

Original Research Paper

Uji Toksisitas *Escherichia coli* Asal Daging Terhadap Sel Vero

Widodo Suwito^{1*}, Andriani²¹Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Yogyakarta

Jl. Stadion Baru Maguwoharjo No. 22. Karang Sari, Wedomartani, Ngemplak, Sleman, Yogyakarta, Indonesia, 55584

²Balai Besar Penelitian Veteriner

Jl. R.E. Martadinata No.30 Kotak Pos 151, Bogor, Indonesia, 16124

Article history

Received: 18 September 2018

Revised: 29 Oktober 2018

Accepted: 1 Desember 2018

Published: 12 Desember 2018

*Corresponding Author:

Widodo Suwito,

Balai Pengkajian Teknologi

Pertanian Yogyakarta

Jl. Stadion Baru Maguwoharjo

No. 22. Karang Sari,

Wedomartani, Ngemplak,

Sleman, Yogyakarta,

Indonesia, 55584

Email:

widodo.suwito@yahoo.com

Abstract: Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) is responsible for serious human illnesses. Source of VTEC is cattle faeces which beef contamination. The aims of this study was to determine the ability of *E. coli* which beef contamination from traditional market to damage the vero cells monolayer. A total of 35 *E. coli* isolates and vero cells monolayer were used in these study. All isolates *E. coli* were re-identified with biochemistry and vero cells monolayer were used to determination verotoxigenicity tests. None of *E. coli* isolates showed damage the vero cells monolayer, so there are not verotoxigenic *E. coli*. The study showed that all isolate *E. coli* which beef contamination from traditional market none damage the vero cells, so there are not verotoxigenic.

Key words: *E.coli*, beef, vero cell

Abstrak: *Escherichia coli* verotoksigenik (VTEC) menyebabkan penyakit pada manusia. Sumber VTEC adalah feses sapi yang dapat mengkontaminasi daging. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui kemampuan *E. coli* yang diisolasi dari daging sapi di pasar tradisional dalam merusak sel vero monolayer. Sebanyak 35 isolat *E. coli* dan sel vero monolayer digunakan dalam penelitian ini. Isolat *E. coli* diidentifikasi ulang secara biokimia dan untuk menentukan sifat verotoksigenitasnya menggunakan sel vero monolayer. Semua isolat *E. coli* tidak bersifat verotoksigenik karena tidak mampu merusak sel vero. Penelitian ini menunjukkan bahwa *E. coli* yang mengkontaminasi daging sapi dari pasar tradisional tidak bersifat verotoksigenik.

Kata kunci: *E.coli*, daging, sel vero.

Pendahuluan

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang pendek, bersifat anerob fakultatif, tidak berspora, dan banyak terdapat di lingkungan sekitar kita (Gomes *et al.*, 2011). Sebagian besar *E. coli* berada dalam saluran pencernaan hewan dan manusia sebagai flora normal, tetapi ada yang bersifat patogen yang dapat menyebabkan diare pada manusia. Berdasarkan mekanisme infeksi *E. coli* dalam menimbulkan penyakit, maka Nataro *et al.*, (2004) membagi menjadi 5 kelompok yaitu: *Enteropathogenic E. coli* (EPEC), *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC), *Enterohemorrhagic E. coli* (EHEC), *Enteroadhesive*

E. coli (EaggEC) dan *Enteroinvasive E. coli* (EIEC). *Escherichia coli* memiliki beberapa antigen yang berperan dalam patogenesis seperti antigen somatik, flagella, kapsular, fimbriae, enterotoksin, dan verotoksin.

Escherichia coli verotoksigenik (VTEC) merupakan salah satu strain yang mampu merusak sel Vero (*African Green Monkey Kidney*) karena menghasilkan verotoksin (Konowalchuk *et al.*, 1977). Verotoksin merupakan toksin yang dihasilkan oleh *E. coli* yang bersifat *heat labile* dan in aktif pada suhu 72^oC selama 16,2 detik atau 70^oC selama 2 menit. Mekanisme kerja verotoksin yaitu menghambat sintesis protein dengan in aktifasi 60s ribosom sub unit 28S RNA (Nataro *et al.*, 2004). Sementara itu, Karmali *et al.*, (2010) menyatakan bahwa dampak infeksi VTEC pada

manusia antara lain *hemorrhagic colitis* (HC), *hemolytic uremic syndrome* (HUS) dan *thrombocytopenia purpura* (TPP). *Hemorrhagic colitis* (HC) merupakan diare berdarah yang disertai dengan kejang perut, HUS ditandai dengan kegagalan ginjal secara akut, trombositopenia, dan anemia hemolitik, sedangkan TPP memiliki gejala mirip pada HUS namun gejala syaraf dan demam lebih menonjol pada TPP.

Ternak sapi merupakan pembawa VTEC yang keluar bersama feses secara intermiten. Pengeluaran VTEC secara intermiten menyebabkan kejadian di lapang sangat sedikit. Walaupun kejadiannya sangat sedikit, keberadaan VTEC patut diperhatikan mengingat dampak yang ditimbulkan pada manusia. Suwito (2009) melaporkan kejadian VTEC pada susu sapi di Kabupaten Bogor 0,94%, Sukabumi 2,20%, sedangkan di Cianjur tidak ditemukan. Sementara itu, *E. coli* yang diisolasi dari daging sapi yang dijual di pasar tradisional di kota Bogor belum diketahui sifat toksisitasnya terhadap sel Vero. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui toksisitas isolat *E. coli* dari daging sapi yang di jual di beberapa pasar tradisional di wilayah kota Bogor.

Bahan dan Metode

Bakteri acuan dan sampel penelitian

Bakteri acuan sebagai kontrol positif digunakan *E. coli* O157:K88 (BCC.B 2431), sedangkan *E. coli* K12K99- (*Institute of Medical and Veterinary Science Adelaide, Australia*) sebagai kontrol negatif. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah koleksi isolat *E. coli* yang diisolasi dari daging sapi yang dijual di beberapa pasar tradisional di wilayah kota Bogor.

Konfirmasi *E. Coli*

Sebanyak 35 isolat *E. coli* ditanam dalam 15 ml *brain heart infusion broth* (BHI) (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Subkultur pada *MacConkey agar* (MCA) (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tampak pink diambil sebanyak 5 koloni untuk dilakukan pengecatan Gram dan diidentifikasi lanjut kearah *E. coli* (Barrow dan Feltham, 1993).

Supernatan *E. coli*

Isolat *E. coli* terpilih ditanam dalam 10 ml BHI (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam sambil dikocok dengan kecepatan 100 rpm per menit. Selanjutnya kultur tersebut dimasukkan dalam tabung

sentrifuse polyethylene (Nalgene), kemudian disentrifus (Beckman) dengan kecepatan 8000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Sebanyak 2-4 ml supernatan dipisahkan dan difilter dengan ukuran 0,45 µm (PolyLabo, Molsheim, France). Selanjutnya supernatan tersebut disimpan pada suhu -20°C sampai saatnya diuji pada sel Vero satu lapis (*monolayer*).

Kultur Jaringan Sel Vero *Monolayer*.

Sel Vero yang secara rutin dipelihara di bagian kultur jaringan Virologi Balai Penelitian Veteriner Bogor digunakan dalam penelitian ini. Sel Vero yang sudah konfluen sebelumnya dicuci 3 kali menggunakan PBS *deionized* atau yang tidak mengandung ion Ca²⁺ dan Mg²⁺. Selanjutnya dilakukan trypsinasi dengan menambahkan *antibiotic trypsin versene* (ATV) sebanyak 1,5 ml atau 0,5 ml, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 5 menit dan diamati dibawah mikroskop *inverted*. Kemudian ditambahkan *Dulbecco Minimal Essential Medium* (DMEM) (Sigma-aldrich, Milano, Italy) yang mengandung *Fetal Bovine Serum* 5% (JRH Biosciences 12103 ACSL Company) dan 50 µg/ml Gentamicin (Gibco 15710-064). Selanjutnya dengan menggunakan mikropipet multichanel kita masukan sebanyak 100 µl per *well* dalam mikrotiter *plate* 96 dasar rata (Nunch, Roshilde, Denmark) dan diinkubasikan pada suhu 37°C, 5% CO₂ selama 24 jam. Setelah inkubasi diamati dengan mikroskop *inverted*, apabila per sel Vero sudah tampak konfluen *monolayer* maka siap digunakan untuk menguji cairan supernatan dari kultur cair isolat *E. coli*.

Uji Supernatan *E. coli* dalam Sel Vero *Monolayer*.

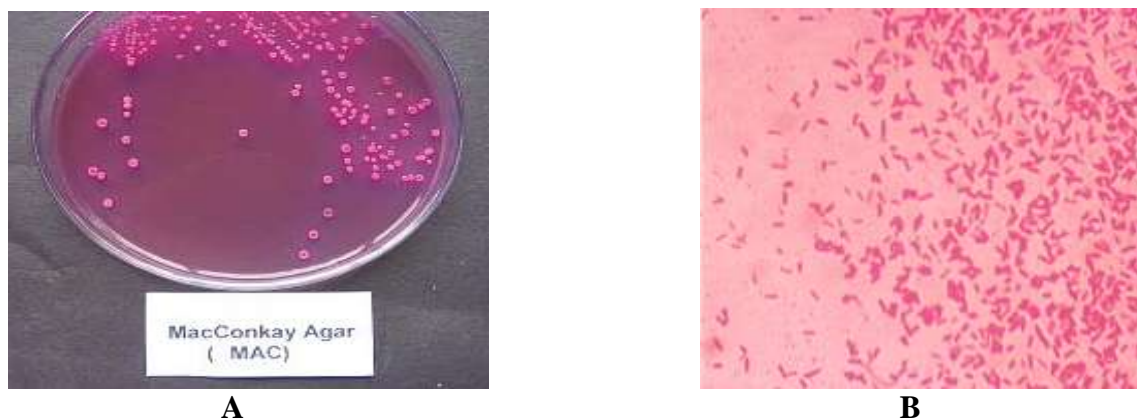
Uji sitotoksitas dari supernatan *E. coli* menggunakan metode (Pradel *et al.*, 2000). Supernatan yang sudah disiapkan diencerkan dalam 96 *well* mikrotiter *plate* dasar rata yang berisi DMEM (Sigma-aldrich, Milano, Italy) 100 µl dan diencerkan secara serial. Sebanyak 50 µl tiap-tiap enceran supernatan *E. coli* ditambahkan ke dalam sel Vero satu lapis *monolayer* dalam 96 *well* mikrotiter *plate*. Inkubasi pada 37°C, 5%CO₂ selama 48 jam dan sel dicuci dengan *deionized* PBS. Titer toksin ditentukan berdasarkan hasil pengamatan pada enceran tertinggi supernatan yang diujikan yang menimbulkan perubahan morfologi pada sel Vero.

Hasil dan Pembahasan

Sebelum diuji coba sifat toksisitasnya terhadap sel vero, maka dari 35 isolat *E. coli* di kultur dalam media MCA dan tampak koloninya berwarna pink (**Gambar 1**). Warna pink tersebut menunjukkan bahwa

isolat tersebut mampu memfermentasi laktosa dalam waktu 24 jam, dan bakteri tersebut adalah *E. coli*. Salah satu sifat dari *E. coli* yaitu mampu memfermentasi laktosa dalam waktu 24 jam (Barrow dan Feltham, 1993). Sebagian besar dari *E.coli* berada dalam saluran pencernaan hewan dan manusia merupakan flora normal, namun ada yang bersifat patogen yang dapat menyebabkan diare pada manusia dan hewan.

Pengecatan Gram dari koloni yang berwarna pink pada media MCA tersebut tampak berbentuk batang pendek dan termasuk bakteri Gram negatif (**Gambar 1**). *E.coli* termasuk dalam Famili: *Enterobacteriaceae*, Genus: *Escherichia*, bersifat aerob, berbentuk batang, biasanya mempunyai flagella untuk alat gerak dan termasuk kelompok



Gambar 1. A. Isolat *E. coli* dalam media MAC umur 24 jam setelah
 B. *E. coli* umur 24 jam Setelah Pengecatan Gram (Perbesaran 10 x 10)

E. coli verotoksigenik (VTEC) merupakan strain yang bersifat patogenik berasal dari feses sapi. *E.coli* O157:H7 bersifat verotoksigenik yang merupakan salah satu penyebab keracunan pangan asal ternak. Salah satu untuk mengetahui *E. coli* bersifat verotoksigenik

yaitu dengan mengujikan supernatan isolat *E. coli* menggunakan sel Vero. Supernatan dari ke-35 isolat *E. coli* setelah diuji toksisitasnya terhadap sel Vero disajikan dalam (**Tabel 1**)

Tabel 1. Reaksi Sel Vero Terhadap Supernatan *E. coli* setelah 48 jam

Asal isolat	Enceran supernatan menyebabkan perubahan morfologi										
	-	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
Pasar Bogor	3	2	1	-	-	-	-	-	-	-	
Pasar Anyar	25	2	1	-	-	-	-	-	-	-	
Pasar Jambu Dua	7	7	-	-	-	-	-	-	-	-	
Jumlah	35	3	2	-	-	-	-	-	-	-	

Sel Vero yang dirusak oleh supernatan isolat *E. coli* tanpa diencerkan sebanyak 33 isolat, dan diencerkan 1:2 sebanyak 2 isolat (**Tabel 1**). Hasil tersebut menunjukkan bahwa sebagian besar supernatan isolat *E. coli* hanya mampu merusak sel Vero tanpa diencerkan. Pada penelitian ini tidak dilakukan penghitungan secara kuantitatif kadar verotoksin yang terdapat dalam supernatan yang diujikan pada sel Vero, tetapi berdasarkan sitopatik atau perubahan pada sel Vero yaitu tampak keriput, dan mengecil jika dibandingkan dengan sel Vero yang tidak diberi supernatan. Sementara itu, untuk menentukan sifat verotoksigenik dari isolat *E. coli*

selain mampu merusak sel Vero juga ditentukan tingkat pengenceran dari supernatan *E. coli* yang masih mampu merusak sel Vero. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan dari Pradel *et al.*, (2000) bahwa *E. coli* bersifat verotoksigenik apabila mampu merusak sel Vero pada pengenceran >1:64. Supernatan *E. coli* yang hanya mampu merusak sel Vero tanpa diencerkan atau pada pengenceran <1:2, maka tidak termasuk dalam kelompok *E. coli* verotoksigenik. Oleh karena supernatan dari ke-35 isolat *E. coli* tersebut hanya mampu merusak sel Vero pada pengenceran <1:2, maka semua isolat *E. coli* tersebut tidak termasuk verotoksigenik. Sementara itu

penelitian Suwito (2009) menunjukkan bahwa kejadian *E. coli* verotoksigenik dalam susu sangat kecil. Hal tersebut disebabkan oleh kecilnya prevalensi *E. coli* verotoksigenik yang dikeluarkan melalui feses sapi. Bakteri *E. coli* verotoksigenik dikeluarkan dari saluran pencernaan sedikit sekali bila dibandingkan dengan *E. coli* yang lain sehingga prevalensi dalam produk ternak sangat sedikit (Wasteson, 2001). Heuvelink *et al.*, (1998) menyatakan kejadian VTEC O157:H7 pada susu kurang dari 0,3% dengan prevalensinya 0-10%. Prevalensi VTEC pada ternak di kabupaten Sleman Yogyakarta sebanyak 35% (Hanif *et al.*, 2003). Di luar negeri

dilaporkan bahwa prevalensi VTEC pada susu sebanyak 10%, keju 1,5%, daging sapi 3,7%, babi 1,5%, unggas 1,5%, kambing 2%, domba 2,5% (Pradel *et al.*, 2000; Doyle dan Schoeni, 1987). Prevalensi pada manusia di Amerika Serikat dilaporkan sebanyak 5-10%, Spanyol 2,5%, dan Prancis 34% (Blanco *et al.*, 2004; Pradel *et al.*, 2000).

Perubahan morfologi pada sel Vero setelah diuji dengan supernatan *E. coli* akan berubah menjadi keriput, dan mengecil jika dibandingkan dengan sel Vero yang tidak diberi supernatan (**Gambar 2**).



A



B

Gambar 2. Reaksi sel Vero terhadap supernatan *E. coli*.

A. Sel Vero monolayer pada umur 24 jam sebelum diberi supernatan isolat *E. coli* (16x10).

B. Sel Vero monolayer pada umur 24 jam setelah diberi supernatan isolat *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 (16x10).

Sel Vero yang rusak oleh supernatan *E. coli*, maka isolat *E. coli* tersebut mampu menghasilkan verotoksin yang bersifat merusak sel vero sehingga disebut dengan verotoksigenik. Verotoksin merupakan faktor virulensi yang penting dalam patogenesis. Selain verotoksin, faktor virulensi lainnya antara lain hemolisin. Hemolisin merupakan faktor virulensi yang mampu menghemolisis sel darah merah. *E. coli* yang menghasilkan hemolisin atau bersifat hemolitik dapat juga bersifat verotoksigenik. Penelitian Kusmiyati dan Supar (1998) menunjukkan bahwa *E. coli* hemolitik penyebab diare pada anak sapi penderita diare berdarah dari Kabupaten Bogor, Sukabumi, dan Bandung bersifat verotoksigenik. Faktor virulensi yang penting dari *E. coli* dalam menimbulkan penyakit ada 2 macam yaitu intimin dan enterohemolisin. Intimin berperan dalam *attaching* dan *effacing* atau perlekatan pada mukosa usus, sedangkan enterohemolisin berperan dalam terjadinya lesi pada permukaan usus sehingga terjadi diare berdarah (Nataro *et al.*, 2004). Produksi enterohemolisin ada 2 macam yaitu α -hemolisin dan β -hemolisin. α -hemolisin diproduksi pada saat bakteri sedang tumbuh, sedangkan β -hemolisin dilepaskan bakteri pada saat fase degradasi dan kematian (Mainil, 1999).

Kesimpulan

Isolat *E. coli* dari daging sapi asal pasar tradisional di Kota Bogor tidak menghasilkan verotoksin atau tidak mampu merusak sel Vero sehingga tidak bersifat verotoksigenik yang kemungkinan menghasilkan faktor virulensi lainnya dalam menimbulkan penyakit.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada teknisi bagian Bakteriologi dan Virologi di Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor yang sudah banyak membantu selama penelitian berlangsung.

Daftar Pustaka

Barrow, G.I., & Feltham, R.K.A. (1983). Cowan and steel's manual for the identification of medical bacteria. Cambridge, Cambridge University Press., 145 pp.

- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Dahbi, G., & Coira, M.A. (2004). Serotypes, virulence gene, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *E.coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gen. *Journal of Clininical Microbiology*, 42 (2):645-651. DOI:10.1128/JCM.
- Doyle, M.P., & Schoeni, J.L. (1987). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Applied Environmental Microbiology*, 53(10):2394-2396.
- Gomes, T.A., Hernandes, R.T., Torres, A.G., Salvador, F.A., Guth, B.E.C., Vaz, T.M., Irino, K., Silva, R.M., & Vieira, M.A. (2011). Adhesin-encoding genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are more prevalent in atypical than in typical enteropathogenic *E. coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, (49):3334-3337. DOI: 10.1128/JCM.00779-11.
- Hanif, S.K.S., Sumiarto, B., & Budiharta, S. (2003). Prevalensi dan analisis faktor-faktor infeksi *E. coli* O157: H7 sapi perah rakyat di kabupaten sleman. *Jurnal Sain Veteriner*, 21(1): 50-54.
- Heuvelink, Bleumink, B., Biggelaar, F.L.A., Giffel, M.C., Beumer, R., & Boer, E. (1998). Occurrence and survival of verocytotoxin producing *E.coli* O157 in raw cow's milk in the Netherland. *Journal of Food Protection*, 61(12): 1597-1601.
- Konowalchuk, J., Speirs, J.I, & Starvic, S. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 18(3): 775-779.
- Kusmiyati & Supar. (1998). *E. coli* verotoksigenik dari anak sapi perah penderita diare. *Proceeding. Seminar hasil-hasil penelitian veteriner. Pusat penelitian peternakan. Bogor. Pebruari*. 103-108.
- Karmali, M.A., Gannon, V., & Sargeant, J.M. (2010). Review: Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, 140(3-4): 360-370. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.011>.
- Mainil, J. (1999). Shiga/Verocytotoxins and Shiga/Verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Veterinary Research*, 30(2-3): 235-257.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., & Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2 (7) : 123-140. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro> 818.
- Pradel, N., Livrelli, V., Champs, C., Palcoux, J.B., Reynaud, A., Scheutz, F., Sirot, J., Joly, B., & Forestier, C. (2000). Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *E. coli* isolated from cattle, food, and children during a one year prospective study in France. *Journal of Clinical Microbiology*, Maret 38(3):1023-1031. DOI: <https://jcm.asm.org/content/38/3/1023>
- Suwito, W. (2009). *Escherichia coli* Verotoksigenik (VTEC) yang diisolasi dari susu sapi. *Jurnal Ilmu Ternak & Veteriner*, 14(3):237-243.
- Wasteson, B.Y. (2001). Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Veterinaria Scandinavia*. 95:79-84. DOI: <https://doi.org/10.1186/1751-0147-43-S1-S79>