</sup> koloni/mL	10 <sup>3</sup> koloni/mL
		Sari buah dan sari sayuran yang dipasteurisasi; minuman rasa buah; sirup buah, sirup berperisa, sirup encer berperisa; squash, squash berperisa; sirup teh, sirup kopi;	5	0	<3 APM/mL	NA
		Minuman kopi	5	0	<1.8 APM/100 mL	NA

Tabel 6.2 Batas cemaran *E. coli* dalam pangan

Jenis Pangan	Mikroorganisme/ toksin yang di- hasilkannya	Sampling plan		Batas (CFU/g)		Tahap dimana kriteria diaplikasikan
		n	c	m	M	
Kerang, moluska, echinodermata, dan tunicates	<i>E. coli</i>	1	0	230*		Produk di pasar selama umur simpannya
Daging potong	<i>E. coli</i>	5	2	50	500	Akhir proses produksi
Karkas daging	<i>E. coli</i>	5	2	50	500	Akhir proses produksi
Keju yang terbuat dari susu atau whey yang telah mengalami perlakuan panas	<i>E. coli</i>	5	2	100	1000	Selama proses pengolahan, yang diperkirakan memiliki jumlah <i>E. coli</i> tertinggi.

Tabel 6.2 Batas cemaran *E. coli* dalam pangan (Lanjutan)

Jenis Pangan	Mikroorganisme/ toksin yang di- hasilkannya	Sampling plan		Batas (CFU/g)		Tahap dimana kriteria diaplikasikan
		n	c	m	M	
Mentega dan krim yang terbuat dari susu mentah atau susu yang telah mengalami perlakuan panas lebih rendah dari pasteurisasi	<i>E. coli</i>	5	2	10	100	Pada akhir proses poduksi
Buah dan sayuran ( <i>ready-to-eat</i> )	<i>E. coli</i>	5	2	100	1000	Pada akhir proses poduksi

Tabel 6.2 Batas cemaran *E. coli* dalam pangan (Lanjutan)

Jenis Pangan	Mikroorganisme/ toksin yang di- hasilkannya	Sampling plan		Batas (CFU/g)		Tahap dimana kriteria diaplikasikan
		n	c	m	M	
Jus buah dan Sayur yang tidak dipasteurisasi ( <i>ready- to-eat</i> )	<i>E.coli</i>	5	2	100	1000	Pada akhir proses produksi
Kecambah <sup>1</sup>	<i>Shiga toxin producing E. coli</i> (STEC) O157, O26, O111, O103, O145, dan O104 : H4	5	0	Tidak ada dalam 25 g sampel		Produk disimpan di pasaran

Keterangan : n : Jumlah sampel yang dianalisis  
c : Jumlah sampel yang diperbolehkan dengan hasil perhitungan antara m dan M  
m : Batas bawah mikroba/g  
M : Batas atas mikroba/g produk ditolak

\* : MPN/100 g daging Sumber : (EC 2005);<sup>1</sup>EFSA (2011)

Kementerian Kesehatan RI menetapkan kriteria air secara mikrobiologis pada air minum yang mengacu pada standar WHO, melalui Peraturan Menteri Kesehatan No.492/Menkes/Per/IV/2010 (Kemenkes 2010), bahwa parameter mikrobiologi untuk *E. coli* dan total bakteri koliform kadar maksimum yang diperbolehkan per 100 mL sampel adalah 0 (tidak boleh mengandung *E. coli* dan *coliform* setiap 100 mL sampel). Badan Standarisasi Nasional menerapkan Standar Nasional Indonesia (SNI) No.01-3553-2006 (BSN 2006) tentang AMDK mensyaratkan bahwa jumlah cemaran mikroba pada angka lempeng total awal maksimal  $1.0 \times 10^2$  koloni/mL saat di pabrik dan angka lempeng total akhir  $1.0 \times 10^5$  koloni/mL saat sudah di pasaran. Bakteri berbentuk *coliform* batas maksimalnya adalah < 2 APM/100mL.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [BPOM] Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2009. Peraturan No HK.00.06.1.52.4011 Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan. Jakarta.
- Tambahkan PerKa baru thn 2016 tentang cemaran mikro
- [BSN] Badan Standarisasi Nasional. 2006. Standar Nasional Indonesia (SNI) No.01-3553-2006 Tentang Air Minum Dalam Kemasan.
- [EC] European Commission. 2002. Commission Regulation (EC) No 178/2002 of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety, *Official Journal of the European Union*.
- [EC] European Commission. 2003. Commission Regulation (EC) No 99/2003 Establishing the standard import values for determining the entry price of certain fruit and vegetables. *Official Journal of the European Union*.

- [EC] European Commission. 2004. Council Directive No. 853/2004/EC of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs, *Official Journal of the European Communities*.
- [EC] European Commission. 2005. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, *Official Journal of the European Union*.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2011. Urgent advice on the public health risk of Shigatoxin producing *Escherichia coli* in fresh vegetables. *EFSA J.* 9: 2274.
- Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No.492/Menkes/Per/IV/2010 tentang Persyaratan Kualitas Air Minum.
- Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No.1096/Menkes/Per/VI/2011 tentang Higiene Sanitasi Jasaboga.
- [WHO] World Health Organization. 2011. *Foodborne Disease*. Geneva: World Health Organization Collaborative Food Agriculture Organization.

## VII.

# PENGENDALIAN PERTUMBUHAN *ESCHERICHIA COLI*

Masalah kontaminasi *E. coli* patogen pada pangan mendorong pengembangan metode pencegahan dan pengendalian yang efektif agar dapat meminimalkan kontaminasi bakteri tersebut pada pangan atau bahkan menghilangkannya. Pengendalian *E. coli* patogen pada produksi pangan harus dilakukan secara detail dari mulai penanganan bahan baku, proses produksi, pengemasan produk, sampai pada saat produk tersebut siap dikonsumsi. Sistem pengolahan pangan hendaknya dilakukan berdasarkan pada prinsip *hazard analysis critical control point* (HACCP) untuk menjamin bahwa produk pangan yang dihasilkan benar-benar aman. .

Pengendalian terhadap *E. coli* terutama yang patogen lebih ketat pada strain dengan dosis infeksi yang rendah seperti *E. coli* jenis hemoragik (EHEC) mengingat tingkat keparahan bahaya yang ditimbulkan, kasus keracunan pangan dan penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri tersebut terus meningkat. Selain itu *E. coli* patogen ini diketahui mampu bertahan dalam kondisi yang ekstrim. Dosis infeksi yang sangat rendah dari beberapa jenis *E. coli*, terutama *E. coli* O157:H7 mendorong agar sistem pengolahan pangan dilakukan dengan baik dan efektif. Dalam bab ini akan diuraikan langkah-langkah pengendalian pertumbuhan *E. coli* pada beberapa produk pangan yang umum terkontaminasi dengan beberapa metode tertentu.

## A. PENGENDALIAN BAHAN BAKU

Bahan baku menjadi salah satu sumber kontaminasi bakteri *E. coli* yang terus terbawa sampai di produk akhir. Persiapan serta penanganan yang kurang baik pada bahan baku dapat menjadi pemicu terjadinya kontaminasi *E. coli* patogen. Tindakan pengendalian pertumbuhan *E. coli* patogen pada bahan baku bertujuan untuk menjaga bahaya yang dapat ditimbulkan oleh bakteri ini. Beberapa bahan pangan yang umum terkontaminasi bakteri *E. coli* sehingga perlu dilakukan pengendalian pada bahan baku seperti susu, daging, buah, dan sayuran.

Susu merupakan bahan pangan yang kaya akan nutrisi, oleh karena itu apabila susu terkontaminasi oleh bakteri, maka bakteri tersebut akan dengan mudah berkembang biak. Penanganan susu harus dilakukan dengan baik melalui penyimpanan pada suhu <4 °C dan dilakukan proses sterilisasi atau pasteurisasi sebelumnya. *E. coli* O157:H7 masih dapat tumbuh dalam susu mentah yang disimpan pada suhu 7 °C meskipun peningkatan jumlahnya hanya 1.5 log selama 144 jam (Heuvelink *et al.* 1997). Temuan serupa dilaporkan oleh Kauppi *et al.* (1996) dan Katic *et al.* (1998) yang menunjukkan pertumbuhan bakteri *E. coli* O157:H7 yang lambat pada susu yang disimpan pada suhu 6.5 dan 7 °C.

Metode yang efektif untuk mengurangi kontaminasi bakteri patogen *E. coli* dan lainnya pada susu adalah dengan menjaga kebersihan bagian tubuh sapi, kebersihan ruangan dan peralatan pemerahan dan ruang penyimpanan susu. Proses pembersihan dan desinfeksi ambing dan puting dilakukan sebelum pemerahan. Kualitas mikrobiologis susu segar harus memenuhi standar dan dipantau secara rutin agar susu aman digunakan untuk pembuatan produk terutama produk yang tidak melalui proses pemanasan, seperti pada pembuatan keju dari susu mentah.

Daging (khususnya daging sapi) telah banyak teridentifikasi sebagai pembawa *E. coli* O157:H7. Daging terkontaminasi *E. coli* patogen dari feses melalui kulit, kuku atau usus ke jaringan otot/daging selama

proses pemotongan hewan. Tahap pencegahan awal yang dilakukan untuk mencegah kontaminasi adalah membersihkan sapi yang akan masuk ke dalam ruang pemotongan hewan. Proses pengkulitan, pengeluaran isi perut, pemotongan kuku harus dilakukan dengan hati-hati agar tidak terjadi kontak dengan bagian otot/daging. Selain itu dilakukan pembersihan menyeluruh selama proses produksi dan desinfeksi permukaan yang kontak dengan produk, terutama ketika pemotongan karkas.

Sementara itu penyebab kontaminasi *E. coli* patogen pada buah dan sayuran berasal dari kotoran hewan di lapangan sebelum buah dan sayur tersebut dipanen. Buah dan sayuran yang dipupuk dengan menggunakan kotoran hewan memiliki risiko terkontaminasi *E. coli* patogen. Pupuk kandang yang berasal dari limbah tanpa pengolahan yang efektif berpotensi besar membawa *E. coli* patogen ke dalam tanah tempat buah dan sayuran tersebut ditanam. Selain itu binatang liar dan burung juga diketahui sebagai pembawa *E. coli* patogen sehingga menjadi penyebab utama kontaminasi bakteri patogen pada produk buah dan sayuran.

Penanganan pada kotoran hewan seperti pengomposan, dapat secara signifikan mengurangi tingkat kontaminasi *E. coli* patogen. Pada saat pengomposan kotoran hewan peningkatan suhu yang cukup tinggi (60 °C) dari hasil proses pertumbuhan dan fermentasi mikroba menyebabkan kondisi pertumbuhan bagi *E. coli* tidak sesuai lagi. Selain itu praktik pertanian lainnya seperti air irigasi yang digunakan dalam proses pertanian, harus dipastikan tidak mengandung bakteri yang dapat mengontaminasi produk pertanian.

## **B. PENGENDALIAN PROSES PENGOLAHAN**

Produk pangan diproduksi dengan menggunakan beberapa cara pengolahan yang mampu mengurangi atau menghilangkan bakteri pada produk yang diolah. Beberapa cara pengolahan baik fisik, kimia, dan

mikrobiologi diketahui telah mampu menghilangkan atau mengurangi kontaminasi *E. coli* patogen pada pangan.

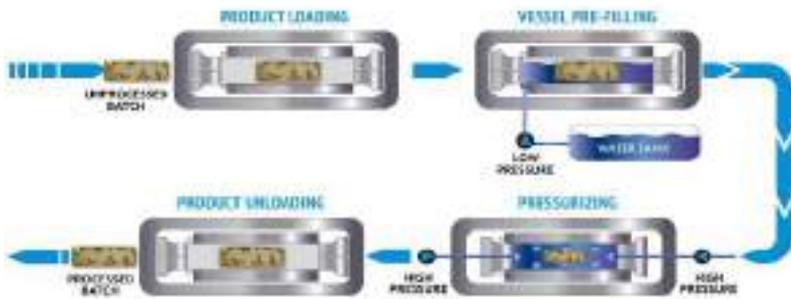
### **Pemasakan**

Pengolahan dengan menggunakan suhu tinggi (proses termal) merupakan salah satu cara yang paling umum untuk menonaktifkan *E. coli* patogen pada pangan (Erickson dan Doyle 2007). Efektivitas proses pemanasan sangat penting untuk menjamin keamanan produk dan validasi dari tiap proses pemanasan harus dilakukan untuk memastikan konsistensi waktu dan suhu pemanasan yang benar. Validasi proses pemanasan produk harus dilakukan sebelum dilakukan proses selanjutnya dan harus memperhitungkan semua variabel yang mungkin memengaruhi proses panas. Validasi proses pemanasan dimaksudkan untuk mengidentifikasi kondisi yang secara konsisten berpengaruh pada keamanan produk.

Studi mengenai evaluasi proses perlakuan panas terhadap *E. coli* patogen telah dilakukan, seperti perlakuan panas untuk menonaktifkan STEC pada bahan baku dan produk olahan daging. Suhu pasteurisasi (63 °C selama 30 menit, 72 °C selama 15 detik, atau 89 °C selama 1 detik) telah terbukti efektif untuk pengendalian pertumbuhan STEC, tetapi tidak efektif untuk pengendalian toksin shiga yang telah terbentuk (Rasooly 2010). Pengukuran efek penghambatan toksin shiga dengan proses pasteurisasi dilakukan dengan pengukuran aktivitas dehidrogenase sel vero dan sintesis protein. Hasil penelitian menunjukkan bahwa toksin shiga 2 (*stx2*) ditemukan stabil terhadap panas sehingga proses pasteurisasi susu seperti yang disarankan oleh *US Food and Drug Administration* (63 °C selama 30 menit, atau 72 °C selama 15 detik atau 89 °C selama 1 detik), tidak dapat mengurangi aktivitas biologis toksin *stx2*. Namun, peningkatan suhu pemanasan hingga 100 °C selama 5 menit dapat menginaktivasi toksin tersebut.

## **High Pressure Processing (HPP)**

Proses pengolahan dengan tekanan tinggi atau lebih dikenal dengan istilah *high pressure processing* (HPP) adalah metode pengolahan pangan dengan perlakuan tekanan tinggi (hingga 600 Mpa, atau 87 000 pound/in<sup>2</sup> (psi) atau sekitar 6 000 atm). Hal ini dilakukan dengan atau tanpa penambahan panas untuk inaktivasi mikroba atau untuk perubahan atribut pangan agar mendapatkan kualitas yang diinginkan. Tekanan diberikan selama 3-5 menit (Tewari *et al.* 2007). Cara kerja HPP dapat dilihat pada Gambar 7.1. Produk yang akan diberikan perlakuan ditempatkan dalam sebuah botol plastik atau *pouch* fleksibel yang kemudian diproses dalam sebuah ruang yang berisi cairan yang diberi tekanan tinggi menggunakan pompa. Proses berlangsung selama 3-5 menit. Tekanan yang diberikan dari segala arah memungkinkan bentuk produk tetap terjaga, meskipun dilakukan pada tekanan yang ekstrim.

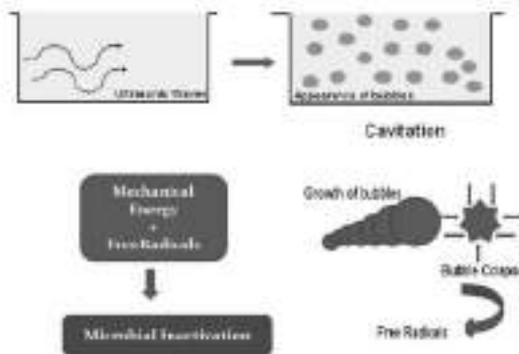


Gambar 7.1 Cara kerja HPP pada produk pangan  
(Anonim 2015)

Aplikasi proses dengan tekanan tinggi pada EHEC O157:H7 di kecambah dapat menurunkan jumlah bakteri lebih dari 5 log CFU/g setelah 15 menit pada tekanan 650 MPa dengan suhu 20 °C (Neetoo *et al.* 2008).

## Ultrasonifikasi

Ultrasonifikasi adalah proses pembentukan energi yang dihasilkan oleh gelombang suara pada frekuensi tinggi. Ultrasonifikasi dengan intensitas tinggi pada frekuensi rendah yaitu mulai dari 20 sampai 100 kHz, berguna untuk menonaktifkan mikroba pada bahan pangan (Piyasena *et al.* 2003). Mekanisme ultrasonifikasi dalam menginaktivasi mikroba dilakukan karena adanya kavitasi, yaitu pembentukan gelembung gas karena tekanan sangat rendah mencapai dibawah tekanan uap sehingga air menguap. Gelombang suara yang melewati media cair mengakibatkan terjadinya vibrasi mekanik. Media cair tersebut mengandung gas terlarut dan membentuk gelembung-gelembung. Gelembung tersebut kemudian akan pecah dan akhirnya menghasilkan energi mekanik dan kimia (Gambar 7.2).



Gambar 7.2 Mekanisme ultrasonifikasi dalam inaktivasi mikroba  
(Sumber: Jackline *et al.* 2014)

Penelitian penggunaan ultrasonifikasi yang dikombinasikan dengan klorin, natrium klorit, asam peroksiasetat, ataupun tanpa dikombinasikan, mampu untuk menonaktifkan EHEC O157:H7 pada daun bayam (Zhou *et al.* 2009). Ultrasonifikasi secara signifikan mengurangi 0.7 – 1.1 log lebih besar bakteri EHEC O157:H7 dibandingkan dengan

penggunaan bakteri oleh masing-masing sanitizer tanpa perlakuan ultrasonifikasi.

### **Iradiasi Pengion**

Iradiasi produk pangan menggunakan sinar gamma berenergi tinggi, elektron beam, atau sinar-X dapat digunakan secara komersial untuk menghilangkan patogen pada produk daging (Smith dan Pillai 2004), serta efektif untuk menghilangkan *E. coli* O157:H7 pada selada (Niermira *et al.* 2002). Radiasi pengion lebih efektif untuk menurunkan jumlah *E. coli* O157:H7 dalam bayam dibandingkan dengan pencucian dengan natrium hipoklorit pada konsentrasi 300 dan 600 ppm. Pengurangan jumlah bakteri patogen dengan pencucian 300 dan 600 ppm hanya dapat mengurangi  $< 1$  log CFU, sedangkan iradiasi pengion dengan dosis 1.5 kGy dapat mengurangi bakteri patogen sebesar 3 log CFU. Studi lain menunjukkan bahwa iradiasi hingga 1.0 kGy dapat menurunkan jumlah patogen sebanyak 3 - 4 log CFU pada selada yang telah diinokulasi oleh *E. coli* patogen (Gomes *et al.* 2009). Selain itu X-ray juga memiliki potensi untuk mengurangi patogen pada daun bayam. Penelitian yang dilakukan oleh Mahmoud *et al.* (2009), menemukan bahwa terjadi pengurangan jumlah *E. coli* O157:H7 sebanyak  $> 5$  log CFU/daun bayam dengan pemberian X-ray pada dosis 2.0 kGy.

### **Sinar Ultraviolet**

Sinar Ultraviolet (UV) adalah jenis radiasi non pengion dengan panjang gelombang 100 - 400 nm. Radiasi dengan sinar UV pada stroberi menyebabkan pengurangan jumlah *E. coli* O157: H7 maksimum 2.1 log CFU/g pada dosis 25.7 J/cm<sup>2</sup>. Pada rasberi pengurangannya sebanyak 3.9 log CFU/g dengan dosis 72 J/cm<sup>2</sup>, dan pada bluberi pengurangannya sebanyak 2.9 log CFU/g dengan dosis 1.27 J/cm<sup>2</sup>, serta tidak terjadi kerusakan pada buah-buahan tersebut (Bialka dan Demirci 2007).

## Perlakuan dengan Senyawa Kimia

Pengolahan buah dan sayur terutama yang diproses secara minimal (*minimally processing*) pada umumnya rentan terhadap kontaminasi mikroba. Penggunaan disinfektan/ pembersih pada proses pencucian dapat meningkatkan efisiensi pengurangan mikroba hingga mencapai 100 kali lipat (Beuchat 2002). Pembersih yang dapat digunakan untuk mencuci buah dan sayuran antara lain adalah air yang diklorinasi. Konsentrasi klorin yang digunakan dalam praktik komersial umumnya  $\leq 200$  ppm yang mampu mengurangi kontaminasi mikroba patogen pada bahan pangan sebanyak 1 - 2 log CFU. Lebih lanjut Beuchat (2002) menunjukkan bahwa mencuci daun selada dengan cara disemprot menggunakan air yang mengandung klorin pada konsentrasi 200 ppm mampu mengurangi jumlah bakteri *E. coli* O157:H7 sebesar 1-3 log CFU. Sebagai pembandingan, pembilasan dengan air saja hanya menurunkan jumlah bakteri sebanyak 1 - 2 log CFU.

Proses pencucian juga telah diterapkan untuk dekontaminasi karkas daging setelah penyembelihan. Penggunaan air panas (74 °C selama 26 detik) dan asam laktat (2 % selama 26 detik) mampu mengurangi bakteri sebesar 1.72 dan 1.52 log CFU/cm<sup>2</sup> daging, sedangkan penggunaan air ozonisasi (2.3 ppm) mampu mengurangi bakteri sebanyak <0.5 log CFU/cm<sup>2</sup> daging. Bosilevac *et al.* (2006) membandingkan efektivitas dari pencucian menggunakan asam laktat (2 % pada 42 °C) dan pencucian dengan menggunakan air panas (74 °C selama 5.5 detik) untuk mengurangi *E. coli* O157: H7 pada karkas sapi. Hasilnya menunjukkan bahwa pencucian dengan menggunakan asam laktat mampu menurunkan prevalensi *E. coli* O157: H7 sebesar 35 % dan pencucian dengan menggunakan air panas mampu menurunkan prevalensi sebesar 81 %. Penerapan kedua perlakuan secara bersamaan hanya menurunkan prevalensi bakteri *E. coli* O157:H7 sebesar 79 %.

Taormina *et al.* (1999) melakukan studi perlakuan kimia untuk mengurangi jumlah *E. coli* O157 pada biji alfalfa. Kalsium hipoklorit atau

Ca (OCI)<sub>2</sub> dengan konsentrasi 2 000 ppm dapat menyebabkan pengurangan jumlah bakteri hingga mencapai 1.84 log ≥ 2.38 log CFU/g setelah 3 menit dan 1.83 log ≥ 2.5 log CFU/g setelah 10 menit. Perlakuan dengan 10 000 dan 20 000 ppm Ca (OCI)<sub>2</sub> menyebabkan pengurangan jumlah bakteri mencapai ≥ 2.38 log CFU/g setelah 3 menit dan ≥ 2.5 log CFU/g setelah 10 menit. Pada biji alfalfa yang telah diinokulasi dengan *E. coli* O157 sebanyak 3.04 log CFU/g kemudian dikeringkan, dan disimpan pada suhu 5 °C selama 20 minggu jumlahnya tidak berkurang. Pada biji yang disimpan selama 54 minggu, keberadaan bakteri tersebut masih dapat terdeteksi.

Kumar *et al.* (2006) mempelajari inaktivasi *E. coli* O157: H7 pada berbagai biji yang ditumbuhkan secara steril menggunakan *oxychloro* (SOC). Penggunaan SOC dianggap memiliki beberapa manfaat lebih baik dari pada klorin. Perendaman biji dalam konsentrasi SOC 200 ppm selama 24 jam pada suhu 28 °C tidak mempengaruhi tingkat perkecambahan biji. Perlakuan dengan penambahan 100 - 200 ppm SOC selama 24 jam diikuti dengan perkecambahan selama 4 hari dapat menghilangkan *E. coli* O157:H7 (tidak terdeteksi pada 25 g kecambah setelah 4 hari perkecambahan). Perlakuan dengan konsentrasi SOC 50 ppm tidak efektif untuk menurunkan jumlah mikroba.

### **Ozon**

Ozon dapat menghancurkan mikroba melalui oksidasi progresif pada komponen seluler bakteri, dengan permukaan sel yang menjadi target utama. Berbeda dengan klorin yang dapat menghancurkan sistem enzim intraseluler tertentu, mekanisme ozon menyebabkan oksidasi yang luas pada protein seluler internal yang akhirnya menyebabkan kematian sel bakteri secara cepat (Komanapalli dan Lau 1996). Hasil penelitian Achen dan Yousef (2001) menunjukkan pada apel yang diinokulasi dengan *E. coli* O157:H7 kemudian dicelupkan pada cairan ozon, terjadi penurunan jumlah *E. coli* O157:H7 sebesar 2.6 - 3.7 log CFU.

## **Minyak esensial**

Pengembangan dan penerapan senyawa antimikroba baru yang efektif dan tidak beracun terus mendapatkan perhatian. Minyak esensial atau *essential oil* (EO) dari tanaman telah diketahui memiliki aktivitas antimikroba terhadap berbagai jenis patogen dan digunakan sebagai alternatif desinfektan. Minyak kayu manis (*cinnamaldehyde*) yang biasa digunakan dalam industri pangan untuk menambah aroma juga memiliki potensi sebagai senyawa antimikroba.

Penggunaan komponen EO sebagai antimikroba harus dipertimbangkan karakter lipofilik dan karakter hidrofiliknya. Tingkat aktivitas komponen EO sebagai antimikroba adalah sebagai berikut: fenol > aldehid > keton > alkohol > eter > hidrokarbon. Konsentrasi minimum *cinnamaldehyde* yang dapat menghambat *E. coli* adalah sebanyak 500 mg/mL dan aktivitas antimikroba yang tinggi ini disebabkan oleh kelompok aldehida (Chang *et al.* 2001).

Penggunaan *trans-cinnamaldehyde* dalam produk pangan sebagai antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* O157: H7 pada jus apel dan sari apel dilakukan dengan konsentrasi 0.125 dan 0.075 % (v/v) pada suhu 4 °C. Hasilnya, *trans-cinnamaldehyde* mampu menurunkan jumlah *E. coli* O157: H7 dalam jus apel dan sari apel sampai jumlah yang tidak terdeteksi masing-masing pada hari ke 3 dan ke 5. Hasil ini menunjukkan bahwa dengan konsentrasi *cinnamaldehyde* yang rendah dapat digunakan sebagai antimikroba yang efektif untuk menonaktifkan *E. coli* O157: H7 dalam jus apel dan sari apel (Baskaran *et al.* 2010)

## **Fermentasi**

Produk yang dihasilkan melalui proses fermentasi seperti daging fermentasi dan keju dari susu mentah dapat menekan beberapa jenis patogen enterik. Kejadian luar biasa (KLB) keracunan pangan yang terjadi pada jenis produk fermentasi disebabkan karena produksi asam

terhambat atau memang kondisi bahan baku yang digunakan kurang baik. Hasil penelurusan dari KLB keracunan pangan yang terjadi menunjukkan bahwa proses fermentasi yang aman terbukti mampu menghilangkan EHEC pada produk fermentasi (MacDonald *et al.* 2004). Secara umum, proses fermentasi yang aktif akan memproduksi asam dengan cepat, disertai dengan penurunan pH, dan dengan kondisi tersebut akan terjadi pengurangan jumlah bakteri *E. coli* O157 setidaknya 2 - 3 log (Taskforce 1996).

Schlesser *et al.* (2006) melaporkan kelangsungan hidup lima strain *E. coli* O157:H7 yang diinokulasi pada tiga konsentrasi inokulum ( $10^1$ ,  $10^3$  dan  $10^5$  log CFU/mL) selama produksi keju cheddar dari susu yang tidak dipasteurisasi. Secara umum, bakteri meningkat sekitar 1 - 2 log CFU di semua tingkat inokulum pada tahap awal produksi. Setelah penyimpanan pada 7 °C selama 60 dan 120 hari, populasi menurun masing-masing 1 dan 2 log CFU, dan masing – masing populasi menurun sebanyak 3 dan 4 log CFU setelah 180 dan 240 hari. Dalam keju yang dibuat dari susu yang diinokulasi *E. coli* sebanyak  $10^5$  CFU/mL, setelah 360 hari penyimpanan bakteri berkurang sekitar 5 log CFU tetapi masih terdeteksi dan terhitung (20 CFU/g). Hal ini juga terjadi pada keju yang dibuat dari susu yang diinokulasi dengan  $10^3$  CFU/mL (8 CFU/mL setelah 360 hari) dan bahkan pada tingkat inokulum awal  $10^1$  CFU/mL, bakteri itu masih terdeteksi setelah 240 hari penyimpanan.

Riordan *et al.* (1998) mempelajari kelangsungan hidup *E. coli* O157:H7 selama pembuatan pepperoni. Campuran adonan yang bervariasi dalam hal garam, natrium nitrit dan dekstroza, dimaksudkan untuk menghasilkan produk dengan pH rendah (4.4 – 4.59), standar (4.69–4.86) dan tinggi (5.04 – 5.61). Pepperoni difermentasi pada 38 °C dan kemudian dikeringkan pada 15 °C, dalam kondisi kelembaban yang terkontrol, sampai nilai pH yang diinginkan dan aktivitas air (<0.80) tercapai yang berlangsung sekitar 7 hari. Dalam produk dengan formulasi standar (2.5 % garam, 100 ppm natrium nitrit, pH 4.69 – 4.86), jumlah bakteri menurun hingga mencapai 0.41 log CFU dengan total

penurunan setelah pengeringan mencapai 0.84 log CFU. Peningkatan pengurangan patogen terjadi dalam formulasi produk dengan garam dan natrium nitrit yang lebih tinggi sedangkan dengan nilai pH yang lebih rendah, menunjukkan tingkat kematian yang terbesar selama proses fermentasi. Penurunan terbesar tercatat pada pepperoni dengan 3.3 % garam, 300 ppm natrium nitrit dan pH 4.4 – 4.59 dengan tingkat penurunan jumlah bakteri mencapai 3.36 log CFU setelah fermentasi dan dengan total pengurangan jumlah bakteri mencapai 4.79 log CFU pada akhir proses pengeringan.

### **Bakteriofag**

Bakteriofag merupakan organisme hidup yang dapat bersifat seperti antimikroba terhadap bakteri patogen. Bakteriofage sebagai antimikroba memiliki keuntungan, yaitu mampu untuk beradaptasi dengan lingkungannya, dan mampu mengeluarkan sifat antibakteri alami dalam matriks yang kompleks seperti pada pangan. Selain itu baik bakteri dan bakteriofag mudah untuk menyebar dan memperbanyak diri sehingga dapat mengurangi biaya produksi. Bakteriofag sebagai antimikroba memiliki sifat lain yang menguntungkan yaitu dapat bekerja secara spesifik pada bakteri tertentu. Sifat tersebut sangat penting untuk produksi pangan yang melibatkan fermentasi, karena bakteriofag tidak akan menginaktifkan kultur starter. Penggunaan bakteriofag pada pangan tentu harus memenuhi persyaratan keamanan pangan, dengan penggunaan bakteriofag yang aman atau terdaftar sebagai *Generally Recognized as Safe* (GRAS).

Bakteriofag dapat ditemukan secara melimpah pada lingkungan baik di tanah, air, maupun pada beberapa produk pangan (daging, sayuran, produk susu), dan masuk ke dalam tubuh dalam jumlah besar setiap hari. Beberapa bakteriofag terdaftar di *US Food and Drug Administration* (FDA) sebagai GRAS (*Generally Recognized as Safe*), dan pada tahun 2006 FDA telah menyetujui penggunaan bakteriofag yang secara umum dikenal tidak bersifat *offensive*, sebagai zat tambahan

pada pangan, untuk melawan bakteri patogen seperti *L. monocytogenes*. Bakteriofag sangat memungkinkan untuk digunakan sebagai alat bantu pengolahan untuk mengontrol bakteri *E. coli* O157:H7 pada pangan siap saji (Sillankorva *et al.* 2012). Beberapa bakteriofag yang telah diproduksi secara komersial untuk biokontrol dalam industri pangan dapat dilihat pada Tabel 7.1.

Penggunaan bakteriofag sebagai agen antibakteri untuk melawan bakteri patogen, merupakan suatu alternatif yang efektif. Ide untuk menggunakan bakteriofag sebagai agen biokontrol untuk memerangi bakteri patogen muncul kembali setelah prevalensi peningkatan strain bakteri yang resisten terhadap antibiotik, yang menjadi perhatian utama bagi kesehatan masyarakat. Para ahli dari EFSA (*European Food Safety Authority*) mempertimbangkan bahwa dalam kondisi khusus bakteriofag dapat sangat efektif dalam menghilangkan patogen dalam saluran pencernaan.

Tabel 7.1 Produk bakteriofag komersial

<b>Produk</b>	<b>Target Bakteri</b>
Smart phage	Tidak spesifik
ListShield	<i>Listeria monocytogenes</i>
EcoShield	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
SalmoFresh <sup>a</sup>	<i>Salmonella</i>
Listex 100 <sup>a</sup>	<i>L. monocytogenes</i>
SALMONELEX	<i>Salmonella</i>
AgriPhage	<i>Xanthomonas campestris</i> sp. <i>Vesicatori</i> , atau <i>Pseudomonas syringae</i> sp. <i>Tomato</i>

Keterangan :

<sup>a</sup>FDA (*Food and Drug Administration*, USA) menyatakan sebagai GRAS (*Generally Recognized as Safe*)

Kombinasi koktail fag litik *E. coli* (BEC8) dan minyak esensial *trans-cinnamaldehyde* (TC) digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan tiga strain *E. coli* O157: H7 di seluruh produk salad dan

daun bayam pada tingkat inokulum 4.0, 5.0 atau 6.0 log CFU/daun selama penyimpanan pada suhu 4, 8, 23 dan 37 °C (Viazis *et al.* 2011). Penggunaan TC dan fag secara terpisah menyebabkan penurunan sel *E. coli* masing-masing sebesar 3.0 dan 1.0 log CFU/daun pada suhu penyimpanan 8 °C dengan waktu 24 jam. Ketika minyak esensial dan fag yang diterapkan bersama-sama pada suhu inkubasi yang sama, jumlah sel berada di bawah 3.0 dan 1.0 log CFU/daun yang terdeteksi setelah 10 menit dan 1 jam pada semua tingkat inokulasi untuk bayam dan selada.

Penelitian yang dilakukan oleh O'Flynn *et al.* (2004) menggunakan koktail fag yang berisi 3 fag *E. coli* O157: H7-spesifik (e11/2, e4/1c dan pp01) digunakan untuk mengontrol *E. coli* O157:H7 pada sampel daging sapi mentah. Hasil penelitian menunjukkan setelah 3 jam inkubasi pada suhu 37 °C, 7 dari 9 sampel daging bebas dari sel bakteri *E. coli* O157:H7. Dalam studi lain, konsentrasi yang berbeda dari koktail fag litik *Myoviridae* (ECP-100) *E. coli* O157:H7 secara signifikan mengurangi jumlah sel bakteri yang diinokulasikan pada pangan (tomat, bayam, brokoli dan daging sapi) (Abuladze *et al.* 2008). Pengurangan jumlah bakteri yang diamati berkisar antara 94 - 100 %. Koktail fag yang sama juga menyebabkan penurunan jumlah *E. coli* O157:H7 yang signifikan pada produk selada dan melon setelah inkubasi pada suhu 4 °C selama 2 dan 7 hari (Sharma *et al.* 2009).

Validasi kemampuan produk fag komersial yaitu anti-*E. coli* O157: H7 (Ecoshield) dilakukan dengan menggunakan selada dan daging sapi yang terkontaminasi sekitar  $2 \times 10^3$  CFU/g *E. coli* O157:H7 (Carter *et al.* 2012). *Ecoshield*, yang berisi tiga fag litik yang berbeda, menyebabkan pengurangan 94 – 98 % sel bakteri pada daging sapi setelah penyimpanan pada suhu dingin selama 7 hari. Jumlah bakteri dalam selada berkurang 87 % pada kondisi penyimpanan yang sama. Penelitian tentang kontrol *E. coli* O157:H7 dengan menggunakan fag juga telah dilakukan oleh Sharma *et al.* (2009) pada daging sapi, O'Flynn *et al.* (2004), pada selada dan bayam, Viazis *et al.* (2011), pada selada dan

melon siap makan, Anany *et al.* (2011), pada daging kalkun dan daging sapi mentah, Abuladze *et al.* (2008), pada tomat, bayam, brokoli dan daging sapi dengan jumlah reduksi bakteri *E. coli* O157:H7 masing-masing sebesar >94 , >99.5 >97 , dan 94.5 %.

### C. PELABELAN PRODUK

Konsumen memiliki peran penting dalam memastikan keamanan sehubungan dengan pangan yang akan dikonsumsi. Adanya informasi yang tepat yang diberikan pada kemasan produk untuk memberikan arahan mengenai penanganan dan kondisi penyimpanan produk yang aman serta persiapan untuk memasak atau proses yang perlu digunakan merupakan hal yang sangat penting. Petunjuk mengolah pangan yang aman seharusnya tercantum pada kemasan daging mentah yang dibutuhkan untuk mengingatkan dan memastikan bahwa bahan baku mentah harus dipisahkan dari produk siap saji lainnya selama penyimpanan dan persiapan juga diperlukan untuk mencuci tangan, permukaan dan peralatan yang efektif ketika menangani baku sampai kemudian siap disajikan. Di Amerika Serikat informasi tersebut wajib dicantumkan pada produk daging mentah. Instruksi cara memasak untuk pangan mentah seperti *beefburger* dan daging lainnya sangatlah penting karena untuk membantu konsumen untuk perkiraan dan suhu yang diperlukan untuk mencapai tingkat kematangan yang tepat (Clive dan Peter 2009).

### DAFTAR PUSTAKA

- Abuladze T, Li M, Menetrez MY, Dean T, Senecal A, Sulakvelidze A. 2008. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 74(20): 6230 - 6238.

- Achen M, Yousef A. 2001. Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. *J. Food Sci.* 66: 1380 - 1384.
- Anany H, Chen W, Pelton R, Griffiths MW. 2011. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes. *Appl Environ Microbiol.* 77: 6379 - 6387.
- Anonim. 2015. *High Pressure Processing (HPP)*. <http://www.hiperbaric.com/en/high-pressure>. Akses November 2015.
- Baskaran SA, Amalaradjou MAR, Hoagland T, Venkitanarayanan K. 2010. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in apple juice and apple cider by trans-cinnamaldehyde. *Int. J. Food Microbiol.* 141: 126 – 129.
- Bell C, Kyriakides A. 1998. *E. coli: A Practical Approach to the Organism and its Control in Foods*, Blackwell Science, Oxford.
- Beuchat LR. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.* 4: 413 - 423.
- Bialka K, Demirci A. 2007. Decontamination of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* on blueberries using ozone and pulsed UV-light. *J. Food Sci.* 72: 391 – 395.
- Bosilevac JM, Nou X, Nou X, Barkocy-Gallagher GA, Arthur TM, Koohmaraie M. 2006. Treatment using hot water instead of lactic acid reduce levels of aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* and reduce the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on previsceration beef carcasses.. *J. Food Prot.* 69(8): 1808-1813.
- Carter CD, Parks A, Abuladze T, Li M, Woolston J, Magnone J. 2012. Bacteriophage cocktail significantly reduces *Escherichia coli* O157: H7 contamination of lettuce and beef, but does not protect against recontamination. *Bacteriophage.* 2: 178-185.

- Chang ST, Chen PF, Chang SC. 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Ethnopharmacol.* 77: 123–127.
- Clive WB, Peter JM. 2009. *Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and control, second Ed.* Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition. CRC Press New York.
- Erickson MC, Doyle MP. 2007. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 70: 2426 – 2449.
- Gomes C, Da Silva P, Moreira RG, Castell-Perez E, Ellis EA, Pendleton M. 2009. Understanding *E. coli* internalization in lettuce leaves for optimization of irradiation treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 135: 238–247.
- Heuvelink AE, Zwartkruis-Nahuis J, de Boerl E. 1997. Evaluation of media and test kits for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157 from minced beef. *J. Food Prot.* 60: 817 – 824.
- Jackline FBSJ, Andrade NJ, Ramos AM, Vanetti MCD, Stringheta PC, Chaves JBP. 2014. Decontamination by ultrasound in fresh fruits and vegetables. *Food Control.* 45: 36-50.
- Katić V, Radenkov S. 1998. The fate of *Escherichia coli* O157:H7 in pasteurized milk, *Acta Veterinaria (Beograd)*. 48(5–6): 345–50.
- Kauppi KL, Tatini SR, Harrell F *et al.* 1996. Influence of substrate and low temperature on growth and survival of verotoxigenic *Escherichia coli*, *Food Microbiol.* 13: 397– 405.
- Kumar M, Hora R, Kostrzynska M *et al.* 2006. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on mung beans, alfalfa, and other seed types destined for sprout production by using an oxychloro-based sanitiser. *J Food Prot.* 69(7):1571–8.
- Komanapalli IR, Lau BHS. 1996. Ozone-induced damage of *Escherichia coli* K-12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 610 – 614.

- MacDonald DM, Fyfe M, Paccagnella A *et al.* 2004. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to salami, British Columbia, Canada, 1999, *Epidemiology and Infection*. 132: 283–9.
- Mahmoud BSM, Bachman G, Linton RH. 2009. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Shigella flexneri* on spinach leaves by X-ray. *Food Microbiol.* 27: 24–28.
- Neetoo H, Ye M, Chen H. 2008. Potential application of high hydrostatic pressure to eliminate *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouted seeds. *Int J Food Microbiol.* 128(2): 348 – 353.
- Niemira B, Sommers C, Fan X. 2002. Suspending lettuce type influences recoverability and radiation sensitivity of *Escherichia coli* O157: H7. *J. Food Prot.* 65: 1388–1393.
- O’Flynn G, Ross RP, Fitzgerald GF, Coffey A. 2004. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 70: 3417-3424.
- Piyasena P, Mohareb E, McKellar RC. 2003. Inactivation of microbes using ultrasonifikasi: A review. *Int J of Food Microbiol*, 87(3):207 - 216.
- Riordan DCR, Duffy C, Sheridan JJ *et al.* 1998. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of pepperoni, *J Food Prot.* 61(2): 146 – 51.
- Rasooly R, Do PM. 2010. Shiga toxin Stx2 is heat-stable and not inactivated by pasteurization. *Int J of Food Microbiol.* 136: 290 - 294.
- Schlessler JE, Gerdes R, Ravishankar S *et al.* 2006. Survival of a five-strain cocktail of *Escherichia coli* O157:H7 during the 60-day aging period of Cheddar cheese made from unpasteurized milk. *J Food Prot.* 69(5): 990 – 8.
- Sharma M, Ingram DT, Patel JR, Millner PD, Wang X, Hull AE, Donnenberg MS. 2009. A novel approach to investigate the uptake and internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in spinach

- cultivated in soil and hydroponic medium. *Journal of Food Protection* 72: 1513-1520.
- Sudarshana M, Bandyopadhyay S, Rosa C, Suslow T, Harris L. 2008. Effects of static and variable storage temperatures on the survival and growth of *Escherichia coli* O 157: H 7 on prewashed bagged lettuce. *Phytopathology*. 98: S152–S156.
- Smith J, Pillai S. 2004. Irradiation and food safety. *Food Technol*. 58: 48–55.
- Sillankorva SM, H Oliveira, J. Azeredo. 2012. Bacteriophages and their role in food safety. *Int. J. Microbiol.*1–13.
- Taskforce BR. 1996. *Dry Fermented Sausage and E. coli O157:H7, Research report No. 11-316*. National Cattlemen’s Beef Association. Chicago.
- Taormina PJ, Beuchat LR, Slutsker L. 1999. Infections associated with eating seed sprouts: an international concern, *Emerging Infectious Diseases*. 5(5): 626–34.
- Tewari G, Vijay K, Juneja. 2007. *Advance In Thermal and Non-Thermal Food Preservation*. Blackwell Publishing : USA.
- Viazis S, Akhtar M, Feirtag J, Diez-Gonzalez F. 2011. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture. *Int J of Food Microbiol*. 145: 37-42.
- Zhou B, Feng H, Luo Y. 2009. Ultrasonifikasi enhanced sanitizer efficacy in reduction of *Escherichia coli* O157:H7 population on spinach leaves. *J of Food Sci*. 74(6): M308 – M313.

## VIII.

# ANALISIS *ESCHERICHIA COLI* PATOGEN PADA PANGAN

Kasus-kasus keracunan atau infeksi yang terjadi, beberapa diantaranya dilaporkan berasosiasi dengan pangan yang terkontaminasi *E. coli* patogen. Adanya kasus tersebut mengharuskan pemerintah dan atau peneliti untuk mampu melakukan deteksi bakteri tersebut dalam pangan. Permasalahannya adalah, mikroba patogen terdapat dalam pangan dalam jumlah kecil, sehingga perlu alat dan metode yang mampu mendeteksi sampai jumlah yang sangat kecil, dan perlu dilakukan tahap pengkayaan untuk meningkatkan jumlah awal bakteri target yang akan dianalisis (Baker *et al.* 2015).

Metode untuk mendeteksi *E. coli* patogen dalam pangan meliputi metode enumerasi (kuantitatif) dan metode deteksi (kualitatif) (Elizaquivel *et al.* 2013). Metode yang digunakan untuk pengujian mikrobiologi sangat ditentukan oleh persyaratan yang diacu, umumnya pengujian dilakukan secara kualitatif dengan metode pengkayaan (*enrichment*) yaitu isolasi dan identifikasi mikroba dan interpretasi hasil (negatif per gram/mL atau negatif per 25 gram atau per 100 gram/mL). Pengujian secara kuantitatif (enumerasi) dengan penghitungan jumlah mikroba dan interpretasi hasil berupa koloni per ml/g atau koloni per 100 mL.

Metode kultur konvensional berdasarkan pada penggandaan organisme target pada media agar merupakan metode referensi untuk analisis mikroba. Tetapi, *E. coli* patogen diidentifikasi berdasarkan faktor

virulensinya, untuk itu perlu dilakukan proses isolasi serta identifikasi dari *E. coli* sebelum dilakukan analisis berdasarkan sifat virulensi spesifiknya. Walaupun identifikasi *E. coli* mudah dilakukan dengan cara uji kultur tradisional, tetapi diferensiasi antara setiap patotipe dan serotipe memerlukan teknik molekuler untuk mendeteksi faktor virulensi atau gennya.

#### **A. ANALISIS *E. COLI* PATOGEN SECARA BIKIMIA**

Metode konvensional untuk mendeteksi mikroba dalam pangan seringkali dilakukan proses pengkayaan dalam satu atau lebih media kultur (cair) yang memungkinkan proses resusitasi dan multiplikasi (penggandaan diri) mikroba tertentu. Secara umum, semua patogen dalam pangan sebenarnya berada dalam keadaan stres sub-lethal. Metode deteksinya terdiri dari 4 tahapan, mulai dari resusitasi, pengkayaan, isolasi, serta purifikasi (Uyttendaele, Debevere 2006).

Prosedur analisis maupun identifikasi semua kelompok *E. coli* patogen diuraikan dalam *Food and Drug Administration Bacteriologis Analytical Manual* (FDA-BAM) maupun dalam *International Organization for Standardization* (ISO). Metode FDA-BAM adalah prosedur umum untuk isolasi *E. coli* sebelum dilakukan pengujian sifat virulensi spesifik dari patotipe yang berbeda. Salah satu titik kritis dalam proses isolasi bakteri adalah pengambilan sampel yang efektif serta persiapannya sebelum dilakukan analisis lebih lanjut (Wang *et al.* 2013). Prosedur resusitasi atau disebut juga pra pengkayaan dilakukan dengan inkubasi beberapa jam hingga semalam pada media non- atau semi selektif yang mampu melakukan perbaikan sel. Sementara itu, proses pengkayaan *E. coli* patogen pada media selektif dilakukan untuk menekan pertumbuhan flora kompetitif sehingga memungkinkan bagi *E. coli* patogen untuk menggandakan diri hingga  $10^5$ - $10^7$  CFU/mL. Dua jenis media pengkayaan yang paling umum dan sukses digunakan untuk *E. coli* patogen (*E. coli* O157: H7) adalah *tryptone soy broth* (TSB) dan *E. coli broth* (EC) dengan atau tanpa modifikasi (Rivas *et al.* 2015). Modifikasi

dapat termasuk penambahan dipotasium fosfat ke dalam TSB (mTSB), serta berbagai komponen selektif lainnya yang membantu dalam pemulihan patogen. Beberapa media pengkayaan yang dapat diaplikasikan pada *E. coli* patogen disajikan pada Tabel 8.1.

Tabel 8.1 Media pengkayaan untuk *E. coli* patogen

Media pengkayaan	Kelompok/ Serogrup
<b>Media non selektif</b>	
<i>Tryptone Soy Broth</i> (TSB)	EHEC
TSB termodifikasi	EHEC
<i>Buffered Peptone Water</i>	EHEC
<i>E. coli Broth</i>	EHEC
<b>Media selektif</b>	
TSB+ <i>Vancomycin + Potassium Tellurite</i>	O111
TSB + <i>Vancomycin + Cexifime + Potassium Tellurite</i>	O26
TSB termodifikasi + Novobiosin	O157 dan lainnya
TSB termodifikasi+ <i>Acriflavin</i>	O157
TSB termodifikasi + <i>Cefixime + Cefsulodin + Vancomycin</i>	O157
<i>E. coli Broth</i> termodifikasi + Novobiosin	O157, O26
Enterobacteriaceae <i>Enrichment broth</i> + Novobiosin	O157
<i>Buffered Peptone Water + Vancomycin + Cefsulodin + Cefixime</i>	O157
<i>Buffered Peptone Water + Vancomycin</i>	O26, O111

Sumber: O'Sullivan *et al.* (2006)

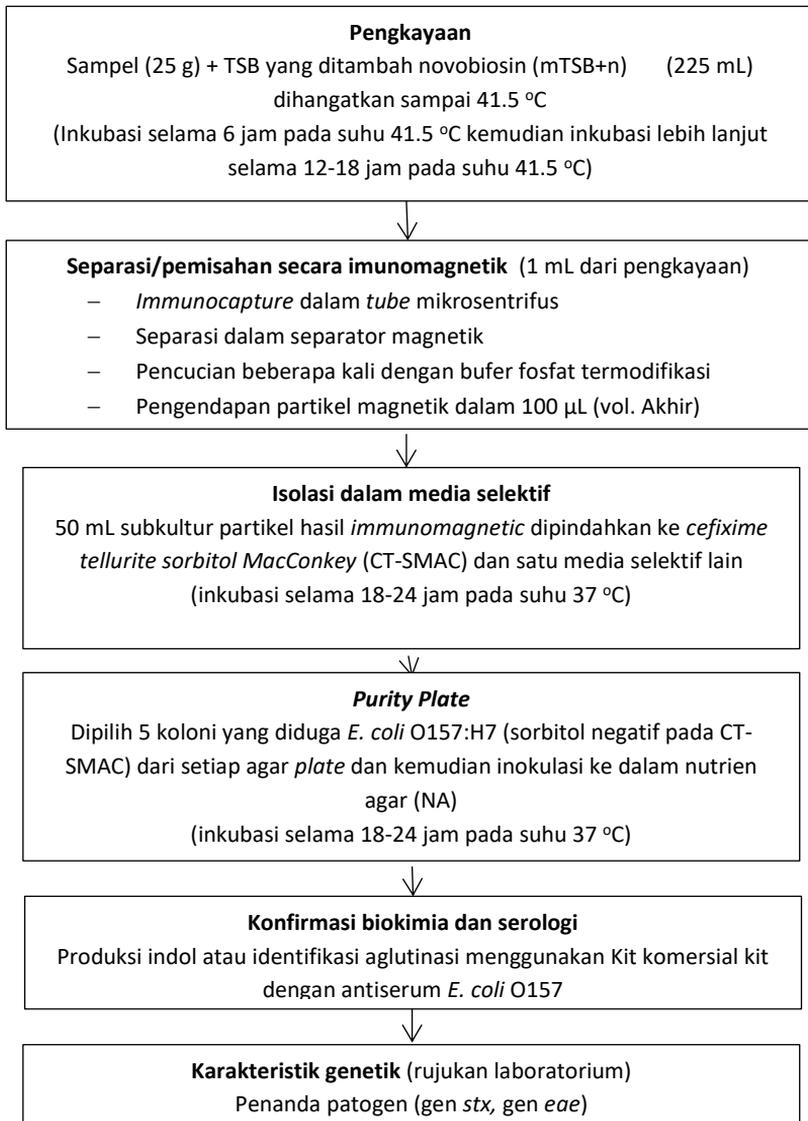
*International Organization for Standardization* (ISO 16654:2001) merekomendasikan penambahan novobiosin ke dalam TSB termodifikasi (mTSBn) kemudian diinkubasi pada suhu 41.5 °C selama 6 jam. Inkubasi kemudian dilanjutkan selama 18-24 jam pada suhu 37 °C. Tahapan analisis serta deteksi dari *E. coli* patogen menurut ISO disajikan pada Gambar 8.1. Sejumlah metode isolasi menggunakan antibodi spesifik

untuk serogrup *E.coli* tertentu juga tersedia. Pemisahan Imunomagnetik (IMS) memulihkan sel target dari media pengkayaan menggunakan manik-manik paramagnetik. Manik-manik ini dilapisi dengan poliklonal antibodi spesifik untuk serogrup tertentu. Dalam metode standar serogrup O157 dilakukannya IMS merupakan tahap prasyarat sebelum isolasi ke media agar. Meskipun tidak ada protokol standar untuk serogrup lainnya, IMS telah terbukti berguna dalam pemulihan serogrup dari pangan.

Setiap bakteri yang akan diidentifikasi harus murni dan untuk mendapatkan biakan murni digunakan media selektif yang memungkinkan untuk isolasi koloni bakteri target berdasarkan pada karakter biokimianya. Metode ISO menggunakan *Cefixime Tellurite Sorbitol MacConkey Agar* sebagai media selektif bagi *E. coli* patogen karena ketidakmampuan hampir semua *E. coli* (O157) untuk memfermentasi sorbitol. *Cefixime* dan *tellurire* ditambahkan untuk meningkatkan selektivitas dalam sampel yang terkontaminasi. *E. coli* O157 umumnya menghasilkan koloni berwarna ketika dikulturkan pada media ini, sehingga membedakannya dari serogrup dan mikroflora lainnya.

Berbeda dengan ISO, FDA (2011) merekomendasikan penggunaan *lactose broth* atau buffer pepton dengan piruvat (mBPWP) yang berisi beberapa reagen antimikroba yang efektif menekan pertumbuhan flora normal dan bakteri non-target, namun tetap memungkinkan pertumbuhan *E. coli* (O157:H7) dan mampu mendeteksi hingga <1 CFU/g dalam pangan sebagai media pra pengkayaan. Secara singkat, FDA (2011) merekomendasikan pra-pengkayaan 25 g sampel pangan dalam 225 mL BHI (*brain hearth infusion*) *broth* pada 35 °C selama 3 jam untuk proses resusitasi sel yang terluka atau rusak, kemudian dipindahkan ke 225 mL *tryptone fosfat* (TP) dan diinkubasi selama 20 jam pada 44 °C. Sampel dari media pengkayaan kemudian di-*plating* ke agar *Levine eosin-methylene blue* (L-EMB). Koloni bakteri

akan menghasilkan warna hijau metalik dan pada agar *MacConkey* akan berwarna merah. Media kemudian diinkubasi pada 35 °C selama 20 jam.



Gambar 8.1 Skema deteksi *E. coli* patogen (O157:H7) pada pangan (ISO 16654:2001)

Morfologi koloni dan warna dapat bervariasi untuk setiap strain *E. coli* patogen, selain itu strain *enteroinvasive E. coli* (EIEC) tidak dapat memfermentasi laktosa, oleh karena itu, dianjurkan setidaknya 10 koloni *typical* dan 10 koloni *atypical* harus dipilih untuk analisis lebih lanjut. Metode ini dapat digunakan untuk mengisolasi *enteropathogenic E. coli* (EPEC), *enterotoxigenic E. coli* (ETEC), *enteroinvasive E. coli* (EIEC), dan *enteroaggregative E. coli* (EAEC), tetapi tidak *E. coli* O157: H7 (EHEC), karena EHEC tidak dapat tumbuh dengan baik pada suhu 44 °C.

## **B. ANALISIS *E. COLI* PATOGEN DENGAN PCR**

*Polymerase chain reaction* (PCR) merupakan suatu prosedur untuk amplifikasi secara *in vitro* dari suatu segmen DNA spesifik. Teknik ini dikenalkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis (Jasson *et al.* 2010). Proses PCR melibatkan beberapa tahapan, yaitu (1) pra-denaturasi DNA *template*; (2) denaturasi DNA *template*; (3) penempelan primer pada *template* (*annealing*); (4) pemanjangan DNA *copy* (*extension/eongation*), dan (5) pemantapan (*post-extension*). Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), yang pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 30–40 siklus. Target DNA yang diinginkan akan meningkat secara eksponensial setelah tahapan keempat (pemanjangan). Pendekatan metode molekuler (PCR) dengan cara mengamplifikasi gen yang spesifik yang terdapat pada bakteri telah terbukti lebih sensitif dan spesifik serta lebih cepat dalam mendeteksi keberadaan bakteri patogen.

Dalam proses amplifikasi atau penggandaan target DNA, digunakan primer dengan sekuen spesifik yang dapat menempel pada target gen yang terdapat pada mikroba targetnya. Pada bakteri patogen yang menjadi target gen umumnya adalah faktor virulensi penyebab infeksi. Target gen yang seringkali digunakan pada analisis *E. coli* patogen menggunakan PCR disajikan pada Tabel 8.2. Risiko bahaya

sangat ditentukan oleh patotipe *E. coli*. *E. coli* dari kelompok ETEC dan EPEC mempunyai dosis infeksi yang lebih besar ( $10^7$ - $10^{10}$  sel) dibandingkan dengan kelompok *E. coli* EHEC dan EIEC ( $1.0 \times 10^1$ - $2.0 \times 10^2$  sel) (FDA 2012). Penggunaan metode PCR, diharapkan dapat mengidentifikasi kelompok dan jenis *E. coli* patogen lebih spesifik supaya karakterisasi risikonya juga akan lebih akurat.

Tabel 8.2 Target gen *E. coli* patogen pada analisis PCR

Patotipe	Target gen	Faktor virulensi
ETEC	<i>LT</i>	Enterotoksin labil panas
	<i>ST</i>	Enterotoksin stabil panas
EPEC	<i>Eae</i>	Intimin
	<i>bfpA</i>	<i>Bundle forming pilus</i>
	Plasmid EAF	Faktor adheren EPEC
EHEC	<i>Eae</i>	Intimin
	<i>rfbE</i>	O157 antigen
	<i>fliC</i>	H7 antigen
	<i>stx1</i>	Toksin Shiga 1
	<i>stx2</i>	Toksin Shiga 2
	<i>Wzx</i>	Flippase
	<i>ihp1</i>	<i>Inserted hypothetical protein 1</i>
	<i>uidA</i>	$\beta$ -Glucoronidase
	<i>hlyA</i>	Haemolisin
	<i>Saa</i>	Faktor pelekatan
	<i>katP</i>	Katalase peroksidase
	<i>ehxA</i>	Enterohaemolisin
EIEC	<i>ipaH</i>	Plasmid invasi (pINV)
EAEC	<i>aggR</i>	Regulator transkripsi
	pCVD432 plasmid EAST 1 ( <i>astA</i> )	Plasmid agregatif adheren (pAA)

Tabel 8.2 Target gen *E. coli* patogen pada analisis PCR (Lanjutan)

Patotipe	Target gen	Faktor virulensi
DAEC	<i>daaD</i>	Dr adhesin fenotipe
ETEC + EPEC + EHEC	<i>rpoB</i>	RNA polimerase subunit $\beta$

Sumber: Elizaquivel *et al.* 2013

### C. ANALISIS *E. COLI* PATOGEN MENGGUNAKAN MULTIPLEKS PCR (MPCR)

Multipleks PCR (mPCR) merupakan bagian dari PCR dengan dua atau lebih sekuen target dapat diamplifikasi dengan memasukkan lebih dari satu pasang primer dalam reaksi yang sama. Multipleks PCR memiliki kelebihan dibanding dengan simpleks PCR (Tabel 8.3). Pengembangan metode analisis dengan mPCR ini dilakukan karena mampu mendeteksi beberapa patotipe *E. coli* sekaligus.

Tabel 8.3. Kelebihan metode multipleks

Parameter	Kelebihan metode multipleks
Biaya	Jumlah reaksi berkurang, penggunaan reagen menjadi lebih hemat (enzim, dNTP, dll), sehingga kebutuhan biaya menjadi lebih murah
Jumlah DNA sampel	Jumlah DNA yang dibutuhkan menjadi lebih hemat, karena metode multipleks dapat mendeteksi lebih dari satu target gen untuk dianalisis dalam satu reaksi yang sama
Reliabiliti (mengurangi pengaruh kesalahan dalam memipet)	Kualitas data meningkat karena target gen ternormalisasi dalam satu reaksi yang sama dengan kemungkinan kesalahan proses pipet lebih kecil

Beberapa studi telah banyak mengaplikasikan penggunaan mPCR untuk mengidentifikasi serta membedakan strain patogen *E. coli* pada pangan maupun pada sampel non pangan (Tabel 8.4). Kim *et al.* (2010) melakukan sebuah studi mengenai pengembangan pengujian mPCR pada 4 patotipe *E. coli* (EHEC, ETEC, EPEC, dan EIEC) dengan validasi metodenya diaplikasikan pada sampel daging giling dan salad. Hasil pengujianya menunjukkan limit deteksi mPCR sebesar  $10^5$ - $10^7$  CFU/mL. Fratamico *et al.* (2009, 2010, 2011) melakukan studi mengenai deteksi *E. coli* dengan teknik mPCR pada berbagai sampel pangan seperti daging dan produk turunannya, susu, sari apel, dan selada. Sensitivitas hasil pengujian dengan multipleks PCR menunjukkan limit deteksi yang lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Kim *et al.* (2010), yaitu sebesar 50-225 CFU/PCR. Hasil studi Fratamico *et al.* (2009) bahkan menunjukkan limit deteksi sebesar 2 CFU/25 g atau mL pada analisis serogrup EHEC O145 dengan menggunakan media *E. coli* broth termodifikasi yang ditambah novobiosin sebagai media kulturnya. Rugeles *et al.* (2010) juga mengaplikasikan metode mPCR dalam investigasi virulensi *E. coli* patogen pada sampel selada dan bayam. Hasil analisis menunjukkan bahwa kelompok *E. coli* terdeteksi pada sampel pangan yaitu EAEC dan EHEC. Studi yang serupa juga dilakukan oleh Kagambega *et al.* (2012) pada 120 sampel produk daging (36 daging sapi, 36 jeroan sapi, 24 daging domba, 24 daging ayam), yang mampu mendeteksi keberadaan EHEC, EPEC, ETEC, dan EAEC pada sampel.

Tabel 8.4 Aplikasi mPCR dalam identifikasi dan deteksi *E. coli* patogen

Strain/Kelompok	Target gen	Sampel	Limit deteksi	Pengkayaan	Deteksi	Referensi
Matriks Pangan:						
EHEC O145	<i>stx1, stx2, wzx, wzy</i>	Daging giling, selada, susu mentah	2 CFU/25 g atau mL	mEC + novobiosin	TaqMan probe	Fratamico <i>et al.</i> (2009)
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>stx1, stx2, wzy<sub>O157b</sub>, fliC<sub>h7</sub>, eae</i>	Sari apel, susu, selada, daging giling	225 CFU/PCR	TSB	Gel elektroforesis	Fratamico <i>et al.</i> (2010)
EHEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145)	<i>stx1, stx2, eae, wzx</i>	Daging giling	50 CFU/PCR	mTSB (24 jam)	TaqMan probe	Fratamico <i>et al.</i> (2011)
DEC	<i>stx1, stx2, inv, st, lt, eae</i>	Daging giling dan salad	10 <sup>5</sup> CFU/mL ( <i>stx1, stx2</i> ); 10 <sup>6</sup> CFU/mL ( <i>eae, lt</i> ); 10 <sup>7</sup> CFU/mL ( <i>st, inv</i> )	TSB (37°C, 24 jam)	gel elektroforesis	Kim <i>et al.</i> (2010)

Tabel 8.4 Aplikasi mPCR dalam identifikasi dan deteksi *E. coli* patogen (Lanjutan)

Strain/Kelompok	Target gen	Sampel	Limit deteksi	Pengkayaan	Deteksi	Referensi
Matriks Pangan:						
DEC	<i>lt, st, eae, stx1, stx2, bfp, ipaH</i>	Daging giling, sosis, burger, kofta	-	mTSB + novobiosin (37°C, 18- 24 jam)	gel elektroforesis	Mohammed (2012)
DEC	<i>stx1, stx2, eae, bfp, hlyA, elt, est, aggR</i>	Daging dan jeroan sapi mentah	-	<i>Buffered Peptone Water</i>	gel elektroforesis	Kagambega <i>et al.</i> (2012)
DEC	<i>stx, eae, bfp, aggR, lt, st, daa, ipaH</i>	Daging, selada, bayam	-	<i>lauril sulphate broth</i>	gel elektroforesis	Rugeles <i>et al.</i> (2010)
<i>E. coli</i> (O26:H11, O103:H2, O111:H8)	<i>stx, eae, fliC, wzx</i>	Keju susu mentah	-	-	PFGE	Madic <i>et al.</i> (2011)

Tabel 8.4 Aplikasi mPCR dalam identifikasi dan deteksi *E. coli* patogen (Lanjutan)

Strain/Kelompok	Target gen	Sampel	Limit deteksi	Pengkayaan	Deteksi	Referensi
<b>Matriks Pangan:</b>						
DEC	<i>Stx1, stx2, eae, aggR</i>	Daging, salad, susu pasterurisasi	-	LB broth	SYBR green	Kagkli <i>et al.</i> 2012
<b>Matriks Non Pangan</b>						
DEC	<i>eae, bfp, hlyA, lt, st, CVD432, ial</i>	Feses pasien penderita diare	10 <sup>3</sup> CFU/mL	<i>Mac Conkey agar</i>	gel elektroforesis	Hegde <i>et al.</i> (2012)
<i>E. coli</i> O157	<i>rfbE, stx1, stx2, eae</i>	Feses ternak	2.2 – 3.5 x 10 <sup>3</sup> CFU/mL	<i>blood agar plate</i> (37°C, 24 jam)	TaqMan probe	Noll <i>et al.</i> 2015
EHEC (O157 dan non-O157)	<i>wzx, stx1, stx2, eae, rfb</i>	Feses ternak	6.5 x 10 <sup>6</sup> CFU/mL	<i>blood agar plate</i> (37°C, 24 jam)	gel elektroforesis	Bai <i>et al.</i> (2012)

Tabel 8.4 Aplikasi mPCR dalam identifikasi dan deteksi *E. coli* patogen (Lanjutan)

Strain/Kelompok	Target gen	Sampel	Limit deteksi	Pengkayaan	Deteksi	Referensi
Matriks Non Pangan:						
DEC	<i>aeae, aggR, daaD, ipaH, st, stx1, stx2, lt</i>	Feses pasien penderita diare	-	<i>Mac Conkey agar</i> (37°C, 24 jam)	SYBR green (Kurva pelelehan)	Guion <i>et al.</i> (2008)
EHEC	<i>Stx1, stx2, eae</i>	fezes	-	BHIB (37 °C; 24 jam)	SYBR green	Chassagne <i>et al.</i> (2009)
DEC	<i>bfp, eae, lt, CVD432, st, stx1, stx2</i>	Feses bayi penderita diare	-	LB (37°C, 24 jam)	gel elektroforesis	Tobias dan Vutukuru (2012)
DEC	<i>aeae, CVD432, st, lt, ipaH, stx1, stx2</i>	fezes	-	<i>Mac Conkey agar</i> (37°C, 18 jam)	TaqMan probe	Hardegen <i>et al.</i> (2010)

Tabel 8.4 Aplikasi mPCR dalam identifikasi dan deteksi *E. coli* patogen (Lanjutan)

Strain/Kelompok	Target gen	Sampel	Limit deteksi	Pengkayaan	Deteksi	Referensi
Matriks Non Pangan:						
DEC	<i>Lt, st, eae, bfp, PCVD432, ipaH, stx1, stx2,</i>	Feses pasien penderita diare	-	LB (37°C, 24 jam)	Gel elektroforesis	Sjoling <i>et al.</i> (2014)

Penggunaan metode multipleks pada analisis deteksi bakteri patogen, memerlukan optimasi metode untuk meningkatkan efisiensi serta efektifitas pengujian. Ada beberapa parameter penentu kesuksesan metode multipleks selama proses deteksi, seperti penetapan suhu *annealing*, konsentrasi  $MgCl_2$  yang digunakan, konsentrasi primer, kondisi siklus, dan lain sebagainya. Untuk lebih jelasnya, berikut uraian lengkap parameter mPCR yang perlu dilakukan optimasi.

Proses PCR memerlukan komponen-komponen PCR seperti DNA *template*, primer, dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates*), buffer PCR,  $MgCl_2$ , dan enzim polimerase DNA. Multipleks PCR mengaplikasikan lebih dari satu primer dalam setiap prosesnya. Hal ini menyebabkan spesifisitas primer masing-masing pasangan dan pemerataan dari amplifikasi secara keseluruhan dapat menjadi masalah.

Optimasi komponen multipleks sangat bergantung dari kemurnian serta konsentrasi DNA templat yang digunakan, konsentrasi primer, konsentrasi dNTPs dan  $MgCl_2$ , konsentrasi buffer PCR, taq DNA polymerase, suhu siklus pada PCR, serta penggunaan adjuvant (DMSO, gliserol dan BSA) (Markoulatos *et al.* 2002; Henegariu *et al.* 1997).

Meskipun dengan teknik simpleks PCR konvensional diperoleh hasil yang sama, pendekatan mPCR memungkinkan untuk deteksi simultan yang cepat, praktis, dan sederhana karena dilakukan sekaligus dalam satu reaksi (Kingombe *et al.* 2010). Secara umum optimasi proses PCR dapat dilakukan dengan cara memvariasikan kondisi yang digunakan pada proses PCR tersebut. Keberadaan lebih dari satu pasang primer pada teknik mPCR meningkatkan kemungkinan memperoleh produk amplifikasi palsu, terutama karena pembentukan dimer primer.

## **1. Teknik Isolasi dan Ekstraksi DNA**

Isolasi DNA merupakan tahap pertama dari teknik analisis molekuler. Prinsip dasar isolasi DNA adalah serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen sel seperti protein, lipid, karbohidrat, dan komponen lainnya yang bisa saja ikut terpurifikasi

bersama DNA target. Keberadaan komponen-komponen tersebut memungkinkan terjadinya penghambatan amplifikasi asam nukleat (DNA) dengan metode PCR. Oleh sebab itu, tahap isolasi harus dilakukan dengan baik dan bebas kontaminasi. Kuantitas dan kemurnian dari DNA hasil ekstraksi merupakan faktor penting dalam deteksi menggunakan PCR (Rathnayaka 2011). Hal ini disebabkan karena kemampuan PCR untuk mengamplifikasi sekuen gen ditentukan oleh keberadaan serta jumlah dari DNA hasil ekstraksi.

Isolasi DNA merupakan prosedur multi tahap, termasuk lisis sel dengan perlakuan enzim dan atau detergen, ekstraksi DNA, dan DNA *recovery* dengan presipitasi alkohol. Proses ekstraksi DNA dapat dilakukan dengan beberapa metode ekstraksi. Salah satu faktor penting yang harus dipertimbangkan dalam pemilihan metode ekstraksi adalah waktu yang dibutuhkan untuk proses pengerjaan ekstraksi dan toksisitasnya, serta biaya dari bahan kimia yang digunakan pada saat ekstraksi (Chapela *et al.* 2007). Metode ekstraksi DNA dapat dilakukan dengan metode fenol:kloroform, metode pendidihan, alkali lisis, resin, atau menggunakan Kit komersial yang telah dikembangkan oleh industri.

Radji *et al.* (2010) melakukan sebuah studi mengenai deteksi *E. coli* dalam sampel air. Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode pendidihan. Metode ini cukup efisien dan ekonomis karena *E. coli* termasuk Gram negatif yang memiliki dinding sel yang tidak terlalu tebal sehingga mudah dilisis dengan pemanasan. Lebih lanjut Radji *et al.* (2010) menjelaskan bahwa metode pendidihan dengan pemanasan 100 °C ini mempercepat lisis dinding sel bakteri sehingga DNA dapat diekstraksi sekaligus mempermudah proses denaturasi rantai DNA ketika dilakukan amplifikasi dengan PCR. Namun, perlu diperhatikan waktu yang singkat untuk tahapan pendidihan ini agar DNA tidak mengalami kerusakan.

Germini *et al.* (2009) melakukan studi untuk melihat pengaruh metode ekstraksi terhadap 3 bakteri patogen berbeda, yaitu *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. dan *Listeria monocytogenes*. Metode ekstraksi yang dianalisis yaitu metode pendidihan, alkali lisis, guanidin isotiosianat, dan 10% chelex100 resin. DNA hasil ekstraksi dianalisis

menggunakan spektrofotometer dengan membandingkan nilai absorbansi ( $A_{260}/A_{280}$ ). Hasilnya menunjukkan bahwa ke empat metode ekstraksi cukup efisien diaplikasikan pada kultur murni baik dalam jumlah maupun kemurniannya. Penggunaan chelex resin dan guanidin isotiosianat, merupakan metode yang baik, didasarkan pada kemampuan amplifikasinya yang tinggi, nilai OD, serta kemampuan yang cukup baik ketika diterapkan pada sampel dengan matrik yang kompleks.

Penelitian lain mengenai pengaruh metode ekstraksi juga dilakukan oleh Reyes-Escogido *et al.* (2010), Ahmed *et al.* (2014) dan Dibbern *et al.* (2015). Penelitian Reyes-Escogido *et al.* (2010) memperkuat hasil studi dari Germini *et al.* (2009). Reyes-Escogido menguji 10 bakteri terhadap 3 metode ekstraksi, yaitu metode PCI (*phenol chloroform isoamylalcohol*), metode microwave, dan metode kombinasi chelex100 dengan microwave. Tiga dari 10 bakteri yang diuji adalah *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC 1175, dan *Salmonella* Enteritidis. Hasilnya menunjukkan bahwa metode chelex100-microwave menghasilkan konsentrasi DNA tertinggi dibanding dua metode lainnya (250-350 ng/ $\mu$ L), serta kemurnian DNA yang dihasilkan dari metode chelex100-microwave juga masuk dalam range nilai kemurnian DNA yang dianjurkan (1.8-2.0).

Sementara itu, Ahmed *et al.* (2014) membandingkan tiga metode ekstraksi DNA pada dua kelompok bakteri berbeda (bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif). Metode ekstraksi yang diuji yaitu metode lisis dengan microwave, metode enzimatik, dan metode pendidihan. Hasil penelitian Ahmed *et al.* (2014) menunjukkan bahwa ekstraksi DNA menggunakan metode microwave (*pre-heating*) lebih baik bila dibandingkan dengan metode enzimatik dan pendidihan. Isolasi DNA baik dari bakteri Gram positif maupun Gram negatif menggunakan metode microwave memiliki kualitas dan kuantitas DNA yang baik. Dibbern *et al.* (2015) membandingkan empat metode ekstraksi berbeda terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* pada sampel susu untuk selanjutnya dianalisis menggunakan teknik PCR. Empat metode ekstraksi yang diuji adalah metode Qiagen kit, AxyPrep kit, pendidihan, silika

kolom. Hasilnya menunjukkan tidak ada pengaruh dari metode ekstraksi terhadap konsentrasi DNA, tetapi kemurniaan DNA lebih tinggi ketika menggunakan metode Qiagen kit ( $1.76 \pm 0.136$ ) jika dibandingkan dengan tiga metode lainnya. Perbandingan hasil metode ekstraksi disajikan pada Tabel 8.5.

## 2. Primer

Primer merupakan sekuen oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA dalam reaksi berantai polimerase. Keberhasilan suatu proses PCR sangat bergantung dari primer yang digunakan. Di dalam proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses pemanjangan DNA. Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang dituju.

Desain primer sangat penting pada teknik mPCR, baik simpleks maupun multipleks. Untuk mPCR, idealnya semua pasangan primer harus memungkinkan efisiensi amplifikasi yang sama untuk target gen masing-masing. Dalam melakukan perancangan primer harus memperhatikan beberapa hal seperti:

### a. panjang primer,

Panjang primer yang baik dan umum digunakan adalah 18-28 pasang basa. Jika primer terlalu pendek dikhawatirkan spesifisitasnya juga rendah, karena sekuen primer mungkin akan menempel pada fragmen DNA yang salah. Selain itu primer yang terlalu pendek juga akan menyebabkan kesulitan dalam penentuan suhu *annealing* yang optimum. Tetapi jika primer terlalu panjang maka biaya yang perlu dikeluarkan menjadi lebih tinggi. Primer yang lebih panjang juga dikhawatirkan akan membentuk struktur sekunder dan primer dimer.

Tabel 8.5 Perbandingan hasil metode ekstraksi DNA bakteri

Bakteri	Sampel	Metode ekstraksi	Hasil		Referensi
			Konsentrasi	Kemurnian	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Dahak (sputum)	<i>TE boil</i>	7.4 pg	-	Aldous <i>et al.</i> (2005)
		<i>Prepman</i>	30.4 pg	-	
		<i>IDI</i>	42.8 pg	-	
		<i>Qiagen</i>	28.2 pg	-	
<i>P. aeruginosa</i>	Kultur murni	PCI	75 ng/ $\mu$ L	1.4	Reyes-Escogido <i>et al.</i> (2010)
		<i>Micro-wave</i>	55 ng/ $\mu$ L	1.3	
		<i>Chelex-M</i>	350 ng/ $\mu$ L	1.8	
<i>E. coli</i> ATCC 11775		PCI	162 ng/ $\mu$ L	1.5	
		<i>Micro-wave</i>	150 ng/ $\mu$ L	1.7	
		<i>Chelex-M</i>	265 ng/ $\mu$ L	1.9	
<i>Salmonella enteritidis</i>		PCI	150 ng/ $\mu$ L	1.5	
		<i>Micro-wave</i>	145 ng/ $\mu$ L	1.6	
		<i>Chelex-M</i>	250 ng/ $\mu$ L	1.9	

Tabel 8.5 Perbandingan hasil metode ekstraksi DNA bakteri (Lanjutan)

Bakteri	Sampel	Metode ekstraksi	Hasil		Referensi
			Konsentrasi	Kemurnian	
<i>E. coli</i> komensal	feses	<i>guanidium tyocyanate</i>	93.8 ng	-	Barnard <i>et al.</i> (2011)
		<i>Guanidium</i>	121.4 ng	-	
		<i>tyocyanate + <math>\alpha</math> casein</i>			
MRSA (G+) <sup>1</sup>	Kultur murni	Pendidihan	71.2 ng/ $\mu$ L	1.22	Ahmed <i>et al.</i> (2014)
		Enzimatis	62.1 ng/ $\mu$ L	1.77	
		<i>Micro-wave</i>	80.1 ng/ $\mu$ L	1.82	
ESBL (G-) <sup>2</sup>		Pendidihan	65.5 ng/ $\mu$ L	1.17	
		Enzimatis	55.5 ng/ $\mu$ L	1.55	
		<i>Micro-wave</i>	91.2 ng/ $\mu$ L	1.70	

Tabel 8.5 Perbandingan hasil metode ekstraksi DNA bakteri (Lanjutan)

Bakteri	Sampel	Metode ekstraksi	Hasil		Referensi
			Konsentrasi	Kemurnian	
<i>C. perfringens</i>	Feses yang diinokulasi	<i>Qkit</i>	7.45 ng	-	Kawase <i>et al.</i> (2014)
		<i>Ukit</i>	51.34 ng	-	
<i>S. aureus</i>	bakteri patogen	<i>Qkit</i>	3.18 ng	-	
		<i>Ukit</i>	26.41 ng	-	
<i>Salmonella Typi</i>		<i>Qkit</i>	3.97 ng	-	
		<i>Ukit</i>	53.86 ng	-	
<i>C. jejuni</i>		<i>Qkit</i>	8.16 ng	-	
		<i>Ukit</i>	34.17 ng	-	
<i>S. aureus</i>	susu	Qiagen	414.1 ng/ $\mu$ L	1.76	Dibbern <i>et al.</i> (2015)
		AxyPrep	449.25 ng/ $\mu$ L	1.36	
		Pendidihan	330.75 ng/ $\mu$ L	1.33	
		Silika kolom	625.50 ng/ $\mu$ L	1.47	

Ket:

<sup>1</sup>Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; <sup>2</sup>Extended spectrum beta lactamase

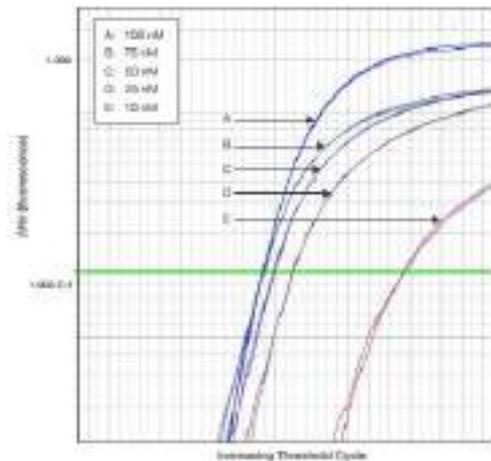
b. komposisi primer,

Komposisi primer berisi sekuen nukleotida A, T, G, C. Primer sebaiknya mengandung komponen GC 35-65% (Wang dan Seed 2006). Kandungan GC yang terlalu tinggi menyebabkan proses denaturasi yang kurang baik pada siklus serta rentan terhadap kesalahan terjadinya penempelan primer dengan *template* (*mispriming*). Sebaliknya jika GC terlalu rendah (AT banyak) memungkinkan proses ikatan antara primer dan fragmen DNA yang kurang baik, mengingat ikatan hidrogen antara pasangan A-T hanya terdiri dari 2 ikatan, sementara G-C terdiri dari 3 ikatan hidrogen. Selain itu, urutan nukleotida pada ujung 3' sebaiknya G atau C. Nukleotida A atau T lebih toleran terhadap *mismatch* dari pada G atau C, dengan demikian akan dapat menurunkan spesifisitas primer.

c. Konsentrasi primer

Konsentrasi primer merupakan salah satu parameter yang perlu disesuaikan untuk memperbaiki perbedaan efisiensi amplifikasi pada gen target (Li dan Mustapha 2004). Konsentrasi primer yang umum digunakan dalam mPCR adalah 0.1-0.5 mM (Markoulatos *et al.* 2002). Pada mPCR, jika terjadi amplifikasi yang tidak merata pada setiap target gen, dengan beberapa produk nyaris tidak terlihat bahkan setelah reaksi dioptimalkan untuk kondisi siklus, maka diperbolehkan mengubah proporsi berbagai primer dalam suatu reaksi. Salah satunya dengan peningkatan jumlah primer untuk lokus yang bersifat "lemah" dan penurunan konsentrasi untuk lokus yang bersifat "kuat". Pada real time PCR, perbedaan konsentrasi primer satu dengan yang lainnya bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi yang memberikan parameter nilai Ct paling rendah. Jika terdapat target gen yang lebih 'melimpah' dibanding target gen lainnya, maka konsentrasi primer dari target gen 'melimpah' tersebut perlu diturunkan. Gambar 8.2 menunjukkan amplifikasi dari target gen

18srRNA dengan 5 konsentrasi berbeda. Nilai Ct paling rendah dihasilkan dari konsentrasi 100 nM dan 75 nM. Kedua konsentrasi tersebut memberikan nilai Ct yang sama tetapi konsentrasi primer 75 nM menghasilkan nilai  $\Delta Rn$  (fluoresensi) yang lebih rendah sehingga konsentrasi 75 nM dipilih sebagai konsentrasi optimum diantara 4 konsentrasi lainnya.



Gambar 8.2. Pengaruh konsentrasi primer terhadap amplifikasi (nilai Ct dan fluoresensi). Amplifikasi dilakukan menggunakan Applied Biosystem 7900HT Fast Real-Time PCR. (sumber: appliedbiosystems.com)

d. Suhu pelelehan ( $T_m$ ) Primer

Pemilihan  $T_m$  suatu primer sangat penting karena  $T_m$  primer akan berpengaruh sekali di dalam pemilihan suhu *annealing* proses PCR.  $T_m$  berkaitan dengan komposisi primer dan panjang primer. Setiap komposisi G/C menyumbang sekitar 4 °C dan A/T menyumbang 2 °C terhadap nilai  $T_m$ . Sebaiknya  $T_m$  primer berkisar antara 50–65 °C. Selain itu, pemilihan primer pada mPCR sebaiknya memiliki nilai  $T_m$  yang hampir sama untuk setiap primer, baik primer *forward* maupun *reverse*. Primer dengan nilai  $T_m$  yang sama akan memudahkan

dalam penentuan suhu penempelan ( $T_a$ ) pada saat proses PCR. Perbedaan nilai  $T_m$  antara primer *forward* maupun *reverse* sebaiknya tidak lebih dari 5 °C (bahkan disarankan perbedaan antara  $T_m$  forward dan reverse hanya sekitar 1-2 °C), dengan perbedaan ukuran primer sekitar 100 pb untuk memudahkan analisis pita DNA pada deteksi dengan gel elektroforesis (Soleimani *et al.* 2012). Parameter nilai  $T_a$  yang dilakukan oleh Soleimani *et al.* (2012) disajikan pada Tabel 8.6.

Tabel 8.6 Pemilihan sekuen primer dengan nilai  $T_m$  yang hampir sama

Patotipe	Target gen	Sekuen Primer (5' – 3')	$T_m$ (°C)	Ukuran (pb)
EPEC	<i>bfp</i>	TGC TGC CAC CGT TAC CGC CAG	<b>59.97</b>	459
		GCA GTT GCC GCT TCA GCA GG	<b>59.16</b>	
EHEC	<i>stx1</i>	CGC ATA GTG GAA CCT CAC TGA CGC	<b>59.89</b>	329
		TGC CAT TCT GGC AAC TCG CGA	<b>59.39</b>	
EHEC	<i>stx2</i>	TAA CCA CAC CCC ACC GGG CA	<b>60.04</b>	586
		GGC CAC CAG TCC CCA GTA TCG C	<b>59.25</b>	

Sumber: Soleimani *et al.* (2012)

e. Interaksi antar primer

Aplikasi metode multipleks mengharuskan pengujian/analisis untuk melihat bagaimana reaksi jika satu pasangan primer digabung dengan pasangan primer lainnya. Setiap pasangan primer diutamakan tidak membentuk hairpin (>3-4 pb) dan primer dimer (>8 pb). Primer dimer merupakan saling menempelnya antar primer baik *forward* dengan *forward*, *forward* dengan *reverse*, atau *reverse* dengan *reverse*.

Tabel 8.7 merangkum beberapa sekuen primer untuk mendeteksi keberadaan bakteri *E. coli* patogen yang digunakan pada beberapa penelitian.

### 3. Konsentrasi Buffer PCR

Buffer PCR yang digunakan berkaitan dengan pH dan kapasitas buffer nya. Fungsi buffer adalah untuk menjaga pH selama proses amplifikasi berlangsung. Ada dua jenis buffer PCR yaitu “*Low-salt buffer*” (pH 8.75 dengan kapasitas buffer rendah) dan “*High-salt buffer*” (pH 9.2 dengan kapasitas buffer tinggi). Meningkatkan konsentrasi buffer 2X dapat meningkatkan efisiensi reaksi multipleks (Henegairu *et al.* 1997). Pasangan primer dengan produk amplifikasi yang panjang cocok diterapkan pada konsentrasi buffer yang rendah, sedangkan pasangan primer produk amplifikasi yang pendek, lebih cocok dipadukan dengan konsentrasi buffer yang tinggi. Pada panjang DNA target antara 0 – 5 kb biasanya diperlukan “*low-salt buffer*” sedangkan untuk panjang DNA target lebih besar dari 5 kb digunakan “*high-salt buffer*”.

### 4. Konsentrasi $MgCl_2$ dan dNTP

Selain buffer PCR diperlukan juga adanya ion  $Mg^{2+}$ , yang berasal  $MgCl_2$ .  $MgCl_2$  bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polimerase. Adanya  $MgCl_2$  akan meningkatkan interaksi primer dengan templat yang membentuk kompleks larut dengan dNTP (senyawa antara). Dalam proses PCR, konsentrasi  $MgCl_2$  berpengaruh pada spesifisitas dan perolehan produk. Selain itu, optimasi konsentrasi  $Mg^{2+}$  sangat penting karena Taq DNA polimerase adalah enzim yang bergantung pada keberadaan magnesium. Umumnya konsentrasi optimal  $MgCl_2$  berkisar antara 1.0 – 1.5 mM. Konsentrasi  $MgCl_2$  yang terlalu rendah akan menurunkan perolehan PCR, sedangkan konsentrasi yang terlalu tinggi akan menyebabkan akumulasi produk non target yang disebabkan oleh terjadinya *mispriming*.

Tabel 8.7 Sekuen dan karakteristik primer yang digunakan dalam deteksi *E. coli* patogen

Target Gen	Sekuen primer (5' – 3')	Ukuran (pb)	% GC	Tm (°C)	Ta (°C)	Referensi
<i>lt</i>	GCA CAC GGA GCT CCT CAG TC	218	65	62.9	51.0	Kim <i>et al.</i> (2010)
	TCC TTC ATC CTT TCA ATG GCT TT		40	56.0		
<i>st</i>	TCA CCT TTC CCT CAG GAT GC	179	55	59.0	42.1	
	ATA TTA TTA ATA GCA CCC GG		35	47.1		
<i>eae</i>	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC	881	54	63.4	58.4	
	CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G		64	67.9		
<i>stx1</i>	CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G	150	41	52.3	47.3	
	AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC		52	58.5		
<i>stx2</i>	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G	584	50	57.9	51.8	
	GCG TAT CGT ATA CAC AGG AGC		52	56.8		
<i>inv</i>	TTT CCC TCT TGC CTG CAT ATG CGC	465	54	64.5	51.4	
	CTC ACC ATA CCA TCC AGA AAG AAG		46	56.4		

Tabel 8.7 Sekuen dan karakteristik primer yang digunakan dalam deteksi *E. coli* patogen (Lanjutan)

Target Gen	Sekuen primer (5' – 3')	Ukuran (pb)	% GC	Tm (°C)	Ta (°C)	Referensi
<i>lt</i>	GAA CAG GAG GTT TCT GCG TTA GGT G	655	52	61.7	52.0	Kagambega <i>et al.</i> (2012)
	CTT TCA ATG GCT TTT TTT TGG GAG TC		38	57.0		
<i>estIb</i>	TGT CTT TTT CAC CTT TCG CTC	171	43	54.8	49.8	
	CGG TAC AAG CAG GAT TAC AAC AC		48	57.4		
<i>estIa</i>	CCT CTT TTA GYC AGA CAR CTG AAT CAS TTG	157	43	60.6	54.5	
	CAG GCA GGA TTA CAA CAA AGT TCA CAG		44	59.5		
<i>eaeA</i>	TCA ATG CAG TTC CGT TAT CAG TT	482	39	55.5	50.5	
	GTA AAG TCC GTT ACC CCA ACC TG		52	59.5		
<i>bfbB</i>	GAC ACC TCA TTG CTG AAG TCG	910	52	57.6	52.6	
	CCA GAA CAC CTC CGT TAT GC		55	57.6		
<i>stx1</i>	CGA TGT TAC GGT TTG TTA CTG TGA CAG C	244	46	61.3	55.1	
	AAT GCC ACG CTT CCC AGA ATT G		50	60.1		
<i>stx2</i>	GTT TTG ACC ATC TTC GTC TGA TTA TTG AG	324	38	57.2	52.5	
	AGC GTA AGG CTT CTG CTG TGA C		55	61.5		

Tabel 8.7 Sekuen dan karakteristik primer yang digunakan dalam deteksi *E. coli* patogen (Lanjutan)

Target Gen	Sekuen primer (5' – 3')	Ukuran (pb)	% GC	Tm (°C)	Ta (°C)	Referensi
<i>hly</i>	TTC TGG GAA ACA GTG ACG CAC ATA	688	46	59.9	53.2	Kagambega <i>et al.</i> (2012)
	TCA CCG ATC TTC TCA TCC CAA TG		48	58.2		
<i>ipaH</i>	GAA AAC CCT CCT GGT CCA TCA GG	437	57	62.0	57.0	
	GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC		65	69.4		
<i>invE</i>	CGA TAG ATG GCG AGA AAT TAT ATC CCG	766	44	58.7	53.7	
	CGA TCA AGA ATC CCT AAC AGA AGA ATC AC		41	58.7		
<i>aggR</i>	ACG CAG AGT TGC CTG ATA AAG	400	48	56.5	51.4	
	AAT ACA GAA TCG TCA GCA TCA GC		43	56.4		
<i>astA</i>	TGC CAT CAA CAC AGT ATA TCC G	102	45	55.8	50.8	
	ACG GCT TTG TAG TCC TTC CAT		48	57.5		
<i>uidH</i>	ATG CCA GTC CAG CGT TTT TGC	1487	52	61.0	53.2	
	AAA GTG TGG GTC AAT AAT CAG GAA GTG		41	58.2		

Tabel 8.7 Sekuen dan karakteristik primer yang digunakan dalam deteksi *E. coli* patogen (Lanjutan)

Target Gen	Sekuen primer (5' – 3')	Ukuran (pb)	% GC	Tm (°C)	Ta (°C)	Referensi
<i>lt</i>	GCA CAC GGA GCT CCT CAG TC	218	65	62.9	51.0	Rugeles <i>et al.</i> (2010)
	TCC TTC ATC CTT TCA ATG GCT TT		39	56.0		
<i>st</i>	GCT AAA CCA GTA GAG (C)TC TTC AAA A	147	40	56.4	51.4	
	CCC GGT ACA G(A)G CAG GAT TAC AAC A		52	62.3		
<i>eae</i>	CTG AAC GGC GAT TAC GCG AA	917	55	60.1	48.3	
	CGA GAC GAT ACG ATC CAG		56	53.3		
<i>bfpA</i>	AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC	326	57	64.1	54.3	
	GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA		52	59.3		
<i>stx</i>	GAG CGA AAT AAT TTA TAT GTG	518	29	44.8	39.8	
	TGA TGA TGG CAA TTC AGT AT		35	49.5		
<i>ipaH</i>	CTC GGC ACG TTT TAA TAG TCT GG	933	48	57.3	52.3	
	GTG GAG AGC TGA AGT TTC TCT GC		52	59.9		
<i>virF</i>	AGC TCA GGC AAT GAA ACT TTG AC	618	43	57.3	51.0	
	TGG GCT TGA TAT TCC GAT AAG TC		43	56.0		
<i>daaE</i>	GAA CGT TGG TTA ATG TGG GGT AA	542	43	56.7	51.7	
	ATT CAC CGG TCG GTT ATC AGT		48	57.2		

Tabel 8.7 Sekuen dan karakteristik primer yang digunakan dalam deteksi *E. coli* patogen (Lanjutan)

Target Gen	Sekuen primer (5' – 3')	Ukuran (pb)	% GC	Tm (°C)	Ta (°C)	Referensi
<i>lt</i>	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC	450	55	57.8	47.0	Mohammed (2012)
	CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT		45	52.0		
<i>st</i>	ATT TTT MTT TCT GTA TTR TCT T	190	18	42.9	37.9	
	CAC CCG GTA CAR GCA GGA TT		57	60.2		
<i>eae</i>	CTG AAC GGC GAT TAC GCG AA	917	55	60.1	48.3	
	CCA GAC GAT ACG ATC CAG		56	53.3		
<i>bfpA</i>	AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC	326	57	64.1	54.3	
	GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA		52	59.3		
<i>stx1</i>	ATA AAT CGC CAT TCG TTG ACT AC	180	39	54.3	49.3	
	AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC		52	58.5		
<i>stx2</i>	GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC	255	57	60.6	50.9	
	TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G		45	55.9		
<i>ipaH</i>	GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C	600	57	67.4	62.4	
	GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC		65	69.4		

Tabel 8.7 Sekuen dan karakteristik primer yang digunakan dalam deteksi *E. coli* patogen (Lanjutan)

Target Gen	Sekuen primer (5' – 3')	Ukuran (pb)	% GC	Tm (°C)	Ta (°C)	Referensi
<i>eae</i>	CTT TGA CGG TAG TTC ACT GGA C	170	50	57.0	50.2	Fratamico <i>et al.</i> (2011)
	CAA TGA AGA CGT TAT AGC CCA AC		43	55.2		
<i>stx1</i>	GAC TGC AAA GAC GTA TGT AGA TTC G	150	44	57.0	52.0	
	ATC TAT CCC TCT GAC ATC AAC TGC		46	57.6		
<i>stx2</i>	ATT AAC CAC ACC CCA CCG	200	56	56.3	50.6	
	GTC ATG GAA ACC GTT GTC AC		50	55.6		
<i>O26 wzx</i>	GTA TCG CTG AAA TTA GAA GCG C	158	45	56.0	51.0	
	AGT TGA AAC ACC CGT AAT GGC		48	57.1		
<i>O111wzx</i>	TGT TCC AGG TGG TAG GAT TCG	237	52	58.2	50.9	
	TCA CGA TGT TGA TCA TCT GGG		48	55.9		
<i>O45 wzx</i>	CGT TGT GCA TGG TGG CAT	72	56	57.8	51.8	
	TGG CCA AAC CAA CTA TGA ACT G		45	56.8		
<i>O121wzx</i>	AGG CGC TGT TTG GTC TCT TAG A	189	50	60.0	52.1	
	GAA CCG AAA TGA TGG GTG CT		50	57.1		

Tabel 8.7 Sekuen dan karakteristik primer yang digunakan dalam deteksi *E. coli* patogen (Lanjutan)

Target Gen	Sekuen primer (5' – 3')	Ukuran (pb)	% GC	Tm (°C)	Ta (°C)	Referensi
<i>O103 wzx</i>	TTG GAG CGT TAA CTG GAC CT	191	50	57.6	51.4	Fratamico <i>et al.</i> (2011)
	ATA TTC GCT ATA TCT TCT TGC GGC		42	56.4		
<i>O145 wzx</i>	AAA CTG GGA TTG GAC GTG G	118	53	56.6	51.6	
	CCC AAA ACT TCT AGG CCC G		58	57.9		
<i>It</i>	ACG GCG TTA CTA TCC TCT C	273	53	55.2	49.9	Sjoling <i>et al.</i> (2014)
	TGG TCT CGG TCA GAT ATG TG		50	54.9		
<i>STp</i>	TCT TTC CCC TCT TTT AGT CAG	166	43	52.8	47.8	
	ACA GGC AGG ATT ACA ACA AAG		43	53.9		
<i>STh</i>	TTC ACC TTT CCC TCA GGA TG	120	50	55.8	48.5	
	CTA TTC ATG CTT TCA GGA CCA		43	53.5		
<i>eae</i>	TCA ATG CAG TTC CGT TAT CAG TT	482	39	55.5	50.5	
	GTA AAG TCC GTT ACC CCA ACC TG		52	59.5		
<i>bfp</i>	GGA AGT CAA ATT CAT GGG GGT AT	300	43	56.3	51.3	
	GGA ATC AGA CGC AGA CTG GTA GT		52	60.2		

Tabel 8.7 Sekuen dan karakteristik primer yang digunakan dalam deteksi *E. coli* patogen (Lanjutan)

Target Gen	Sekuen primer (5' – 3')	Ukuran (pb)	% GC	Tm (°C)	Ta (°C)	Referensi
<i>stx1</i>	CAG TTA ATG TGG TGG CGA AGG	384	52	57.8	52.6	Sjoling <i>et al.</i> (2014)
	CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG		52	57.6		
<i>stx2</i>	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G	584	50	57.9	52.9	
	GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C		55	59.6		
<i>pCVD432</i>	CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT	194	45	53.1	45.4	
	AAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T		32	50.4		
<i>lt</i>	AGC GGC GCA ACA TTT CAG	113	56	58.4	52.8	Hardegen <i>et al.</i> (2010)
	TTG GTC TCG GTC AGA TAT GTG ATT C		44	57.8		
<i>st</i>	CTG GTT TTG ATT CAA ATG TTC GTG	107	37	54.1	49.1	
	TCC TGA GGG AAA GGT GAA AAA GAC		46	58.7		
<i>eae</i>	ACT GGA CTT CTT ATT RCC GTT CTA TG	189	40	56.5	50.5	
	CTA AGC GGG TAT TGT TAC CAG A		45	55.5		
<i>Stx1</i>	CTT CCA TCT GCC GGA CAC ATA	87	52	58.5	48.5	
	ATT AAT ACT GAA TTG TCA TCA TCA TGC AT		28	53.5		

Tabel 8.7 Sekuen dan karakteristik primer yang digunakan dalam deteksi *E. coli* patogen (Lanjutan)

Target Gen	Sekuen primer (5' – 3')	Ukuran (pb)	% GC	Tm (°C)	Ta (°C)	Referensi
<i>Stx2</i>	GAC GTG GAC CTC ACT CTG AAC TG	82	56	61.2	55.9	Hardegen <i>et al.</i> (2010)
	TCC CCA CTC TGA CAC CAT CC		60	60.9		
<i>ipaH</i>	GAA CTC AAA TCT TGC ACC ATT CA	107	39	54.9	49.9	
	CGT CCG TCC GAG AAC AAT TAA G		50	57.4		
<i>lt</i>	CTC TAT GTG CAC ACG GAG C	322	58	57.4	49.3	Hegde <i>et al.</i> (2012)
	CCA TAC TGA TTG CCG CAA T		47	54.3		
<i>st</i>	TCT TTC CCC TCT TTT AGT CAG TC	170	43	55.5	50.5	
	CCG CAC AGG CAG GAT TAC		61	58.1		
<i>eae</i>	TGA TAA GCT GCA GTC GAA TCC	229	48	56.4	51.4	
	CTG AAC CAG ATC GTA ACG GC		55	57.6		
<i>bfp</i>	CAC CGT TAC CGC AGG TGT GA	450	60	61.8	56.8	
	GTT GCC GCT TCA GCA GGA GT		60	62.7		
<i>hlyA</i>	GCA TCA TCA AGC GTA CGT TCC	534	52	58.4	53.3	
	AAT GAG CCA AGC TGG TTA AGC T		45	58.3		
<i>CVD432</i>	CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT	630	45	53.1	46.4	
	CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T		36	51.4		

Tabel 8.7 Sekuen dan karakteristik primer yang digunakan dalam deteksi *E. coli* patogen (Lanjutan)

Target Gen	Sekuen primer (5' – 3')	Ukuran (pb)	% GC	Tm (°C)	Ta (°C)	Referensi
lt	ACG GCG TTA CTA TCC TCT C	273	53	55.2	49.9	Tobias dan Vutukuru (2012)
	TGG TCT CGG TCA GAT ATG TG		50	54.9		
estA1	TCT TTC CCC TCT TTT AGT CAG	166	43	52.8	47.8	
	ACA GGC AGG ATT ACA ACA AAG		43	53.9		
estA2-4	TTC ACC TTT CCC TCA GGA TG	120	50	55.8	48.5	
	CTA TTC ATG CTT TCA GGA CCA		43	53.5		
eae	TCA ATG CAG TTC CGT TAT CAG TT	482	39	55.5	50.5	
	GTA AAG TCC GTT ACC CCA ACC TG		52	59.5		
bfp	GGA AGT CAA ATT CAT GGG GGT AT	300	43	56.3	51.3	
	GGA ATC AGA CGC AGA CTG GTA GT		52	60.2		
stx1	CAG TTA ATG TGG TGG CGA AGG	348	52	57.8	52.6	
	CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG		52	57.6		
stx2	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G	584	50	57.9	52.9	
	GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C		54	59.6		
CVD432	CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT	630	45	53.1	45.4	
	AAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T		32	50.4		

Konsentrasi optimal dNTPs ditentukan oleh panjang target DNA yang diamplifikasi. Pada panjang target DNA kurang dari 1 kb biasanya digunakan konsentrasi dNTPs sebanyak 100  $\mu\text{M}$ , sedangkan untuk panjang target DNA lebih besar dari 1 kb diperlukan konsentrasi dNTPs sebanyak 200  $\mu\text{M}$  (Markoulatos *et al.* 2002). Pada mPCR, konsentrasi  $\text{MgCl}_2$  dipertahankan konstan (2 mM), sedangkan konsentrasi dNTP dapat diubah-ubah sesuai keperluan (umumnya meningkat secara bertahap dari 0.5-1.6 mM). Konsentrasi dNTP yang rendah (100  $\mu\text{M}$ ) memungkinkan adanya amplifikasi, tetapi jumlah produk yang dihasilkan kecil. Kombinasi perbandingan konsentrasi dNTP dan  $\text{MgCl}_2$ , menunjukkan bahwa konsentrasi 200  $\mu\text{M}$  untuk masing-masing dNTP berbanding dengan 1.5-2.0 mM  $\text{MgCl}_2$  (Markoulatos *et al.* 2002). Sementara itu, hasil studi Henegariu *et al.* (1997) menunjukkan bahwa amplifikasi paling efisien terjadi pada konsentrasi dNTP sebesar 200-400  $\mu\text{M}$ .

#### **5. Ratio templat DNA dengan Taq DNA polimerase**

Ketika lebih dari satu target akan diamplifikasi dari templat DNA, seperti halnya pada mPCR saat beberapa target diamplifikasi bersamaan dengan beberapa pasangan primer, maka perlu dilakukan penyesuaian rasio antara primer dengan templat untuk menghindari pembentukan dimer primer. Salah satu konsep penting dalam PCR adalah ratio optimal antara primer dengan templat. Jumlah polimerase DNA yang digunakan bergantung dari panjang fragmen DNA yang akan diamplifikasi. Pada panjang fragmen DNA kurang dari dua kilobasa diperlukan 1,25 – 2 unit per 50  $\mu\text{L}$  campuran reaksi, sedangkan untuk panjang fragmen DNA lebih besar dari dua kilobasa diperlukan 3 – 4 unit per 50  $\mu\text{L}$  campuran reaksi.

## 6. Kondisi Running

Kondisi running serta jumlah siklus merupakan salah satu faktor penentu kesuksesan metode multipleks, terdiri dari 5 tahapan dengan suhu dan waktu tertentu, yaitu:

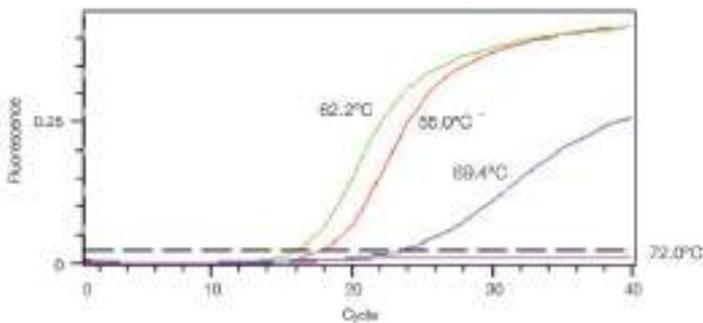
1. Pra denaturasi
2. Denaturasi
3. *Annealing*
4. Ekstensi
5. Pasca ekstensi

Tahap pra denaturasi dan denaturasi umumnya dilakukan pada suhu 94-95 °C. Suhu tinggi ini memungkinkan untai ganda DNA terbuka menjadi untai tunggal. Lama waktu proses pra denaturasi umumnya dilakukan antara 3-10 menit, sementara tahap denaturasi dapat dilakukan kurang dari 60 detik, bahkan pada beberapa studi dengan ukuran produk yang kecil, waktu yang dibutuhkan selama proses denaturasi hanya sekitar 15 detik (Tobias dan Vutukuru 2012).

Suhu *annealing* menjadi sangat kritis menentukan keberhasilan metode multipleks PCR. Suhu *annealing* merupakan suhu ketika primer mulai menempel pada fragmen DNA untuk memulai polimerisasi. Pemilihan suhu *annealing* berkaitan dengan  $T_m$  primer yang digunakan untuk proses PCR. Itu sebabnya dalam metode multipleks PCR, setiap pasangan primer diharuskan memiliki nilai  $T_m$  yang hampir sama, sehingga penentuan suhu *annealing* menjadi mudah. Suhu *annealing* yang digunakan dapat dihitung berdasarkan  $(T_m - 5) ^\circ\text{C}$  sampai dengan  $(T_m + 5) ^\circ\text{C}$  (Henegariu *et al.* 1997)

Efisiensi proses *annealing* dari pasangan primer dapat bervariasi karena perbedaan kandungan GC dan panjangnya, serta suhunya. Perbedaan kecil dalam konten GC dan suhu *annealing* pada primer dapat berpotensi menimbulkan amplifikasi tidak merata dalam kondisi multipleks. Dalam kasus ini, jumlah yang berbeda dari pasangan primer individu digunakan untuk mengoptimalkan reaksi bahkan amplifikasi

(Henegariu *et al.* 1997). Penetapan suhu *annealing* yang dilakukan menggunakan PCR konvensional (PCR standar) dilakukan dengan mengujikan beberapa suhu *annealing* pada semua target gen dan suhu optimum yang dipilih adalah suhu yang memberikan hasil kenampakan pita DNA pada semua target gen hasil analisis lanjut dengan elektroforesis pada agarose. Sementara itu, penetapan suhu *annealing* secara real time PCR dipilih berdasarkan nilai Ct yang dihasilkan. Suhu *annealing* optimum adalah suhu yang memberikan parameter Ct terendah (amplifikasi berlangsung lebih cepat) (Gambar 8.3).



Gambar 8.3 Perbandingan suhu *annealing* terhadap amplifikasi (nilai Ct)  
(Sumber: BioRad)

Tahap Ekstensi dan pasca ekstensi umum dilakukan pada suhu 72 °C. Ini merupakan suhu optimum untuk enzim Taq polimerase bekerja dan memperpanjang segmen DNA spesifik. Pada beberapa alat real time tertentu, seperti Applied Biosystem 7500 atau 7900, tahap *annealing* sering kali digabungkan dengan tahap ekstensi. Kedua tahap ini dilakukan bersamaan pada suhu sekitar 60 °C selama 60 detik (1 menit).

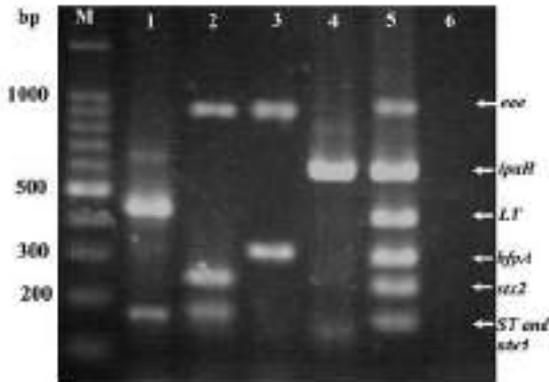
### **Aplikasi Metode Multipleks PCR pada Deteksi *E. coli* Patogen**

Setelah semua kondisi optimum, langkah selanjutnya adalah mengaplikasikan metode multipleks tersebut untuk mendeteksi

keberadaan bakteri *E. coli* pada pangan. Aplikasi metode multipleks PCR dapat dilakukan secara kualitatif maupun kuantitatif.

#### *Kualitatif Multipleks PCR*

Kualitatif multipleks PCR dilakukan hanya sebatas pada ada atau tidaknya target gen virulensi pada sampel. Analisis dilakukan dengan elektroforesis menggunakan agarose setelah proses PCR selesai. Data yang diperoleh merupakan kenampakan pita-pita DNA hasil elektroforesis pada agarose sesuai dengan ukuran produknya. Gambar 8.4 merupakan contoh hasil analisis *E. coli* patogen menggunakan multipleks PCR pada daging yang dilakukan oleh Mohammed (2012). Virulensi *E. coli* yang dijadikan sebagai target gen adalah *eeae*, *ipaH*, *LT*, *ST*, *bfpA*, *stx1*, dan *stx2*.



Gambar 8.4 Contoh hasil analisis multipleks PCR pada deteksi *E. coli* (sumber: Mohammed 2012)

Penentuan ukuran produk menjadi salah satu faktor penting dalam multipleks PCR. Sebaiknya, setiap produk pada pengujian multipleks PCR memiliki perbedaan setidaknya 100 pb untuk memudahkan pemisahan pada agarose sehingga setiap produk dapat

terpisah sempurna dan memudahkan pembacaan. Aplikasi metode multiplex PCR telah mampu mendeteksi 6 target gen berbeda dalam satu reaksi yang sama (Mohammed 2012).

Sensitivitas pengujian dari metode multiplex PCR umumnya lebih rendah dibanding dengan simpleks. Pengujian simpleks PCR pada analisis deteksi *eae*, *lt*, *stx1*, *stx2*, *inv*, dan *st* pada *E. coli* menghasilkan sensitivitas sebesar 3-6 log CFU/mL. Tetapi ketika pengujian dilakukan secara multiplex PCR, sensitivitas menurun menjadi 5-7 log CFU/mL (Kim *et al.* 2010).

### *Kuantitatif Multiplex PCR*

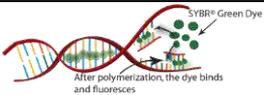
Kuantitatif multiplex PCR umumnya sering disebut multiplex real time PCR (multiplex rt-PCR) dilakukan menggunakan suatu label (*fluorescent reporter molecules*) untuk memonitor proses amplifikasi produk selama siklus reaksi PCR berlangsung (Navarro *et al.* 2014). Lebih lanjut, menurut Navarro *et al.* (2014), label dapat dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu:

1. Molekul interkelasi dsDNA (dye)  
Ctohnya seperti SYBR Green I, Eva green, dll.
2. *Fluorophore-labeled* nukleotida, di bagi lagi menjadi 3 sub kelompok berdasarkan jenis fluoresen yang digunakan, yaitu:
  - Primer-probe, contohnya: scorpion, amplifluor, LUX, cycliconss, Angler.
  - probe, contohnya: TaqMan, MGB-TaqMan, Snake assay (hidrolisis probe); FRET, molecular beacon (hibridisasi probe)
  - Asam nukleat analog, contohnya: PNA, LNA, ZNA, dan lain sebagainya

Perbedaan serta kelebihan dan kekurangan dari kedua label ini dapat dilihat pada Tabel 8.8. Pada banyak studi serta penelitian yang telah dilakukan, penggunaan dye seperti SYBR green sebagai label fluoresen merupakan yang paling banyak digunakan. Hal ini disebabkan

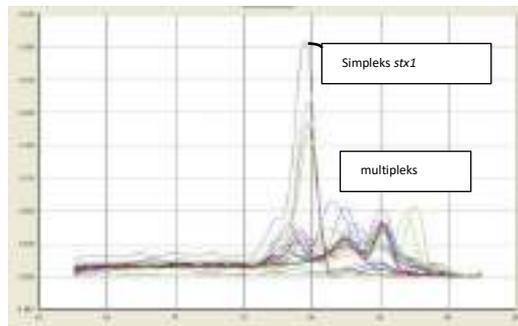
karena kemudahan serta harga yang lebih ekonomis dibanding dengan probe.

Tabel 8.8 Perbedaan *dye* dan *probe*

	Lebel Fluoresensi	
	Dye (SYBR green)	Probe (Taqman)
Mekanisme	 <p>SYBR green yang bebas, akan berikatan dengan setiap untai ganda yang terbentuk pada setiap penambahan siklus. SYBR yang terikat akan berpendar dan pendarannya akan terdeteksi oleh instrumen sebagai kenaikan fluoresensi.</p>	 <p>Probe terdiri dari 'reporter' pada ujung 5' dan 'quencher' pada ujung 3'. Pada tahap <i>annealing</i>, probe akan menempel pada fragmen DNA target. Ketika masuk tahap ekstensi, reporter pada probe akan terlepas. Reporter yang bebas akan terdeteksi oleh instrumen.</p>
Kelebihan	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Murah</li> <li>2. Mudah dalam desain dan setting</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. spesifisitas tinggi</li> <li>2. dapat digunakan dalam sistem multipleks</li> </ol>
Kekurangan	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Spesifisitas rendah</li> <li>2. Perlu dilakukan optimasi reaksi sebelumnya</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. mahal</li> <li>2. Desain serta setting lebih sulit</li> </ol>
Analisis kurva pelelehan	Perlu	Tidak perlu

### *Kurva Pelelehan pada Analisis Multipleks rt-PCR menggunakan SYBR Green*

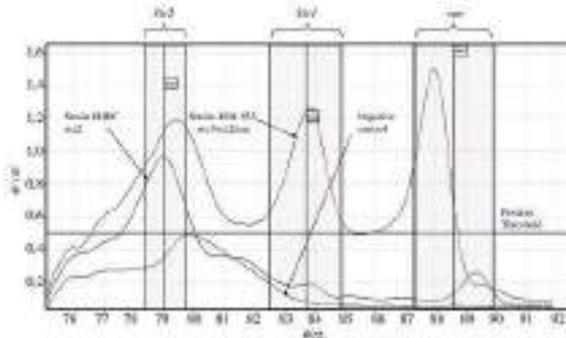
Penggunaan *dye* seperti SYBR green sebagai label, umumnya diikuti/dilanjutkan dengan analisis kurva pelelehan. Pada metode multipleks, analisis ini dilakukan untuk membedakan setiap produk amplifikasi. Salah satu dampak yang ditimbulkan ketika metode multipleks diaplikasikan pada sistem *real time* yaitu adanya penurunan nilai fluoresensi. Kurva pelelehan pada metode multipleks terbentuk lebih rendah jika dibandingkan dengan simpleks. Hal ini wajar terjadi karena penggunaan beberapa jumlah primer dan templat akan mengakibatkan penyerapan fluoresensi menjadi terbagi, sehingga nilainya menjadi lebih rendah (Gambar 8.5).



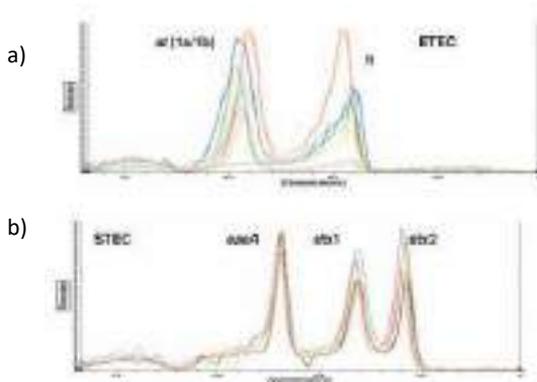
Gambar 8.5 Perbedaan nilai fluoresensi antara simpleks dan multipleks.  
(sumber: Komalasari 2017)

Studi yang dilakukan oleh Chasagne *et al.* (2009) dan Guion *et al.* (2009) menggunakan SYBR green sebagai label, mampu mendeteksi 2 target gen pada ETEC dan 3 target gen pada EHEC. Kurva pelelehan disajikan pada Gambar 8.6 dan 8.7. Menurut Guion *et al.* (2009), kurva pelelehan dari setiap produk amplikon dapat terpisah dengan sempurna jika setiap produk amplikon memiliki selisih suhu sekitar 4 °C. Aplikasi

dari metode multiplex rt-PCR yang menggunakan *dye* sebagai label, sejauh ini baru dilakukan pada 3 target gen saja. Pengujian lebih dari 3 target gen belum terlaporkan. Tetapi penggunaan probe sebagai label pada pengujian multiplex telah berhasil mendeteksi sampai dengan 4 target gen (Fratamico *et al.* 2011).



Gambar 8.6 Kurva pelelehan  $stx1$  ( $83.7 \pm 1.2$ ),  $stx2$  ( $79 \pm 0.7$ ), dan  $eae$  ( $88.6 \pm 1.3$ ) °C pada bakteri EHEC (Sumber: Chassagne *et al.* 2009)

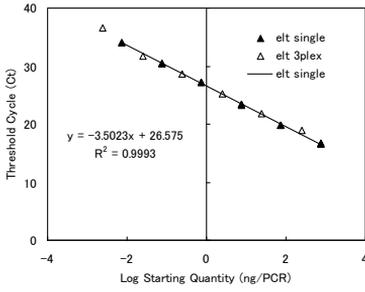


Gambar 8.7. Kurva pelelehan dupleks rt-PCR pada ETEC (a) dan tripleks rt-PCR pada EHEC(b) (Sumber: Guion *et al.* 2008)

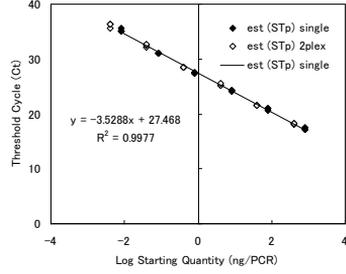
### *Sensitivitas (Limit Deteksi) Multipleks rt-PCR*

Pengujian sensitivitas merupakan analisis yang sering dilakukan pada pengujian kuantitatif PCR. Hal ini dilakukan untuk melihat jumlah konsentrasi (DNA atau sel bakteri) terendah yang masih dapat terdeteksi (teramplifikasi) dengan metode multipleks yang digunakan. Menurut Ramesh *et al.* (2002), salah satu kekurangan dari penerapan metode multipleks adalah mengurangi sensitivitas jika dibandingkan dengan pengujian secara simpleks. Pengujian sensitivitas penting dilakukan untuk melihat nilai efisiensi yang dihasilkan dan umum dilakukan dengan membuat kurva standar. Kurva standar merupakan kurva hubungan antara log konsentrasi dengan nilai Ct yang diperoleh sehingga menghasilkan satu persamaan linear  $y = ax + b$ . Persamaan tersebut digunakan untuk kuantifikasi konsentrasi *E. coli* dalam sampel (sumbu y), dimana x merupakan nilai Ct yang dihasilkan pada real time.

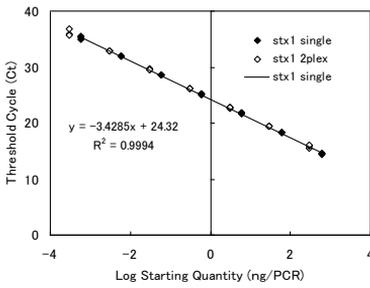
Efisiensi yang dihasilkan dihitung dari nilai *slope* (kemiringan) pada kurva standar (nilai a pada persamaan). Pada pengujian umum rt-PCR, baik simpleks ataupun multipleks, nilai Efisiensi berkisar antara 90-110% dengan rentang nilai *slope* -3.1 sampai -3.6. Efisiensi diatas 110% merupakan indikator terjadinya *pipetting error*, terjadi amplifikasi pada produk non spesifik, dan keberadaan primer dimer (Pestana *et al.* 2010). Selain itu, keberadaan inhibitor pada suatu reaksi rt-PCR dapat ditunjukkan dengan meningkatnya nilai efisiensi yang dikarenakan meningkatnya nilai Ct dan penurunan nilai absolut dari *slope*. Jika nilai  $E = 100\%$ , artinya DNA tepat melipat ganda menjadi dua setiap siklus. Nilai efisiensi pada pengujian multipleks sebaiknya tidak terlalu berbeda dengan efisiensi pada pengujian simpleks. Gambar 8.8 menunjukkan beberapa kurva standar yang dihasilkan dari perbandingan antara pengujian simpleks dan multipleks pada target gen *E. coli* (Hidaka *et al.* 2008). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Hidaka *et al.* (2008) menghasilkan nilai sensitivitas sebesar  $1.7 \times 10^2$  sampai  $1.1 \times 10^4$  CFU/mL.



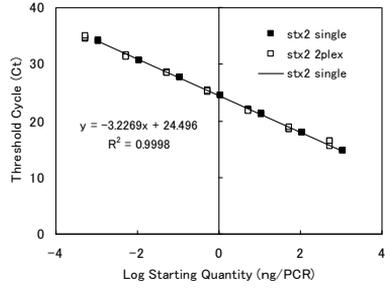
(a)



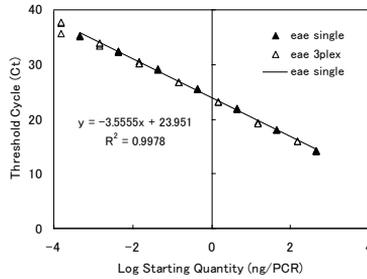
(b)



(c)



(d)



(e)

Gambar 8.9 Kurva standar target gen (a) LT; (b)ST; (c) stx1; (d) stx2; (e) eae

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed OB, Asghar AH, Elhassan MM. 2014. Comparison of three DNA extraction methods for polymerase chain reaction (PCR) analysis of bacterial genomic DNA. *Afr J Microbiol Res.* 8(6):598-602
- Aldous WK, Pounder JI, Cloud JL, Woods GL. 2005. Comparison of six methods of extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 43: 2471-2473.
- Bai J, Paddock ZD, Shi X, Li S, An B, Nagaraja TG. 2012. Applicability of a multiplex PCR to detect the seven major Shiga toxin producing *Escherichia coli* based on genes that code for serogroup specific O-antigens and major virulence factors in cattle feses. *Foodborne Pathogens and Disease.* 9(6): 541-548
- Baker CA, Rubenelli PM, Park SH, Carbonero F. 2015. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food: incidence, ecology, and detection strategies. *Food Control.* 59: 407-419
- Barnard TG, Robertson CA, Jagals P, Potgieter N. 2011. A rapid and low-cost DNA extraction method for isolating *Escherichia coli* DNA from animal stools. *African Journal of Biotechnology* 10(8) : 1485-1490.
- Chapela MJ, Sotelo CG, Perez-Martin RI, Pardo MA, Perez-Villareal B, Gilardi P, Riese J. 2007. Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control*, 18, 1211 – 1215
- Chassagne L, Nathalie P, Frederic R, Valerie L, Richard B, Julien D. 2009. Detection of stx1, stx2, and eae genes of enterohemorrhagic *Escherichia coli* using SYBR green in a real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 64: 98-101.
- Dibbern AG, Botaro BG, Viziack MP, Silva LFP, Santos MV. 2015. Evaluation of methods of DNA extraction from Staphylococcus

- aureus in milk for use in real-time PCR. *Genetics and Molecular Research*. 14(1): 227-233
- Elizaquivel P, Sanchez G, Aznar R. 2013. Real-time PCR detection of foodborne pathogenic *Escherichia coli*. *Real-time PCR in food science: Current technology and applications*. Lazaro DR, editor. Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 91-115
- [FDA] Food and Drug Administration. 2011. Bacteriological analytical manual. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Chapter 4A. Food and Drug Association (FDA). <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>. Diakses pada 07 September 2015
- [FDA] Food and Drug Administration. 2012. *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, 2<sup>nd</sup> ed.* Silver Spring: FDA.
- Fratamico PM, DebRoy C, Miyamoto T, Liu Y. 2009. PCR detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 in food by targeting genes in the *E. coli* O145 O-antigen gene cluster and the shiga toxin 1 and shiga toxin 2 genes. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6(5): 605-611
- Fratamico PM, DebRoy C. 2010. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food using real-time multiplex PCR assays targeting the stx1, stx2, wzyO157, and fliCh7 or eae genes. *Food Anal Methods*. 3: 330-337
- Fratamico PM, Bagi LK, Cray Jr WC, Narang N, Yan X, Medina M, Liu Y. 2011. Detection by multiplex real-time PCR assays and isolation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroup O26, O45, O103, O111, O121, and O145 in ground beef. *Foodborne Pathogens and Disease*. 8(5): 6-1-607
- Germini A, Masola A, Carnevali P, Marchelli R. 2009. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and

- Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. *Food Control*. 20: 733-738
- Guion CE, Ochoa TJ, Walke CM, Barletta F, Cleary TG. 2008. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting curve analysis and real time multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 46(5): 1752-1757
- Hardegen C, Messler S, Henrich B, Pfeffer K, Wurthner J, MacKenzie CR. 2010. A set of novel multiplex Taqman real time PCRs for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli* and its use in determining the prevalence of EPEC and EAEC in a university hospital. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 9(5):1-7
- Hidaka A, Hokyo T, Arikawa K, Fujihara S, Ogasawara J, Hase A, Hara-Kudo Y, Nishikawa Y. 2008. Multiplex real-time PCR for exhaustive detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. *J of App Microbiol*. 106: 410-420.
- Hegde A, Ballal M, Shenoy S. 2012. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Indian J of Medical Microbiology*. 30(3): 279-284
- Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTech* 23: 504-511
- [ISO 16654:2001] International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuff – Horizontal method for the detection and enumeration of *Escherichia coli* O157:H7
- Jasson V, Jacxsens L, Luning P, Rajkovic A, Uyttendaele M. 2010. Alternative microbial methods: an overview and selection criteria. *Food Microbiology*. 27: 710-730
- Kagambega A, Martikainen O, Lienemann T, Siitonen A, Traore AS, Barro N, Haukka K. 2012. Diarrheagenic *Escherichia coli* detected by 16-plex PCR in raw meat and beef intestines sold at local

- markets in Ougadougou, Burkina Faso. *Int J of Food Microbiol.* 153: 154-158
- Kawase J, Kurosaki M, Kawakami Y, Kashimoto T, Tsunomori Y, Sato K, Ikeda T, Yamaguchi K, Watahiki M, Shima T, Kameyama M, Etoh Y, Horikawa K, Fukushima H, Goto R, Shirabe K. 2014. Comparison of two methods of bacterial DNA extraction from human fecal samples contaminated with *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, and *Campylobacter jejuni*. *Jpn. J. Infect. Dis.* 67 : 441-446.
- Kagkli DM, Folloni S, Barbau-Piednoir E, den Eede HV, Bulcke MV. 2012. Towards a pathogenic *Escherichia coli* detection platform using multiplex SBYR *green real-time* PCR methods and high resolution melting analysis. *Plos One.* 7(6):e39287. DOI: 10.1371/journal.pone.0039287.
- Kim KH, Cho JI, Cheung CY, Lim JM, Cho S, Cho DH, Kang CS, Kim DH. 2010. Development of multiple PCR assays to identify *Escherichia coli* pathogenic genes in food. *J. Food Sci Biotechnol.* 19(5): 1205-1210
- Kingombe CIB, D'Aoust JY, Huys G, Hoffman L, Rao M, Kwan J, 2010. Multiplex PCR method for detection three *Aeromonas* Enterotoxin genes. *J Appl Environ Microbiol.* 76 (2): 425-433. doi: 10.1128/AEM.01357-09.
- Komalasari E. 2017. Pengembangan metode deteksi *Escherichia coli* patogenik menggunakan multiplex rt-PCR. Tesis. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Li Y, Mustapha A. 2004. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in apple cider and produce by a multiplex PCR. *Journal of Food Protection* 67(1): 27-33.
- Madic J, Vingadassalon N, Garam CP, Marault M, Scheutz F, Brugere H, Jamet E, Auvray F. 2011. Detection of Shiga toxin producing *Escherichia coli* serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8,

- O145:H28, and O157:H7 in raw milk cheeses by using multiplex real time PCR. *Appl and Envi Microbiol.* 77(6): 2035-2041
- Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clinical Laboratory Analysis.* 16: 47-51. doi: 10.1002/jcla.2058
- Mohammed MAM. 2012. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from meat products sold at Mansoura city, Egypt. *Food Control.* 25: 159-164
- Navarro E, Serrano-Heras G, Castano MJ, Solera J. 2014. Real-time PCR detection cheistry. *Clinica Chimica Acta.* DOI: 10.1016/j.cca.2014.10.017
- Noll LW, Shridhar PB, Shi X, An B, Cernicchiaro N, Renter DG, Nagaraja TG, Bai J. 2015. A four-plex real time PCR assay, based on rfbE, stx1, stx2, dan eae genes, for detection and Quantification of Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157 in Cattle Feces. *Foodborne Pathogens and Disease.* doi: 10.1089/fpd.2015.1951
- O'Sullivan J, Bolton DJ, Duffy G, Baylis C, Tozzoli R, Wasteson Y, Lofdahl S. 2006. Methods for detection and molecular characterisation of pathogenic *Escherichia coli*. Ashtown Food Research Centre: Pathogenic *Escherichia coli* Network
- Pestana E, Belak S, Diallo A, Crowther JR, Viljoen GJ. 2010. *Early, rapid and sensitive veterinary molecular daignostics real-time PCR application.* Springer Netherlands.
- Radji M, Puspaningrum A, Sumiati A. 2010. Deteksi cepat bakteri *Escherichia coli* dalam sampel air dengan metode polymerase chain reaction menggunakan primer 16E1 dan 16E2. *Makara Sains.* 14(1):39-43
- Ramesh A, Padmapriya BP, Chrashekar A, Varadaraj MC. 2002. Application of a convenient DNA extraction method and multiplec PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus*

- and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. *Mol Cell Probe.* 16: 307-314.
- Rathnayaka RMUSK. 2011. Evaluation of five DNA extraction methods in the detection of *Salmonella enterica* from meat using nested PCR. *J of Agricultural Sciences.* 6(1): 24-31
- Reyes-Escogido L, Balam-Chi M, Rodriguez-Buenfil I, Valdes J, Kameyama L, Martinez-Perez F. 2010. Purification of bacterial genomic DNA in less than 20 min using *chelex-100 microwave*: examples from strains of lactic acid bacteria isolated from soil samples. *Antonie van Leewenhoek.* 98: 456-474.
- Rivas L, Mellor GE, Gobius K, Fegan N. 2015. *Detection and typing strategies for pathogenic Escherichia coli.* Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition.
- Rugeles LC, Bai J. Martinez AJ. 2010. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. *Int J of Microbiol.* 138: 282-286
- Singh P, Prakash A. 2008. Isolation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Listeria monocytogenes* from milk product sold under market conditions at Agra region. *Acta Agriculture Slovenica.* 92:83-88
- Sjoling A, Sadeghipoorjahromi L, Novak D, Tobias J. 2014. Detection of major diarrheagenic bacterial pathogens by multiplex PCR panel. *Microbiological Research.* Doi. 10.1016/j.micres.2014.12.003
- Soleimani M, Morovvati A, Hosseini SZ, Zolfaghari MR. 2012. Design of an improved multiplex PCR method for diagnosis of enterohaemorrhagic *E. coli* and enteropathogenic *E. coli* pathotypes. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 5(2): 106-111
- Soomro AH, Arain MA, Khaskheli M, Bhutto B. 2002. Isolation of *Escherichia coli* from raw milk and milk product in relation to public health sold under market condition at Tandijam. *Pakistan Journal of Nutrition.* 1(3): 151-152

- Tobias J, Vutukuru SR. 2012. Simple and rapid multilex PCR for identification of the main human diarrheagenic *Escherichia coli*. *Microbiological Research*. 176: 564-570
- Wang F, Yang Q, Kase JA, Meng J, Clotilde LM, Lin A, Ge B. 2013. Current trends in detecting non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. *Foodborne Pathog Dis*. 10(8): 665–677
- Wang X, Seed B. 2006. High-throughput primer and probe design. In Real Time PCR. Dorak MT (ed). BIOS advance method. Taylor and Francis Group. Pp 93-106

# IX.

## KAJIAN RISIKO

### *ESCHERICHIA COLI*

Kajian risiko telah banyak dilakukan oleh berbagai pihak baik kalangan profesional maupun akademisi untuk mengkaji kemungkinan munculnya risiko terhadap kesehatan manusia. Analisis risiko pada pangan adalah proses yang sistematis dan transparan untuk mengumpulkan, menganalisis, dan mengevaluasi informasi ilmiah maupun non-ilmiah yang relevan tentang bahaya pada pangan, sebagai landasan pengambilan keputusan untuk memilih opsi terbaik berdasarkan berbagai alternatif yang teridentifikasi untuk menangani risiko tersebut. Analisis risiko terdiri dari tiga komponen yaitu kajian risiko, manajemen risiko, dan komunikasi risiko (WHO/FAO 2011). Kajian risiko adalah suatu proses penentuan tingkat risiko yang berlandaskan data-data ilmiah. Proses ini terdiri dari empat tahap: 1) identifikasi bahaya 2) karakterisasi bahaya 3) kajian paparan 4) karakterisasi risiko (WHO/FAO 2011). Berdasarkan jenis bahayanya, kajian risiko terdiri atas kajian risiko kimia dan kajian risiko mikrobiologi. Kajian risiko kimia dilakukan terhadap bahaya kimia sementara kajian risiko mikrobiologi dilakukan terhadap bahaya mikrobiologi. Pembahasan selanjutnya akan terfokus pada kajian risiko mikrobiologi karena *E. coli* merupakan bahaya mikrobiologi. Kajian risiko memberikan kerangka dalam mengatur semua informasi dan memudahkan dalam memahami interaksi antara mikroorganisme, makanan, dan penyakit pada manusia. Kajian risiko

membantu memperkirakan risiko terhadap kesehatan manusia akibat mikroba tertentu pada pangan dan sebagai sarana membandingkan dan mengevaluasi setiap kemungkinan atau skenario berbeda, serta mengidentifikasi jenis data yang diperlukan untuk memperkirakan dan mengoptimalkan intervensi dalam mengurangi risiko (WHO/FAO 2011).

Kajian risiko mikrobiologi dapat dipertimbangkan sebagai alat dalam mengatur risiko yang disebabkan oleh patogen asal pangan dan pengembangan standar untuk pangan pada perdagangan internasional. Keamanan pangan mikrobiologi secara mendasar dibedakan dari keamanan pangan kimia, namun *framework* kajian risiko untuk mikrobiologi dan kimia adalah sama (Ashbolt 2004). Kontaminan mikrobiologi dapat masuk ke dalam pangan pada berbagai titik rantai pangan atau selama proses pengolahan. Selain itu mikroba memiliki kemampuan untuk menggandakan diri dan berinteraksi dengan pangan selama penyimpanan dan perubahan kondisi lingkungan (Havelaar *et al.* 2009).

Kajian risiko terkait risiko *E. coli* pada pangan telah dilakukan, seperti:

- Profil risiko *Escherichia coli* penghasil toksin shiga (kelompok EHEC) pada daging (New Zealand Food Safety Authority, 2014) dan susu mentah (New Zealand Food Safety Authority, 2007)
- Kajian risiko kuantitatif *E. coli* O157:H7 pada daging hamburger (Cassin *et al.* 1998)
- Kajian risiko *E. coli* O157:H7 pada daging giling (USDA-FSIS 2001)
- Kajian risiko *E. coli* O157 pada “steak” di Belanda (Nauta *et al.* 2001)
- *Escherichia coli* O157:H7 pada daging burger di Irlandia (Teagasc/AFDA 2006).

Salah satu metode untuk kajian risiko adalah *quantitative risk assessment* (QRA). *Quantitative risk assessment* (QRA) adalah metodologi yang digunakan untuk mengatur dan menganalisis informasi ilmiah untuk memperkirakan probabilitas dan tingkat keparahan (Cassin *et al.* 1998). Metode ini dapat diterapkan untuk keamanan pangan, membantu mengidentifikasi tahapan pembuatan, distribusi, penanganan, dan konsumsi pangan yang berkontribusi terhadap peningkatan risiko penyakit akibat pangan dan membantu memfokuskan sumber daya dan upaya yang efektif dalam mengurangi risiko patogen pada pangan (Cassin *et al.* 1998). *Process risk model* (PRM) adalah integrasi dan aplikasi dari metodologi QRA dengan analisis skenario dan prediksi mikrobiologi untuk memberikan penilaian objektif terhadap karakteristik higienis suatu proses pengolahan pangan.

#### **A. IDENTIFIKASI BAHAYA *E. COLI* PATOGEN**

Identifikasi bahaya merupakan tahap pertama yang dilakukan dalam analisis kajian risiko yang bertujuan untuk mengidentifikasi mikroba yang mungkin ada dan menjadi kontaminan pada pangan tertentu. Bahaya didefinisikan sebagai agen yang memiliki efek buruk pada kesehatan manusia dan mungkin menimbulkan risiko jangka pendek, bersifat kronis, bahkan fatal bagi seseorang. Identifikasi bahaya mikroba yang terkait dengan pangan tertentu umumnya didasarkan pada informasi yang dihasilkan dari analisis rutin pada satu komoditas atau dari hubungan epidemiologi patogen tertentu dengan kasus infeksi yang ditularkan melalui pangan.

Proses identifikasi bahaya dalam kajian risiko *E. coli* patogen dilakukan dengan cara mengumpulkan semua informasi terkait mikroba *E. coli* dan pangan yang menjadi fokus perhatian. Proses identifikasi bahaya pada analisis kajian risiko *E. coli* harus mampu menjawab pertanyaan-pertanyaan seperti:

1. Bagaimana karakteristik *E. coli* (kaitkan dengan kondisi pertumbuhan seperti suhu, pH, Aw, dan sebagainya)?
2. Apakah patogen (*E. coli*) terdapat pada bahan baku (kaitkan dengan sumber-sumber kontaminasi)?
3. Apakah proses pengolahan pangan akan mengeliminasi *E. coli* secara menyeluruh (kaitkan antara proses pengolahan pangan yang menjadi fokus perhatian terhadap karakteristik pertumbuhan serta ketahanan *E. coli*)?
4. Apakah *E. coli* dapat mengkontaminasi produk setelah proses produksi dilakukan (kaitkan dengan titik kritis jalur kontaminasi)?
5. Apakah *E. coli* patogen pernah menyebabkan masalah sebelumnya, dikaitkan dengan produk sejenis (review pustaka mengenai kejadian-kejadian/*outbreaks* yang disebabkan oleh *E. coli*)?
6. Apakah *E. coli* termasuk organisme yang bersifat INFECTIOUS atau TOXINOGENIC?
7. Apakah *E. coli* dapat tumbuh/berkembang dalam pangan tersebut?

Berdasarkan pertanyaan-pertanyaan tersebut, proses identifikasi bahaya harus mampu menjelaskan dan mengumpulkan informasi tidak hanya terkait mikroba tetapi juga jenis pangan serta proses pembuatannya. Informasi dapat dikumpulkan melalui data yang dipublikasikan oleh lembaga internasional melalui laman webnya di internet untuk mendapatkan sejumlah data terkait bakteri patogen serta *outbreaks* yang ditimbulkan. Berikut merupakan beberapa lembaga internasional yang dapat dijadikan sebagai referensi dalam penyusunan identifikasi bahaya (Tabel 9.1).

Tabel 9.1 Daftar situs yang dapat diakses untuk mengumpulkan informasi terkait bakteri patogen

Sumber	Link
EU commission Food and Feed Safety	<a href="http://ec.europa.eu/food/food/index_en.htm">http://ec.europa.eu/food/food/index_en.htm</a>
New Zealand Food Safety Authority_Risk Profile	<a href="http://www.foodsafety.govt.nz/science-risk/hazard-data-sheets/pathogen-data-sheets.htm">http://www.foodsafety.govt.nz/science-risk/hazard-data-sheets/pathogen-data-sheets.htm</a>
Food Risk.org	<a href="http://www.foodrisk.org/">http://www.foodrisk.org/</a>
WHO/FAO	<a href="http://www.who.int/foodsafety/en">http://www.who.int/foodsafety/en</a>
CODEX alimentarius	<a href="http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp">http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp</a>
European Food Safety Agency	<a href="Http://www.efsa.europa.eu/">Http://www.efsa.europa.eu/</a>

## B. KARAKTERISASI BAHAYA *E. COLI* PATOGEN

Tahap kedua kajian risiko *E. coli* patogen setelah identifikasi bahaya adalah karakterisasi bahaya. Proses karakterisasi bahaya *E. coli* dilakukan pada setiap jenis *E. coli* yang teridentifikasi sesuai kelompok *E. coli* patogen. Karakterisasi bahaya harus mampu menjawab pertanyaan-pertanyaan yang dapat mengembangkan pemahaman mengenai karakter bahaya yang ditimbulkan. Pertanyaan tersebut dapat berupa:

1. Apa penyakit yang ditimbulkan oleh patogen terkait, dalam hal ini masing-masing jenis *E. coli* patogen?
2. Apa gejala yang ditimbulkan dan lama waktu sebelum onset?

3. Kemungkinan rentang bahaya yang ditimbulkan? menyebabkan kematian atau tidak?
4. Berapa dosis minimum (dosis infeksi) yang diperlukan untuk menimbulkan gejala?
5. Siapa yang menjadi populasi risiko utama dari patogen terkait?

Karakterisasi bahaya yang mungkin ditimbulkan oleh bakteri *E. coli* patogen dirangkum dalam Tabel 9.2. Konsep penting pada karakterisasi bahaya adalah “Dosis-Respon”, yaitu merupakan batas minimum yang diperlukan oleh patogen untuk menyebabkan respon yang merugikan (sakit, infeksi, atau kematian).

### **Hubungan Dosis-Respon**

Pada tahap karakterisasi bahaya terdapat penilaian hubungan antara dosis dengan respon yang ditimbulkan. *E. coli* O157:H7 dapat menyebabkan sakit walaupun dalam jumlah kecil. Jika dosis infeksi yang dimiliki sangat rendah, terdapat risiko terjadinya infeksi walaupun tidak terjadi pertumbuhan bakteri tersebut di makanan yang terkontaminasi (Anon, 1999). Berdasarkan analisis pada makanan yang menyebabkan keracunan, kemampuan penularan dari manusia ke manusia, dan kemampuan patogen bertahan pada kondisi asam sehingga mampu bertahan di lambung memperkirakan dosis infeksi dari *E. coli* patogen seperti *E. coli* O157:H7 adalah kurang dari beberapa ribu sel bahkan <10 sel, Doyle *et al.* (1997). Penelitian lainnya menunjukkan <2 sel per 25 gram makanan cukup untuk menyebabkan infeksi.

Penilaian dosis-respon dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu dilakukan dengan melakukan intervensi terhadap hewan uji atau intervensi terhadap relawan (manusia) yang mengkonsumsi mikroba pada konsentrasi tertentu dan dilakukan pengamatan-pengamatan terhadap gejala klinis yang terjadi. Biasanya, intervensi pada manusia digunakan untuk mikroba patogen yang menyebarkan penyakit melalui

air atau dihubungkan dengan konsumsi makanan yang berasal dari hewan laut. Sistem penilaian ini masih sedikit dilakukan karena keterbatasan jumlah subjek penelitian (terhadap manusia) dan banyaknya ketidakpastian hasil dari pendefinisian infeksi dan penyakit serta variasi strain patogen yang beragam.

Tabel 9.2 Karakterisasi bahaya *E. coli* patogen

<i>Patotipe</i>	Dosis infeksi (CFU)	Penyakit yang ditimbulkan	Populasi risiko
<i>ETEC</i>	$10^8$	Diare disertai kram perut. Beberapa kasus dapat disertai dengan pusing dan sakit kepala	Anak-anak di negara-negara berkembang serta wisatawan/turis
<i>EPEC</i>	$10^8 - 10^{10}$	Diare berair atau diare berdarah, dapat disertai pula dengan demam dan muntah	Sebagian besar bayi serta anak-anak di negara berkembang
<i>EHEC</i>	<50-100	Diare yang disertai dengan kram perut, 30-60% kasus disertai mual dan muntah, <30% disertai pula dengan demam. Infeksi yang lebih serius dapat menyebabkan hemoragik kolitis (HC), sindrom uremik hemolitik (HUS), dan TTP (thrombotic thrombocytopenic purpura)	Anak-anak serta orang dewasa di seluruh dunia
<i>EIEC</i>	$>10^6$	Diare berdarah	Anak-anak usia 2-5 tahun

Cara lain dalam menilai dosis-respon adalah dengan mengumpulkan informasi jumlah dari mikroba atau toksin yang ada di dalam pangan yang menyebabkan keracunan dari suatu outbreak (kejadian luar biasa), dan menghubungkan nilai tersebut dengan informasi persentase oral yang menunjukkan gejala penyakit yang sedang diteliti. Informasi yang diperoleh dengan cara ini lebih realistis dibandingkan dengan yang diperoleh dengan cara sebelumnya yang dijelaskan di atas.

### **Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Dosis-Respon**

Sejauh ini, dosis respon untuk penyakit bawaan pangan yang diakibatkan oleh bakteri patogen sangat bervariasi, bergantung dari berbagai faktor, seperti karakteristik virulensi dari patogen yang berbeda atau strain yang berbeda, jumlah sel yang tertelan, dan kondisi kerentanan dari tiap konsumen terhadap suatu bahan pangan. Interaksi berbagai faktor tersebut mempengaruhi hubungan dosis dengan respon (Buchanan *et al*, 2000). Berikut merupakan uraian faktor-faktor yang mempengaruhi hubungan antara dosis-respon pada *E. coli*.

#### **1. Faktor terkait patogen: faktor virulensi**

Karakteristik virulensi *E. coli* O157:H7 antara lain menghasilkan toksin shiga, *enterohaemolysin*, *intimin*, plasmid *pO157*, dan EAST1. *E. coli* O157 memiliki kemampuan memproduksi satu atau dua tipe toksin shiga, yaitu *shiga-like toxin* atau *Shiga-like toxin2* (Mead dan Griffin 1998). *Shiga-like toxin 1* (*stx1*) tidak dapat dibedakan dari *Shiga toxin* yang dihasilkan *Shigella dysenteriae* tipe 1. *Escherichia coli* O157:H7 memiliki sistem transportasi Fe yang memungkinkan penggunaan hemoglobin sebagai sumber Fe dan membantu terjadinya infeksi (Torres dan Payne 1997).

## 2. Faktor terkait patogen: efek keragaman strain pada virulensi

Pola produksi *in vitro* toksin shiga dapat berbeda bergantung tipe strain *E. coli* O157:H7 (Wagner *et al.* 2001). Baker *et al.* (1997) menemukan *E. coli* O157 yang diisolasi dari manusia lebih virulen dibandingkan dengan yang diisolasi dari ternak. Ritchie *et al.* (2003) menemukan produksi stx2 secara *in vitro* dari *E. coli* O157:H7 yang diisolasi dari penderita HUS secara signifikan lebih besar dibandingkan yang diisolasi dari sapi. Sebuah studi *in vitro* menggunakan 123 strain *E. coli* O157 menunjukkan *E. coli* O157:H7 yang diisolasi dari manusia memang memiliki kecenderungan memproduksi stx2 *in vitro* (Avery 2003).

## 3. Faktor terkait inang: efek cairan lambung terhadap virulensi

Kemampuan *E. coli* O157:H7 bertahan selama melewati cairan lambung di dalam tubuh inang menggambarkan hubungan dosis-respon. Hasil penelitian Takumi *et al.* (2000) menunjukkan 20-80% *E. coli* O157:H7 yang masuk ke saluran pencernaan dapat bertahan hidup sampai ke usus halus dan tanpa mengalami inaktivasi oleh pH rendah. Hal ini dikarenakan terjadi kenaikan pH sementara dari cairan lambung setelah konsumsi makanan. McKellar dan Knight (1999) melaporkan strain penyebab keracunan enterohemorrhagic *E. coli* (serotype O157:H7) dapat bertahan pada pH sangat asam 2.0 dibandingkan strain yang lainnya. Strain penyebab keracunan dan penyebab infeksi memiliki kemampuan bertahan lebih baik dari pada strain non patogen.

## 4. Faktor terkait inang: Kerentanan inang

Infeksi *E. coli* O157:H7 dapat terjadi di populasi dan tingkatan umur mana pun. Namun, penyakit akibat *E. coli* O157:H7 paling mudah menyerang bayi atau anak kecil (<4 tahun) dan orang tua (>65 tahun). anak-anak usia di bawah lima tahun rentan terkena *hemolytic uremic*

*syndrom* (HUS) sementara orang tua atau jompo mudah terkena *thrombotic thrombocytopenic purpura* (TTP) (Baker *et al.* 1999).

Data yang diperoleh dari hasil penentuan dosis-respon dapat dibuat model peluang untuk menduga risiko infeksi yang terjadi jika kontak dengan berbagai konsentrasi mikroba. Perkiraan dosis respon dari *E. coli* O157:H7 menggunakan model beta-Poisson memberikan nilai  $1.9 \times 10^5$  sel sebagai dosis median (50% penderita mengalami gejala) dengan probabilitas 0.06 kejadian infeksi ketika terpapar 100 sel (Powell *et al.* 2000).

Dosis respon dari setiap patogen memiliki level batas terendah dan tertinggi, yang disebut ambang batas dosis respon. Level batas terendah patogen untuk menginfeksi dikenal dengan istilah dosis infeksi minimal (*minimum infection dose = MID*) (FAO/WHO 2003). MID merupakan suatu kemampuan patogen pada dosis tertentu untuk dapat menyebabkan penyakit. Metode ambang batas dan penggunaan *MID* telah digunakan setelah beberapa kejadian luar biasa yang diakibatkan oleh mengonsumsi bakteri patogen dalam jumlah kecil (Buchanan *et al.* 2009).

Delignette-Muller dan Cornu (2008) menghitung peluang sakit dan konsentrasi *E. coli* O157:H7 dengan menggunakan model beta-binomial dengan menetapkan batas bawah dan batas atas peluang sakit. Model yang digunakan tersebut menggunakan EPEC dan *Shigella* masing-masing sebagai batas bawah dan batas atas. Dua model dosis respon digunakan untuk anak-anak dan orang dewasa, model dosis respon yang digunakan menjelaskan tentang peluang infeksi yang diperoleh dari mengalikan peluang sakit dengan suatu koefisien, dimana koefisien tersebut tidak lebih dari 10%. Model untuk dosis respon yang tertelan oleh *E. coli* O157:H7 untuk anak usia dibawah 5 tahun dan diatas 5 tahun adalah ( $D_{[0-5]}$ ) dan ( $D_{[5-10]}$ ).

Teagasc/AFDA (2006) memperkirakan dosis respon pada manusia dengan menggunakan data-data yang tersedia, karena

percobaan dosis respon terhadap manusia tidak dapat dilakukan dengan menggunakan bakteri yang sangat patogen. Batas bawah yang digunakan adalah batas bawah EPEC dengan asumsi bahwa patogen *E. coli* O157:H7 tidak lebih rendah dari EPEC, sedangkan *Shigella dysenteriae* dipilih sebagai batas atas dengan berdasarkan asumsi bahwa patogen *E. coli* O157:H7 tidak lebih tinggi dari *S. dysenteriae* (Powell *et al.* 2000). Model dosis respon yang digunakan adalah fungsi beta-poisson. Model tersebut menduga respon rata-rata untuk setiap dosis yang dikonsumsi, dengan anggapan bahwa *E. coli* O157:H7 terdistribusi secara acak dalam media. Fungsi tersebut berasumsi bahwa setiap satu sel *E. coli* O157:H7 mampu menyebabkan sakit. Output dari model dosis respon tersebut adalah perkiraan peluang sakit untuk suatu dosis yang spesifik.

### **C. KAJIAN PAPANAN**

Tahap ketiga dalam kajian risiko mikrobiologi setelah identifikasi serta karakterisasi bahaya adalah kajian paparan. Kajian paparan menunjukkan perkiraan seberapa besar kemungkinan seseorang atau suatu populasi terkena bahaya mikroba dan jumlah mikroba yang mungkin tertelan (Lammerding dan Fazil 2000). Tujuan kajian paparan adalah untuk mengetahui tingkat mikroba patogen, seperti *E. coli* (sel atau toksin) yang mungkin ada pada makanan pada saat konsumsi.

Data-data yang dibutuhkan dalam kajian paparan adalah:

- Informasi konsumsi
- Jumlahnya dalam pangan
- Parameter untuk pertumbuhan maupun penurunan mikroba
- Jumlah yang tertelan

Kajian paparan digunakan untuk mengukur peluang dari paparan *E. coli* pada tiap produk. Studi yang dilakukan oleh Ebel *et al.* (1992) mengenai kajian risiko *E. coli* O157:H7 pada daging giling, membagi

tahapan kajian paparan dengan 3 sub data, yaitu (1) tahap produksi, (2) tahap pemotongan hewan (pemisahan jeroan, pemisahan, pemotongan), dan (3) tahap persiapan (grinding, transportasi, penyimpanan, distribusi, pemasakan, konsumsi).

Smith *et al.* (2013) mengumpulkan berbagai model parameter prevalensi dan konsentrasi *E. coli* O157:H7 dan mengevaluasi prevalensi pada berbagai tahapan dirantai pangan, seperti untuk kajian risiko *E. coli* pada daging, maka kajian paparan dapat dilakukan pada tahapan proses produksi, intervensi sebelum penyembelihan, penanganan setelah penyembelihan, dan penanganan setelah menjadi produk potongan daging sapi. Sementara Teagasc/AFDA (2006) membagi kajian paparan dalam tiga model, yaitu proses penyembelihan (hingga proses pengemasan potongan daging), proses pengolahan daging sapi giling (pembentukan burger daging sapi dan proses distribusi ke retail), dan penyimpanan dan pengolahan di rumah tangga (proses pemasakan dan cara konsumsi). Simulasi paparan yang dilakukan terhadap ketiga model tersebut masing-masing sebesar  $-2.69 \log$  CFU/g,  $-0.22 \log$  CFU/g dan  $0.15 \log$  CFU/sajian (100g).

Delignette-Mueller dan Cornu (2008) menyusun model paparan *E. coli* O157:H7 pada daging sapi beku untuk menjelaskan kasus kejadian luar biasa di Prancis pada seluruh jalur pangan dari proses pengemasan hingga konsumsi. Kajian paparan yang dilakukan bertujuan untuk memperkirakan jumlah produk terkontaminasi yang tertelan oleh anak usia di bawah 5 tahun dan diatas 5 tahun. Hasil kajian paparan menunjukkan paparan pada anak usia di bawah 5 tahun sebesar  $48 \times 10^6$  CFU/g dan anak-anak diatas 5 tahun sebesar  $58 \times 10^6$  CFU/g.

#### **D. KARAKTERISASI RISIKO**

Karakterisasi risiko merupakan tahap akhir dari studi kajian risiko. Karakterisasi risiko diperoleh berdasarkan hasil perhitungan kualitatif dan kuantitatif termasuk adanya ketidakpastian dari peluang

yang terjadi dan keparahannya. Hasil yang diperoleh pada tahap karakterisasi bahaya berupa perkiraan risiko per juta porsi untuk populasi sehat dan rentan.

Kombinasi intervensi yang dilakukan dalam penelitian Smith *et al.* (2013) menghasilkan rata-rata peluang sakit per sajian daging sapi giling, potongan daging sapi utuh dan potongan daging sapi tidak utuh sebesar  $8.7 \times 10^{-6}$ ,  $3.3 \times 10^{-8}$  dan  $2.9 \times 10^{-9}$ , nilai tersebut lebih kecil jika dibandingkan dengan rata-rata peluang sakit per sajian daging sapi giling, potongan daging sapi utuh dan potongan daging sapi tidak utuh tanpa intervensi masing-masing sebesar  $1.8 \times 10^{-4}$ ,  $7.0 \times 10^{-7}$  dan  $6.0 \times 10^{-8}$ . Signorini dan Tarabla (2009) melakukan karakterisasi risiko berdasarkan karakterisasi bahaya dan kajian paparan. Jumlah EHEC dalam pangan diperkirakan dengan menggunakan prediksi kajian paparan dan merupakan input untuk model dosis respon. Karakterisasi risiko diperoleh dengan memperkirakan peluang sakit per sajian hamburger untuk dewasa dan anak-anak masing-masing sebesar  $8.1 \times 10^{-7}$  dan  $3.2 \times 10^{-7}$ , sedangkan peluang keparahan diasumsikan menjadi beberapa peluang sakit untuk anak-anak dibawah usia 5 tahun, yaitu peluang HUS ( $P_{\text{HUS}}$ ) sebesar 3-9 %, peluang HUS yang memicu kematian ( $P_{\text{mortHUS}}$ ) untuk anak-anak sebesar 2.2-4.8 %, sedangkan untuk dewasa 12 %.

Delignette-Mueller dan Cornu (2008) memperkirakan peluang sakit berkembang menjadi HUS akibat tertelan satu sel *E. coli* O15:H7 untuk anak usia 0 hingga 5 tahun 5 kali lebih tinggi dari pada anak-anak usia 5 hingga 10 tahun. Duffy *et al.* (2006) mereview beberapa data penelitian dan memperoleh peluang sakit per sajian untuk potongan daging sebesar  $4.67 \times 10^{-5}$  hingga  $5.12 \times 10^{-8}$ , sedangkan peluang sakit per sajian burger daging sapi sebesar  $2.3 \times 10^{-6}$  hingga  $7.4 \times 10^{-7}$ . Teagasc/AFDA (2006) memperoleh rata-rata peluang sakit *E. coli* O157:H7 per sajian daging (burger) sebesar  $1.1 \times 10^{-6}$  yang berarti 1 dari satu juta konsumsi burger.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous 1999. The prevention of *E. coli* O157:H7 infection: a shared responsibility., Dublin (Ireland): Food Safety Authority of Ireland.
- Avery SM & Buncic S. 2003. *Escherichia coli* O157 diversity with respect to survival during drying on concrete. *Journal of Food Protection*. 66: 780–786.
- Baker M, Eyles R, Bennett J dan Nicol C. 1999. Emergence of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in New Zealand. New Zealand Public Health Report. 6: 9–12.
- Baker DR, Moxley RA. & Francis DH. 1997. Variation in virulence in the gnotobiotic pig model of O157:H7 *Escherichia coli* strains of bovine and human origin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 412: 53–58.
- Cassin MH, Lammerding AM, Todd ECD, Ross W. & McColl RS. 1998. Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *International Journal of Food Microbiology*. 41: 21–44.
- Delignette-Muller, M. L., Cornu, M., 2008. Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground beef patties consumed by young children in French households. *International Journal of Food Microbiology* (128):158-164.
- Doyle MP dan Schoeni JL. 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Applied and Environmental Microbiology*. 53: 2394–2396.
- Duffy G., Cummins E., Nally P., O'Brien S., Butler F. 2006. A review of quantitative microbial risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Meat Science* (74):76-88.
- Lammerding AM, Fazil A. 2000. Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *Int J Food Microbiol*. 58 (3): 147-157.

- McKellar RC dan Knight KP. 1999. Growth and survival of various strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in hydrochloric and acetic acid. *Journal of Food Protection*. 62: 1466–1469.
- Mead PS dan Griffin PM. 1998. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*. 352: 1207–1212.
- Nauta MJ, Evers EG, Takumi K, Havelaar AH. 2001. Risk assessment of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 in steak tartare in the Netherlands. RIVM report 257851003., Bilthoven (The Netherlands): RIVM.
- NZFSA [New Zealand Food Safety Authority]. 2007. Risk profile: shiga toxin producing *Escherichia coli* in raw milk. New Zealand: Report.
- NZFSA [New Zealand Food Safety Authority]. 2014. Risk profile: shiga toxin producing *Escherichia coli* in meat. New Zealand: Report.
- Powell MR, Ebel E, Schlosser W, Walderhaug M dan Kause J. 2000. Dose response envelope for *E. coli* O157:H7. *Quantitative Microbiology*. 2: 141–163.
- Ritchie JM, Wagner PL, Acheson DWK dan Waldor MK. 2003. Comparison of Shiga toxin production by hemolytic-uremic syndrome-associated and bovine-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 1059–1066.
- Smith B A, Fasil A, Lammerding A M. 2013. A risk assessment model for *E. coli* O157:H7 in ground beef and beef cuts in Canada: Evaluating the effect of interventions. *Food Control* (29):364-381.
- Takumi K, de Jonge R dan Havelaar A. 2000. Modelling inactivation of *Escherichia coli* by low pH: application to passage through the stomach of young and elderly people. *Journal of Applied Microbiology*. 89(6): 935–943.

- Teagasc [Agriculture and Food Development Authority of Ireland]. 2006. *E. coli* O157:H7 in beef burgers produced in the Republic of Ireland: A quantitative microbial risk assessment. Dublin (Ireland): Ashtown Food Research Centre.
- Torres AG dan Payne SM. 1997. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology*. 23: 825–833.
- Wagner PL, Neely MN, Zhang X, Acheson DW, Waldor MK. dan Friedman DI. 2001. Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *Journal of Bacteriology*. 183: 2081–2085.
- WHO/FAO [World Health Organization/Food Agriculture Organization]. 2011. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in raw beef and bee products: approaches for the provision of scientific advice. Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Series.