

## IDENTIFIKASI *Escherichia coli* O157:H7 PADA SUSU SAPI PERAH DAN LINGKUNGAN PETERNAKAN

### *Escherichia coli* O157:H7 in Milk of Cows and the Farm Environment

Joshua Liem Tiong Gie<sup>1</sup> dan Yatri Drastini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>2</sup>Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta  
E-mail: drastini@ugm.ac.id

#### ABSTRAK

Tujuan penelitian adalah mengidentifikasi *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 pada susu dan lingkungan peternakan sapi perah. Sampel berjumlah 77 yang terdiri atas 27 sampel susu dan 50 sampel lingkungan. Sampel susu berasal dari ambung sapi (14), *milk can* peternak (6), *milk can* tempat penampungan susu (4), dan *cooling unit* di koperasi (3). Sampel lingkungan berupa feses (14), air sumber dan air tandon (12), pakan (6), serta *swab* tangan sebelum dan sesudah pemberian minyak pelicin (17), dan tanah (1). Isolasi *E. coli* dari sampel menggunakan media pemerkaya kaldu *brilliant green lactose bile Broth* (BGLB), media selektif agar *eosin methylene blue* (EMB), dan agar *sorbitol MacConkey* (SMAC). Koloni bakteri yang tidak memfermentasi sorbitol pada SMAC (*colorless*) diidentifikasi dengan uji aglutinasi lateks O157 dan antisera H7. Identifikasi bakteri dari sampel susu menunjukkan 7,41% (2/27) sampel teridentifikasi *E. coli* O157. Susu tersebut berasal dari ambung sapi dan *milk can* peternak. Bakteri *E. coli* O157 yang teridentifikasi dari sampel lingkungan (sampel pakan) sebanyak 2% (1/50). Hasil uji aglutinasi antisera terhadap tiga sampel positif O157 menunjukkan bahwa ketiganya tidak memiliki antigen H7 dan disimpulkan bahwa tidak ada sampel susu dan lingkungan yang tercemar *E. coli* O157:H7.

Kata kunci: aglutinasi lateks O157, antisera H7, *E. coli* O157:H7, susu, lingkungan

#### ABSTRACT

*Escherichia coli* O157:H7 is a dangerous pathogen to human. The aim of the research was to identify *E. coli* O157:H7 in milk and the environment. There were 77 samples consisted of 27 milk and 50 environment samples being used in this study. Milk samples were consisted of 14 milk samples from cow udder, 6 milk samples from farmer milk can, 4 milk samples from temporary milk collecting place and 3 milk samples from cooling unit. Environment samples consisted of 14 feces, 12 water sources, 6 cattle feed, 17 milker's palm swab, and 1 soil. *Escherichia coli* O157:H7 from samples were isolated using Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB) as enrichment media; and Eosin Methylene Blue (EMB) agar and Sorbitol MacConkey (SMAC) agar as selective media. The colonies of non sorbitol fermenting bacteria (*colorless*) were identified with O157 latex agglutination test and H7 antisera agglutination test. The result showed that *E. coli* O157 could be identified from the milk and milk can 7,41% (2/27). Identification of bacteria from environment samples (feed) showed 2% (1/50) of samples identified as *E. coli* O157. None of 3 positive samples of *E. coli* O157 had H7 antigen, so the milk and environment did not contaminated by *E. coli* O157:H7.

Key words: O157 latex agglutination, H7 antisera, *E. coli* O157, milk, environment

#### PENDAHULUAN

*Escherichia coli* termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae*, genus *Escherichia*, bersifat aerob, berbentuk batang, biasanya mempunyai flagela untuk alat gerak, dan termasuk kelompok Gram negatif (Cowan, 1984). Sebagian besar dari *Escherichia coli* (*E. coli*) yang berada dalam saluran pencernaan hewan dan manusia merupakan flora normal, namun ada yang bersifat patogen sehingga dapat menyebabkan diare pada manusia dan hewan (Bettelheim, 2000). Berdasarkan patogenesis, *E. coli* dibagi menjadi 6 kelompok yaitu *enteropathogenic E. coli* (EPEC), *enterotoxigenic E. coli* (ETEC), *enterohemorrhagic E. coli* (EHEC), *enteroaggregative E. coli* (EAEC), *enteroinvasive E. coli* (EIEC), dan *diffusely adherent E. coli* (DAEC) (Nataro dan Kaper, 1998). Kelompok EHEC yang mampu menghasilkan *shiga-like toxin* atau *verotoxin* disebut *shiga toxin-producing E. coli* (STEC) atau *verocytotoxi genic E. coli* (VTEC). *Verocytotoxigenic E. coli* serotype O157:H7 bersifat patogen pada manusia dan menyebabkan *foodborne disease* (Paddock *et al.*, 2012). Baru-baru ini di Canada 11 orang dilaporkan sakit karena *E. coli*. Mereka sakit

setelah makan keju yang dibuat dari susu mentah. Satu orang diantaranya meninggal dunia pada akhir Agustus 2013, walau *British Columbia Centre for Disease Control* belum menyimpulkan bahwa orang tersebut meninggal karena makan keju (Meiszner dan Talmazan, 2013).

Sapi merupakan reservoir utama bagi VTEC O157:H7 dan feses sapi merupakan sumber infeksi pada manusia (Armstrong *et al.*, 1996). *Verocytotoxi genic E. coli* O157:H7 yang berasal dari feses sapi dapat mencemari susu, sehingga susu menjadi tidak aman untuk dikonsumsi (Suwito, 2009). Berdasarkan penelitian Drastini *et al.* (2002) diketahui tingkat cemaran VTEC pada feses sapi perah di Yogyakarta sebanyak 44% dan diantaranya adalah VTEC O157:H7 (1,5%). Cemaran VTEC O157:H7 dalam susu dan lingkungan merupakan sumber infeksi yang berbahaya.

Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mengidentifikasi *E. coli* O157:H7 dalam susu (susu langsung dari ambung, *milk can* peternak, *milk can* tempat penampungan /TPS, dan *cooling unit*/CU di koperasi); dan lingkungan (feses, tanah, air, pakan, dan tangan pemerah) di beberapa peternakan sapi perah. Hasil penelitian diharapkan dapat bermanfaat bagi

keamanan konsumen dalam mengonsumsi susu dan produknya, dan meningkatkan kualitas susu peternak sehingga peternak dapat meningkatkan harga susu.

## MATERI DAN METODE

### Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan terdiri atas sampel susu dan sampel lingkungan. Sebanyak 27 sampel susu diambil dari ambing sapi (4), *milk can* peternak (6), *milk can* tempat penampungan susu (TPS)(4), dan *cooling unit* (CU)(3) pada koperasi. Sampel lingkungan yang berjumlah 50 sampel diambil masing-masing dari air (12), pakan (6), feses (14), tanah (1) dan *swab* tangan pemerah susu (17). Sampel susu, air, pakan, feses dan tanah ditampung pada kantong plastik steril. Sampel *swab* tangan diambil menggunakan kapas steril dan disimpan ke dalam tabung tertutup yang berisi natrium klorida (NaCl) fisiologis steril. Seluruh sampel berjumlah 77 sampel, dan langsung dibawa ke laboratorium dengan menggunakan kotak pendingin berisi es.

### Isolasi dan Identifikasi *E. coli* O157:H7

Isolasi *E. coli* dilakukan dengan cara sampel diinokulasi ke dalam kaldu pemer kaya *brilliant green lactose bile broth* (BGLB) dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Uji dinyatakan positif bila menunjukkan hasil media berubah menjadi keruh. Sampel yang tumbuh pada BGLB diinokulasi pada media selektif agar *eosin methylene blue* (EMB) dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. *Escherichia coli* akan membentuk koloni berwarna spesifik *metallic sheen* (hijau metalik) atau coklat tua pada media EMB. Koloni bakteri yang berwarna hijau metalik kemudian ditanam pada media selektif agar *sorbitol* MacConkey (SMAC) dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam.

Peneguhan *E. coli* serotipe O157 dilakukan dengan uji serologis menggunakan uji aglutinasi lateks O157 (Oxoid, Ltd) terhadap sampel yang *colorless* pada media SMAC. Sebanyak satu ose koloni diencerkan dalam satu tetes larutan NaCl fisiologis steril, kemudian direaksikan dengan 1 tetes reagen lateks. Hasil uji positif menunjukkan terjadinya presipitat. Peneguhan *E. coli* serotipe H7, dilakukan uji serologis menggunakan antiserum H7 (Denka Seiken, Jepang) terhadap sampel positif O157. Bakteri diinokulasi pada media semi solid yang berisi *Craigie's tube*. Bakteri yang dapat melewati *Craigie's tube* minimal 3 kali kemudian dibuat suspensi sel bakteri. Suspensi sel dibuat dengan cara menanam bakteri pada media cair dan diinkubasikan pada suhu 37° C selama 24 jam, kemudian ditambahkan NaCl fisiologis yang berisi 1% formalin dengan jumlah volume yang sama. Setelah itu suspensi sel diambil 0,5 ml, kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi dan diberi 3 tetes antiserum H7. Kemudian tabung direndam dalam penangas air pada suhu 50° C selama 1 jam. Hasil uji positif menunjukkan adanya masa seperti kapas pada tabung reaksi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penanaman 77 sampel pada media BGLB menunjukkan 100% (77/77) bakteri positif tumbuh (Tabel 1). Hasil inokulasi pada media EMB sebanyak 97,4% (75/77) dinyatakan positif *E. coli* (Tabel 1). Sebanyak 8% (6/75) sampel positif koloni *E. coli* pada penelitian ini memiliki koloni berwarna coklat tua. Menurut Leininger *et al.* (2001) koloni *E. coli* berwarna coklat disebabkan karena pH tidak cukup asam, sehingga warna hijau metalik tidak terbentuk. Keasaman yang rendah dapat disebabkan karena fermentasi laktosa oleh *E. coli* terhambat. Faktor yang memengaruhi fermentasi laktosa antara lain waktu dan suhu inkubasi (Leininger *et al.*, 2001).

Sebanyak 25,3% (19/75) *E. coli* pada media SMAC tidak memfermentasikan sorbitol (Tabel 1). *Escherichia coli* serotipe O157:H7 tidak memfermentasikan sorbitol dalam waktu 24 jam, berbeda dengan *E. coli* lainnya. Agar SMAC dalam mendeteksi *E. coli* O157:H7 memiliki 100% sensitivitas dan 85% spesifisitas (March dan Ratnam, 1986). *Escherichia coli* ini tumbuh dengan karakteristik koloni yang tidak berwarna (*colorless*).

Hasil pengujian antigen O157 didapatkan 15,7% (3/19) sampel positif (Tabel 1). Sampel yang positif O157 tersebut, masing-masing berasal dari susu ambing, susu *milk can* dan sampel pakan. Tiga sampel O157 tersebut menunjukkan hasil negatif H7 setelah diuji dengan antisera H7 (Tabel 1). Peneliti terdahulu mengungkapkan adanya strain O157 selain O157:H7. Strain tersebut antara lain O157:NM (*non-motil*) (Feng *et al.*, 1996; Sowers *et al.*, 1996), O157:H<sup>-</sup> (Friedrick *et al.*, 2002), O157:H45, O157:H39 (Sowers *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 2010), O157:16, dan O157:H12 (Sowers *et al.*, 1996; Nagano *et al.* 2004).

*Escherichia coli* O157:NM (*non-motil*), O157:H<sup>-</sup>, O157:H45, dan O157:H39 patogen pada manusia. Serotipe O157:NM didapatkan dari penderita diare/HC/HUS, memiliki *stx1* atau *stx2* (Feng *et al.*, 1996). Serotipe O157:H<sup>-</sup> menyebabkan diare, dan bersifat dapat atau tidak dapat memfermentasi sorbitol (Friedrick *et al.*, 2002). Namun, O157:H45 tidak memiliki *stx1* atau *stx2*, dan memfermentasi sorbitol (Feng *et al.*, 2010). Serotipe O157:H39 didapatkan dari penderita HC, tidak memiliki *stx1* atau *stx2*, ada yang tidak memfermentasi sorbitol (*colorless*) atau yang memfermentasi (Feng *et al.*, 2010). *Escherichia coli* O157:H16 dan O157:H12 tidak menunjukkan gejala klinis pada manusia, tidak memfermentasi sorbitol, dan tidak menyandi gen *vt* dan berbeda klaster dengan *E. coli* O157:H7 yang memiliki gen *vt* (Nagano *et al.*, 2004).

Hasil identifikasi sampel susu menunjukkan 7,41% (2/27) sampel susu terkontaminasi *E. coli* O157 (Tabel 2). Susu tersebut merupakan susu yang diperah langsung dari ambing dan susu dari *milkcan*. Hasil isolasi sampel lingkungan didapatkan 2% (1/50) sampel tercemar *E. coli* O157 (Tabel 2). Sampel yang tercemar adalah sampel pakan. Pada air, feses, tanah dan swab

**Tabel 1.** Hasil isolasi 77 sampel susu dan lingkungan

Sumber	Jumlah sampel	BGLB <sup>a</sup> (+)	EMB <sup>b</sup> (+)	SMAC <sup>c</sup> (+)	Lateks O157 <sup>d</sup> (+)	Antisera H7 <sup>e</sup> (+)
Susu dari ambing	14	14/14 (100%)	13/14 (92,9%)	6/13 (46,2%)	1/6 (16,7%)	0/1
Susu MC	6	6/6 (100%)	6/6 (100%)	1/6 (16,7%)	1/6 (100%)	0/1
	4	4/4 (100%)	4/4 (100%)	0/4	X	X
Susu CU	3	3/3 (100%)	3/3 (100%)	1/3 (33,3%)	0/3	X
Feses	14	14/14 (100%)	14/14 (100%)	4/14 (28,6%)	0/14	X
Tanah	1	1/1 (100%)	1/1 (100%)	0/1	X	X
Air	12	12/12 (100%)	11/12 (91,7%)	1/11 (9,1%)	0/1	X
Pakan	6	6/6 (100%)	6/6 (100%)	3/6 (50%)	1/3 (33,3 %)	0/1
Swab tangan	17	17/17 (100%)	17/17 (100%)	3/17 (17,6%)	0/3	X
Total	77	77	75	19	3	0

<sup>a</sup>(+)= Media keruh, <sup>b</sup>(+)= Koloni berwarna hijau metalik atau coklat tua, <sup>c</sup>(+)= Koloni tidak berwarna, <sup>d</sup>(+)= Terjadi aglutinasi, <sup>e</sup>(+)= Terdapat bentukan seperti kapas pada dasar tabung, (x)= Tidak dilakukan uji

**Tabel 2.** Hasil identifikasi *Escherichia coli* O157:H7 pada sampel susu dan lingkungan

Sumber	Jumlah sampel	BGLB	EMB	SMAC	Antigen O157	Antigen H7
Susu	27	27 (100%)	26 (96,3%)	8 (29,6%)	2 (7,41%)	0
Lingkungan	50	50 (100%)	49 (98%)	11 (22%)	1 (2%)	0
Total	77	77	75	19	3	0

tangan pemerah susu tidak ditentukan *E. coli* O157. Menurut Nurwantoro dan Mulyani (2003), pencemaran oleh bakteri *E. coli* dapat disebabkan karena penanganan susu yang kurang baik dan kurang aseptis, serta lingkungan dan sanitasi yang kurang memadai. Hal ini juga diutarakan oleh Suwito (2009), bahwa kondisi sanitasi pemerahan menentukan tingkat kontaminasi. Salah satu contohnya seperti kebersihan kandang dan kebersihan ternak sebelum diperah. Pakan yang tercemar dapat menularkan *E. coli* antar sapi yang menggunakan pakan yang sama. Penularan ini berakibat, makin besar risiko pencemaran *E. coli* pada susu. Cemar *E. coli* O157:H7 pada pakan ternak telah dilaporkan oleh berbagai peneliti. Srivastava *et al.* (1971) melaporkan *E. coli* O157:H7 yang mencemari pakan ternak unggas menyebabkan infeksi pada ayam pakan yang memakannya. Breuer *et al.* (2001) juga melaporkan cemaran *E. coli* pada Alfafa menyebabkan infeksi pada ternak yang memakannya. Kontaminasi pakan dapat terjadi saat pakan ditransportasikan ke peternakan, ataupun pada saat disimpan di peternakan. Kontaminasi pada peternakan kemungkinan berasal dari lingkungan yang tercemar oleh fezes sapi (Mead *et al.*, 1999).

### KESIMPULAN

Hasil penelitian didapatkan bahwa tidak ada sampel yang tercemar *E. coli* O157:H7. Namun pada sampel susu (susu langsung dari ambing dan susu dari *milk can*) dan pakan terdapat *E. coli* O157. Beberapa *E. coli* O157 bersifat patogen pada manusia, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjut untuk mendeteksi tipe H dari ketiga *E. coli* O157 tersebut.

### DAFTAR PUSTAKA

- Armstrong, G. L., J. Hollingsworth, and J.G. Morris. 1996. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. **Epidemiol. Rev.** 18:29-51.
- Bettelheim, K.A. 2000. Role of non O157 VTEC. **J. Appl. Symp. Microbiol. Suppl.** 88:38-50.
- Breuer T., D.H. Benkel, R.L. Shapiro, W.N. Hall, M.M. Winnett, M.J. Linn, J. Neimann, T.J. Barrett, S. Dietrich, F.P. Downes, D.M. Toney, J.L. Pearson, H. Rolka, L. Slutsker, and P.M. Griffin. 2001. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. **Emerg. Infect. Dis.** 7:977-982.
- Cowan, S.T. 1984. **Manual for the Identification of Medical Bacteria.** 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge University Press, USA.
- Drastini, Y., S. Budiharta, dan W. Asmara. 2002. Isolation of VT1 and/or VT2 gene-bearing *Escherichia coli* from cattle, swine, and sheep and goat. **J. Sain. Vet.** 20:28-35.
- Feng, P., P.I. Fields, B. Swaminathan, and T.S. Whittam. 1996. Characterization of nonmotile variants of *Escherichia coli* O157 and other serotypes by using an anti-flagellin monoclonal antibody. **J. Clin. Microbiol.** 34/11:2856-2859.
- Feng, P.C.H., C. Keys, D. Lacher, S.R. Monday, D. Shelton, C. Rozand, M. Rivas, and T. Whittam. 2010. Prevalence, characterization and clonal analysis of *Escherichia coli* O157: non-H7 serotypes that carry *eae* alleles. **FEMS Microbiol. Letters** 308/1:62-67.
- Friedrick, A.W., M. Bielaszewska, W. Zhang, M. Pulz, T. Kuczius, A. Ammon, and H. Karch. 2002. *Escherichia coli* harboring shiga toxin 2 gene variants: Frequency and association with clinical symptoms. **J. Infect. Dis.** 185(1):74-84.
- Leininger, D.J., J.R. Roberson, and F. Elvinger. 2001. Use of eosin methylene blue agar to differentiate *Escherichia coli* from other gram-negative mastitis pathogens. **J. Vet. Diagn. Invest.** 13:273-275.
- March, S.B. and S. Ratnam. 1986. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis. **J. Clin. Microbiol.** 23(5):869-872.
- Mead, P.S., L. Slutsker, V. Dietz, L.F. McCaig, J.S. Bresee, C. Shapir, P.M. Griffin, and R.V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.** 5:607-625.

- Meiszner, P. and Y. Talmazan. 2013. Update: *E. coli* warning issued over Gouda cheese from Salmon Arm, Health Canada investigates 11 cases. <http://globalnews.ca/news/846756/e-coli-warning-issued-over-gouda-cheese-from-salmon-arm/>.
- Nagano, H., T. Hirochi, K. Fujita, Y.W. Mori, K. Takeshi, and S. Yano. 2004. Phenotypic and genotypic characterization of D-glucuronidase-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from deer. **J. Med. Microbiol.** 53:1037-1043.
- Nataro, J.P. and J.B. Kaper. 1998. Diarrhegenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 1: 15-38.
- Nurwantoro dan S. Mulyani. 2003. **Dasar Teknologi Ternak**. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Paddock, Z., X. Shi, J. Bai, and T.G. Nagaraja. 2012. Applicability of a multiplex PCR to detect O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 serogroups of *Escherichia coli* in cattle feces. **J. Vet. Microbiol.** 156 (3-4): 381-388.
- Sowers, E.G., J.G. Wells, and N.A. Strockbinee. 1996. Evaluation of commercial latex reagents for identification of O157 and H7 antigens of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** 34(5):1286-1289.
- Srivastava, S.K., V.B. Singh, and N.P. Singh. 1971. Antigenic characters of *Salmonella* spp and *Escherichia coli* isolated from poultry feed and pen water. **Indian J. Microbiol.** 11:105-106.
- Suwito, W. 2009. *Escherichia coli* verotok sigenik (VTEC) yang diisolasi dari susu sapi. **JITV.** 14(3):237-242.