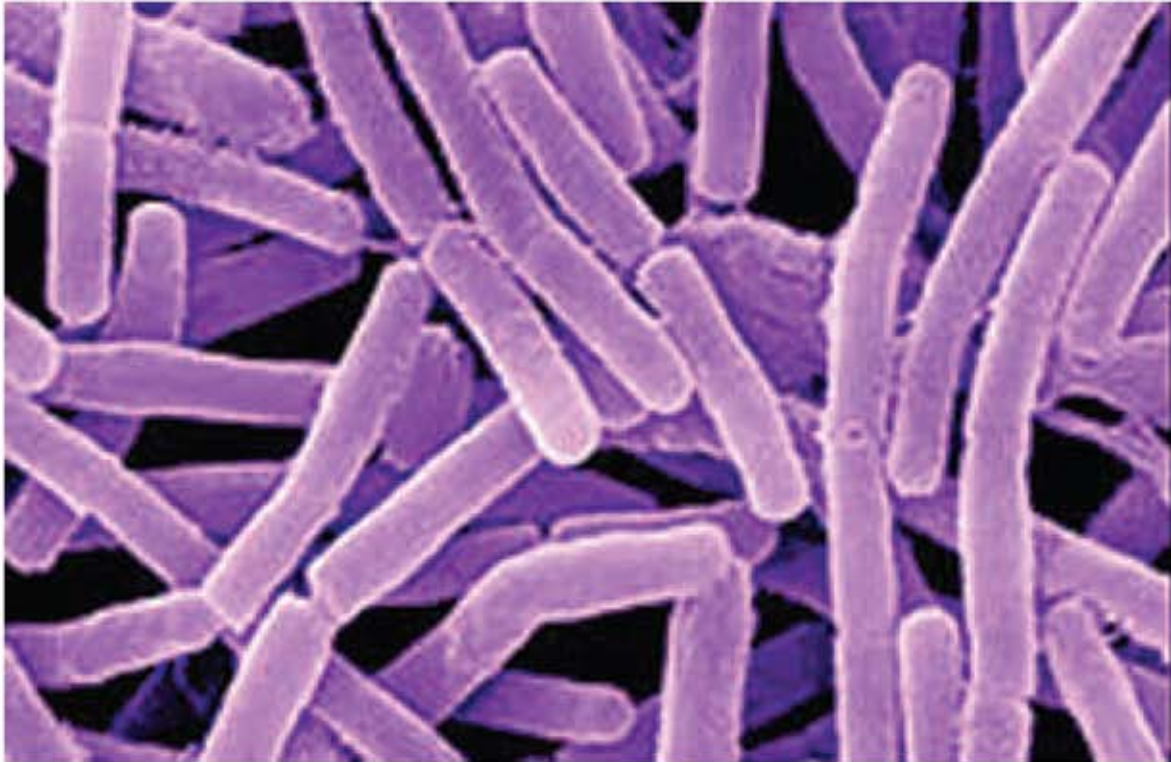


Vol. 18 No. 1, Maret 2017

- Cacing Parasit pada Harimau Kebun Binatang ●
- Gambaran Histopatologi Kucing Toksoplasmosis ●
- Seroprevalensi Sistiserkosis Babi di Papua ●
- Profil Ig-G Serum Kambing Peranakan Etawah ●
- Gambaran Darah Kucing Selama *Auto-Skin Graft* ●
- Profil Hematologi Domba Garut Pemakan Tauge ●
- Gambaran Biokimia Darah Ayam Pemakan Ragi Tempe ●
- Maturasi dan Fertilisasi Oosit Domba Prapubertas ●
- Eksresi VEGF dan MAP Kinase Plasenta Tikus Terpapar *Carbon Black* ●
- Semen Beku Babi dalam Pengencer yang Dilimahi Trehalosa ●
- Sekuensing 16s DNA Bakteri Selulolitik Rumen Sapi Peranakan Ongole ●
- Sekuen Gen *Stx-2 E. coli* O157:H7 Sapi Bali dan Manusia ●
- Strategi Pengelolaan Jasa RPH Ruminansia Secara Berkesinambungan ●
- Standar Sanitasi dan Higiene RPH Katagori II ●
- Kandungan Bahan Neuroprotektif pada *Koro Benguk* ●
- Daun Binahong Sebagai Insektisida Alternatif pada Miasis ●
- Buah Merah Menekan Ekspresi Caspase-6 dan Jumlah Sel Hofbauer ●
- Daun Singkong Berguna Sebagai Antioksidan pada Burung Puyuh ●
- Polimorfisma Protein Plasma pada Kelinci ●
- Memperbaiki Performans Induk dan Bobot Lahir Pedet Sapi Bali ●
- Produktivitas Ayam Pedaging Jantan di Daerah Dataran Tinggi ●



animalhealthmedia.com

Awal tahun 2017 tepatnya pertengahan Januari Anthrax membuat kejutan dengan meletup di Kulonprogo, Yogyakarta. Ternak sapi dan masyarakat dilaporkan menjadi korban letupan Anthrax tersebut.

PEMIMPIN UMUM : I WAYAN BATAN **DEWAN REDAKSI** : NYOMAN MANTIK ASTAWA (KETUA), IDA BAGUS ARKA, NYOMAN SADRA DHARMAWAN, IWAN H. UTAMA, I GUSTI NGURAH KADE MAHARDIKA, I KETUT PUJA, I KETUT SUATHA, TJOK GDE OKA PEMAYUN, ROOSTITA L. BALIA, I KETUT BERATA, **REDAKTUR PELAKSANA** : I NYOMAN SUARTHA & I G M KRISNA ERAWAN, **SEKRETARIS REDAKSI** : I NYOMAN SUARSANA, **STAF REDAKSI** : I WAYAN SUARDANA, I GUSTI NGURAH SUDISMA, AIDA LOUISE TENDEN ROMPIS, NI GUSTI AGUNG AYU SUARTINI, I MADE SUKADA, ANAK AGUNG SAGUNG KENDRAN, ANAK AGUNG AYU MIRAH ADI, I MADE KARDENA, YANA QOMARIANA. **TATA USAHA** : PUDJI RAHARDJO, WERDI SUSARI. **KANTOR REDAKSI & ALAMAT SURAT** : KLINIK HEWAN FKH UNUD, Jl. Raya Sesetan Gg. Markisa 6 Banjar Gaduh, Denpasar - Bali. **PENERBIT** : FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN, UNIVERSITAS UDAYANA BEKERJA SAMA DENGAN PERHIMPUNAN DOKTER HEWAN INDONESIA. **REKENING** : NOMOR 0118628705 A/N drh. I NYOMAN SUARTHA, M.Si BNI CABANG DENPASAR **DICETAK OLEH**: PERCETAKAN PELAWA SARI, JL. ANTOSURA 33 DENPASAR

Setiap naskah yang dikirim ke redaksi untuk dipublikasikan dalam Jurnal Veteriner dipandang sebagai karya asli penulis dan bila diterima, naskah tersebut tidak diperkenankan dipublikasikan lagi secara keseluruhan ataupun sebagian tanpa seijin Jurnal Veteriner.

DAFTAR ISI

Vol 18, No 1 Maret 2017
Terakreditasi Dirjen Penguatan
Riset dan Pengembangan,
Kemenristek Dikti RI
S.K. No. 36a/E/KPT/2016

Jurnal Veteriner

Jurnal Kedokteran Hewan Indonesia
Indonesian Veterinary Journal

pISSN: 1411-8327; eISSN: 2477-5665
Website : ojs.unud.ac.id
Terbit sejak 18 Desember 2000

Naskah Asli Original Article

- RISA TIURIA, UNITA PRATIWI, LIGAYA ITA TUMBELAKA**
Parasitic Worm in Tiger (*Panthera tigris*) at Serulingmas Zoological Garden
Banjarnegara, Bandung Zoological Garden, and Indonesia Safari Park Bogor
(CACING PARASIT PADA HARIMAU (*Panthera tigris*) KEBUN BINATANG SERULING MAS
BANJAR NEGARA, KEBUN BINATANG BANDUNG, DAN TAMAN SAFARI BOGOR) 1-10
- MUHAMMAD HANAFIAH, WISNU NURCAHYO, JOKO PRASTOWO, SRI HARTATI**
Gambaran Histopatologi Toksoplasmosis pada Kucing Peliharaan
(*STUDY HISTOPATHOLOGIC OF TOXOPLASMOSIS IN DOMESTIC CAT*) 11-17
- IDA BAGUS NGURAH SWACITA, I KETUT SUADA, KETUT BUDIASA,
NYOMAN SADRA DHARMAWAN, NYOMAN MANTIK ASTAWA, IDA AYU PASTI APSARI,
I NYOMAN POLOS, I MADE DAMRIYASA**
Seroprevalensi Sistiserkosis pada Babi di Papua
(*SEROPREVALENCE OF PIG CYSTICERCOSIS IN PAPUA REGION*) 18-23
- SUS DERTHI WIDHYARI, ANITA ESFANDIARI, I KETUT SUTAMA,
SETYO WIDODO, I WAYAN TEGUH WIBAWAN, RIZAL RAHADIAN RAMDHANY**
Profil Immunoglobulin-G Serum Kambing Peranakan Etawah Bunting yang Diberi Imbuan
Pakan Mineral Seng
(*SERUM IMMUNOGLOBULIN-G LEVEL ON PREGNANT ETTAWAH
CROSSBRED WERE GIVEN ZINC MINERAL*) 24-30
- ERWIN, GUNANTI, EKOWATI HANDHARYANI, DENI NOVIANA**
Blood Profile of Domestic Cat (*Felix catus*) During Skin Graft Recovery with Different Period
(*PROFIL DARAH KUCING LOKAL SELAMA KESEMBUHAN AUTO-SKIN GRAFT
DENGAN WAKTU YANG BERBEDA*) 31-37
- SRI RAHAYU, MOHAMAD YAMIN, CECE SUMANTRI, DEWI APRI ASTUTI**
Profil Hematologi dan Status Metabolit Darah Domba Garut yang Diberi Pakan
Limbah Tauge pada Pagi atau Sore Hari
(*BLOOD HAEMATOLOGICAL PROFILE AND METABOLITE STATUS OF GARUT LAMB
FED DIETS MUNG BEAN SPROUT WASTE IN THE MORNING OR EVENING*) 38-45
- ISROLI, TURRINI YUDIARTI, SUGIHARTO**
Gambaran Biokimia dan Leukosit Darah Ayam Kampung Umur 25 Hari
yang Diberi Fungi *Rhizopus oryzae*
(*BIOCHEMISTRY AND BLOOD LEUKOCYTES DESCRIPTION 25 DAYS AGE
OF CHICKEN KAMPONG GIVEN FUNGI RHIZOPUS ORYZAE*) 46-50
- ANITA HAFID, NI WAYAN KURNIANI KARJA, MOHAMAD AGUS SETIADI**
Kompetensi Maturasi dan Fertilisasi Oosit Domba Prapubertas Secara *In Vitro*
(*DEVELOPMENTAL COMPETENCE OF MATURATION AND FERTILIZATION
PREPUBERTAL SHEEP OOCYTES IN VITRO*) 51-58
- VISKI FITRI HENDRAWAN, WIDJIATI, SUHERNI SUSILOWATI, PUDJI SRIANTO**
Peningkatan Ekspresi *Vascular Endothel Growth Factor* dan *Mitogen Activating
Protein Kinase* Plasenta Tikus yang Dipapar *Carbon Black*
(*INCREASING EXPRESSION ON VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND MITOGEN
ACTIVATING PROTEIN KINASE IN PLACENTA RATS EXPOSED CARBON BLACK*) 59-68
- TUTY LASWARDI YUSUF, RADEN IIS ARIFIANI, RENI RATNI DAPAWOLE,
WILMIENTJE MARLENE MESANG NALLEY**
Kualitas Semen Beku Babi dalam Pengencer Komersial yang Disuplementasi
dengan Trehalosa
(*THE QUALITY OF BOAR FROZEN SEMEN IN COMMERCIAL EXTENDER
SUPPLEMENTED WITH TREHALOSE*) 69-75
- WIDYA PARAMITA LOKAPIRNASARI, ADRIANA MONICA SAHIDU,
TRI NURHAJATI, KOESNOTO SUPRANIANONDO, ANDREAS BERNYULIANTO**
Sekuensing 16S DNA Bakteri Selulolitik Asal Limbah Cairan Rumen Sapi Peranakan Ongole
(*SEQUENCING OF 16S DNA OF CELLULOLYTIC BACTERIA FROM BOVINE RUMEN
FLUID WASTE ONGOLE CROSSBREED*) 76-82

DAFTAR ISI (Lanjutan)

Vol 18, No 1 Maret 2017
Terakreditasi Dirjen Penguatan
Riset dan Pengembangan,
Kemenristek Dikti RI
S.K. No. 36a/E/KPT/2016

Jurnal Veteriner
Jurnal Kedokteran Hewan Indonesia
Indonesian Veterinary Journal

pISSN: 1411-8327; eISSN: 2477-5665
Website : ojs.unud.ac.id
Terbit sejak 18 Desember 2000

I WAYAN SUARDANA, DYAH AYU WIDIASIH, KOMANG JANUARTHAN PUTRA PINATHI Sekuen Nukleotida Gene <i>Shiga like toxin-2</i> dari Isolat Lokal <i>Escherichia coli</i> O157:H7 asal Hewan dan Manusia (<i>NUCLEOTIDES SEQUENCES OF SHIGA-LIKE TOXIN 2 GENES OF ESCHERICHIA COLI O157:H7</i> <i>LOCAL ISOLATES ORIGINATED FROM ANIMALS AND HUMAN</i>).....	83-93
MAYA DEWI DYAH MAHARANI, SUMARDJO, ERIYATNO³, EKO SUGENG PRIBADI Strategi Pengelolaan Usaha Jasa Rumah Pematangan Hewan Ruminansia Secara Berkelanjutan (<i>MANAGEMENT STRATEGY FOR SUSTAINABLE RUMINANT-CATTLE</i> <i>SLAUGHTERHOUSE (RC-S)</i>).....	94-106
ZIKRI MAULINA GAZNUR, HENNY NURAINI, RUDY PRIYANTO Evaluasi Penerapan Standar Sanitasi dan Higien di Rumah Potong Hewan Kategori II (<i>EVALUATION OF SANITATION AND HYGIENE STANDARD IMPLEMENTATION</i> <i>AT CATEGORY II ABATTOIR</i>).....	107-115
TRI WAHYU PANGESTININGSIH, TRINI SUSMIATI, HERY WIJAYANTO Kandungan <i>L-3, 4-dihydroxyphenylalanine</i> Suatu Bahan Neuroprotektif pada Biji Koro Benguk (<i>Mucuna pruriens</i>) Segar, Rebus, dan Tempe (<i>L-3,4-DIHYDROXYPHENYLALANINE CONTENT AS A NEUROPROTECTIVE MATERIAL ON FRESH,</i> <i>COOKED AND FERMENTED OF KORO BENGUK (MUCUNA PRURIENS) BEANS</i>).....	116-120
IETJE WIENTARSIH, AULIA ANDI MUSTIKA, APRIL HARI WARDHANA, DODI DARMAKUSUMAH, LINA NOVIYANTI SUTARDI Daun Binahong (<i>Androdera cordifolia</i> Steenis) Sebagai Alternatif Insektisida Terhadap Miasis yang Disebabkan Lalat <i>Chrysomya bezziana</i> (<i>ANREDERA CORDIFOLIA STEENIS (BINAHONG) LEAF AS AN ALTERNATIVE INSECTICIDE</i> <i>AGAINST CHRYSOMYA BEZZIANA CAUSED MYIASIS</i>).....	121-127
IKA WAHYUNI¹, WIDJIATI, SRI PANTJA MADYAWATI, FEDIK ABDUL RANTAM Pemberian Buah Merah (<i>Pandanus conoideus</i> Lam) sebelum Dipapar Timah Hitam Menekan Ekspresi <i>Caspase-8</i> dan Jumlah Sel <i>Hofbauer</i> Mencit (<i>Mus musculus</i>) Bunting (<i>THE PROVISION OF RED FRUIT (Pandanus conoideus Lam) BEFORE EXPOSED</i> <i>BY LEAD DECREASE EXPRESSION OF CASPASE-8 AND THE NUMBER</i> <i>OF HOFBAUER CELLS IN PREGNANT MICE</i>).....	128-134
LA JUMADIN, ARYANI SISMIN SATYANINGTIJAS, KOEKOEH SANTOSO Ekstrak Daun Singkong Baik Sebagai Antioksidan pada Burung Puyuh Dewasa yang Mendapat Paparan Panas Singkat (<i>EXTRACT OF CASSAVA LEAVES IS A GOOD ANTIOXIDANT FOR MATURE QUAIL</i> <i>WHICH EXPOSED TO HEAT IN SHORT TIME</i>).....	135-143
RIRI SARFAN, SUTOPO, EDY KURNIANTO Polimorfisme Protein Plasma Darah pada Kelinci <i>Rex</i> , Lokal dan <i>New Zealand White</i> (<i>POLYMORPHISM OF BLOOD PLASMA PROTEIN OF REX, LOCAL</i> <i>AND NEW ZEALAND WHITE RABBIT</i>).....	144-153
NI NYOMAN SURYANI, I WAYAN SUARNA, NI PUTU SARINI³, I GEDE MAHARDIKA, MAGNA ANURAGA PUTRA DUARSA Pemberian Ransum Berenergi Tinggi Memperbaiki Performans Induk dan Menambah Bobot Lahir Pedet Sapi Bali (<i>PROVISION HIGHER LEVEL OF ENERGY RATION IMPROVE CATTLE</i> <i>PERFORMANCE AND CALVES BIRTH WEIGHT</i>).....	154-159
BAHRI SYAMSURYADI, RUDI AFNAN, IRMA ISNAFIA ARIEF, DAMIANA RITA EKASTUTI Ayam Pedaging Jantan yang Dipelihara di Dataran Tinggi Sulawesi Selatan Produktivitasnya Lebih Tinggi (<i>BROILER MALES REARED IN THE HIGHLAND OF SOUTH SULAWESI</i> <i>HAS A HIGHER PRODUCTIVITY</i>).....	160-166
PEDOMAN BAGI PENULIS	i-ii

Sekuen Nukleotida Gene *Shiga like toxin-2* dari Isolat Lokal *Escherichia coli* O157:H7 asal Hewan dan Manusia

(NUCLEOTIDES SEQUENCES OF SHIGA-LIKE TOXIN 2 GENES OF ESCHERICHIA COLI O157:H7 LOCAL ISOLATES ORIGINATED FROM ANIMALS AND HUMAN)

I Wayan Suardana¹, Dyah Ayu Widiasih²
Komang Januartha Putra Pinatih³

¹Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Udayana, Jln. Sudirman Denpasar, Bali Tlp.(0361) 22379;
E-mail: iwayansuardana22@yahoo.com

²Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna No 2, Karangmalang, Yogyakarta 55281
E-mail: dawidiasih@yahoo.com.

³Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana,
Jl. PB. Sudirman Denpasar, Bali, Indonesia
E-mail: kjanuartha@yahoo.com

ABSTRAK

Hewan ternak khususnya sapi, dikenal sebagai reservoir utama *Escherichia coli* O157:H7. Sebagai satu-satunya serotipe *E. coli* yang bersifat zoonosis, patogenitas bakteri ini ditentukan oleh kemampuannya untuk menghasilkan satu atau lebih *cytotoxin* yang sangat potensial yang dikenal dengan nama *Shiga-like toxin* (Stx) atau *verocytotoxin*, khususnya dari jenis Stx2 yang terkait erat dengan kejadian *hemolytic uremic syndrome* (HUS) pada manusia. Studi ini bertujuan menganalisis susunan nukleotida dari gen *stx2* antara isolat asal hewan dan manusia dalam upaya mengkaji potensi zoonosis yang ditimbulkannya. Kegiatan penelitian diawali dengan kultivasi 20 isolat *E. coli* O157:H7 koleksi hasil penelitian sebelumnya dengan rincian dua isolat asal tinja sapi, dua isolat asal daging sapi, dua isolat asal tinja ayam, dua isolat asal tinja manusia non-klinis dan 12 isolat asal tinja manusia klinis (asal penderita gagal ginjal). Isolat sebanyak 20 tersebut dikonfirmasi pada media selektif *sorbitol Mac Conkey agar* (SMAC) yang dilanjutkan dengan uji *latex O157 agglutination test* serta uji antiserum H7. Analisis molekuler komplit gen *stx2* yang meliputi *open reading frame* (ORF) dari gen *stx2* dilakukan menggunakan primer rancangan peneliti yaitu Stx2(F)/Stx2(R). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada dua isolat yaitu KL-48(2) asal tinja manusia dan SM-25(1) asal tina sapi positif membawa gene *stx2* yang ditandai dengan produk PCR 1587 bp. Analisis hasil sekuensing menunjukkan kedua isolat memiliki susunan gene *stx2* yang identik dengan *E. phaga* 933 dan *E. coli* ATCC 43894. Hasil ini mengindikasikan kedua isolat lokal berpotensi sebagai agen zoonosis dengan efek klinis yang serupa dengan *E. phaga* 933 dan *E. coli* ATCC 43894.

Kata-kata kunci: *E. coli* O157:H7; gen *stx2*; *hemolytic uremic syndrome*; zoonosis

ABSTRACT

Animals/livestock, especially cattle, are known as the main reservoir of *Escherichia coli* O157: H7. As the only one of zoonotic *E. coli*, the pathogenicity of these bacteria is determined by its ability to produce one or more very potent cytotoxin known as Shiga-like toxin (Stx) or verocytotoxin, particularly of the Stx2 type that is closely related to the incidence of hemolytic uremic syndrome (HUS) in humans. This study analyzed the nucleotide sequences of *stx2* gene between isolates from animals and humans in an effort to assess the potential zoonoses of the agent. The research activity was initiated by cultivating 20 isolates of *E. coli* O157:H7 collection based on result in the previous study i.e. 2 isolates originated from cattle feces, 2 isolates originated from beef, 2 isolates originated from chicken feces, 2 isolates originated from human faeces and 12 non-clinical isolates originated from human fecal who were suffering with renal failure. All isolates were confirmed on selective medium Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) followed by testing on agglutination O157 latex test, and H7 antisera. Molecular analysis of *stx2* gene covering open reading

frame (ORF) of the *stx2* gene was performed using the primer which was designed by researcher i.e. Stx2 (F) / Stx2 (R). The results showed, there were 2 isolates i.e. KL-48 (2) originated from human feces and SM-25 (1) originated from cattle feces were positive for carrying a *stx2* gene, which was marked by the 1587 bp PCR product. Analysis of sequencing showed both isolates had identical to *stx2* nucleotide sequences with *E. phaga* 933 as well as *E. coli* ATCC 933. These results indicate the both local isolates are potential as zoonotic agents with clinical effects similar to *E. phaga* 933 and *E. coli* ATCC 43894

Key words: *E. coli* O157:H7; gene *stx2*; hemolytic uremic syndrome; zoonoses

PENDAHULUAN

Sapi dikenal sebagai reservoir utama *Escherichia coli* O157:H7 meskipun beberapa jenis ternak lainnya seperti unggas, kambing, domba, dan babi, juga diketahui berpotensi sebagai penular agen zoonosis ke manusia (Naylor *et al.*, 2005; Karmali *et al.*, 2010). Terjadinya kontaminasi silang antara daging dengan feses dalam tahapan prosesing, penanganan sampai pemasaran dalam suatu mata rantai pengadaan bahan pangan, proses pemasakan yang tidak cukup, diduga memberikan sumbangan yang cukup besar terhadap munculnya kejadian *food borne infections* oleh *E. coli* O157:H7. Penularan melalui susu ataupun air yang terkontaminasi feses juga sering dilaporkan (Radu *et al.*, 2001). Patogenitas *E. coli* O157:H7 sebagai satu-satunya serotipe yang bersifat zoonosis, ditentukan oleh kemampuannya menghasilkan satu atau lebih *cytotoxin* yang sangat potensial yang dikenal dengan nama *Shiga-like toxin* (Stx) baik Stx1 maupun Stx2. Selain itu, kemampuan dari bakteri ini melakukan penempelan dan perlekatan terutama pada sekum dan kolon pada tubuh inang (Krauss *et al.*, 2003). Toksin Stx1 dan Stx2 yang dihasilkan oleh strain *E. coli* ini, diketahui memiliki efek dalam jenis dan derajat kerusakan jaringan yang berbeda pada tubuh inang. Toksin Stx1 lebih terabsorpsi oleh sel epitel usus yang berlanjut pada terjadinya diare berdarah, sedangkan toksin Stx2 yang bersirkulasi pada aliran darah selanjutnya menuju ke ginjal dan berikatan dengan reseptor *globo series globotriaosylceramide* (Gb3) yang berdampak pada terjadinya kerusakan endotel glomerulus ginjal sehingga terjadi *hemolytic uremic syndrome* (HUS) (Bahrun Dahler, 2002; Fraser *et al.*, 2004; Cadirci *et al.*, 2010). Mengacu pada potensi zoonosis agen *E. coli* O157:H7 yang cukup tinggi, serta mempertimbangkan tingginya kejadian gagal ginjal pada manusia akibat toksin *Stx-2 E. coli* O157:H7 sebagai salah satu kausanya, maka kajian analisis nukleotida komplit gene *Stx2*

dari isolat *E. coli* O157:H7 asal hewan dan manusia menjadi penting diungkap.

METODE PENELITIAN

Kultivasi Stok Isolat

Kultivasi terhadap 20 isolat stok (tersimpan dalam gliserol 30% dengan suhu penyimpanan -20°C) yang terdiri dari satu isolat kontrol positif *E. coli* ATCC 43894 serta dua isolat asal tinja sapi, dua isolat asal daging sapi, dua isolat asal tinja ayam, dua isolat asal tinja manusia non-klinis, dan 12 isolat asal tinja manusia klinis (asal penderita gagal ginjal). Keseluruhan isolat ditumbuhkan kembali pada media selektif *Sorbitol Mac Conkey Agar* (SMAC) (Oxoid CM 0813), yang dilanjutkan dengan uji konfirmasi menggunakan uji aglutinasi lateks *E. coli* O157 (Oxoid DR 620M).

Isolasi DNA Genomik Bakteri

Tahap isolasi DNA genomik bakteri mengacu pada prosedur pabrik. Isolat *E. coli* O157:H7 yang diinokulasi pada media *Luria Bertani/LB* dipanen dengan cara sentrifugasi (Beckman Microfuge 11) 7500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, sedangkan pelet sel ditambah 180 µL *tissue lysis buffer* (*Buffer ATL*) dan 20 µL larutan proteinase K (600 mAU/mL) selanjutnya divorteks (*Thermolyne Maximi*) selama 15 detik. Larutan kemudian ditambahkan 200 µL *lysis buffer* (*Buffer AL*), divorteks selama 15 detik, diinkubasikan pada *wáterbath* suhu 56°C selama 10 menit, ditambahkan 200 µL etanol absolut 96%, dan divorteks selama 15 detik. *Lysate E. coli* yang diperoleh digunakan untuk *binding* DNA. *Lysate* dimasukkan ke dalam penyaring yang terletak dalam tabung kecil 2 mL (*QIAamp Mini spin column*) dan dipusing dengan kecepatan 6000xg (8000 rpm) selama satu menit. Sisa cairan dibuang, dan filter yang telah mengandung DNA dimasukkan ke dalam tabung kecil 2 mL yang baru untuk selanjutnya dilakukan tahapan *washing* DNA. Filtrat DNA

ditambah 500 μL *wash buffer* (*buffer AW1*) dan didiamkan selama lima menit, dipusing dengan kecepatan 6000xg atau 8000 rpm selama satu menit. Sisa cairan tertampung dibuang dan diganti dengan tabung kecil 2 mL yang baru. *Wash buffer* (*buffer AW2*) sebanyak 500 μL ditambahkan dan didiamkan selama lima menit. Tabung kecil dipusing dengan kecepatan penuh 14.000 rpm selama tiga menit, sisa cairan yang tertampung dibuang dan dilanjutkan untuk *eluting* DNA. *QIAamp Mini spin column* yang mengandung DNA dimasukkan ke dalam tabung kecil (Nunc, Inc) steril baru, ditambahkan 50 μL *elution buffer* (*buffer AE*), didiamkan pada suhu kamar selama lima menit, dan dipusing dengan kecepatan 6000xg atau 8000 rpm selama satu menit untuk selanjutnya disimpan pada 4°C.

Amplifikasi Komplit Gen *stx2*

Analisis komplit gen *stx2* yang meliputi daerah *open reading frame* (ORF) gen *stx2* dengan prosedur PCR dilakukan pada total volume 27 μL yang mengandung 1,5 μL DNA templet (300 ng/ μl), 17 μL FastStart PCR Master, 6,5 μL *water PCR-grade* dan 1 μL masing-masing primer rancangan peneliti yaitu primer *Stx2*(F): 5'-GCCATTAGTCATCGGGATA-3' dan primer *Stx2*(R): 5'-CGAATGCTCAGTCTGACAGG-3' konsentrasi 20 pmol/ μL . Amplifikasi dilakukan pada mesin *MJ Mini Personal Thermalcycler Biorad model PTC-1148* dengan kondisi pre-denaturasi pada suhu 94°C selama tujuh menit, diikuti 35 siklus dengan kondisi denaturasi 94°C selama satu menit, *annealing* pada 60°C selama 35 detik, dan polimerisasi pada suhu 72°C selama 1,5 menit. Pada bagian akhir ditambahkan dengan polimerisasi pada suhu 72°C selama lima menit. Setelah reaksi selesai, sebanyak 4 μL produk PCR dicampur dengan 2 μL 5 x DNA *loading dye* (*blue/orange loading dye*) dan dielektroforesis pada gel agarose 1% yang telah diisi GoldView™ Nucleic Acid Stain 5 ml/30 ml agar, bersama dengan Marker 100 bp DNA *Ladder* (Invitrogen cat.no. 15628-019) dalam buffer TBE 1 X. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100V selama 35 menit. Visualisasi *band* yang muncul dilakukan dengan UV transilluminator dan difoto dengan kamera digital FE-270 7,1 Megapixel.

Sekuensing Hasil Amplifikasi Komplit Gen *stx2*

Analisis produk amplifikasi dilakukan dengan sekuensing produk amplifikasi komplit gen *stx2* di *Eijkman Institute for Molecular Biology* (Jakarta) menggunakan *Big Dye Terminator* dengan alat *ABI PRISM 3130* dan *3130 xl Genetic Analyzer*. Data hasil sekuensing dianalisis dengan program *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) *version 4.0* (Tamura *et al.*, 2007). Sekuen yang diperoleh setelah diedit dianalisis dengan metode *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada *Genebank* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) dengan data nukleotida dan asam amino yang tersedia di *Genebank*. Hubungan evolusi dan pohon filogeni ditentukan berdasarkan metode *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou dan Nei, 1987). Nilai persentase replikasi pohon dari taksa/isolat yang membentuk *clade* diolah dengan *bootstrap test* 1000 dan diperlihatkan dekat cabang, serta analisis struktur proteinnya dilakukan dengan program DDBJ GTOP.

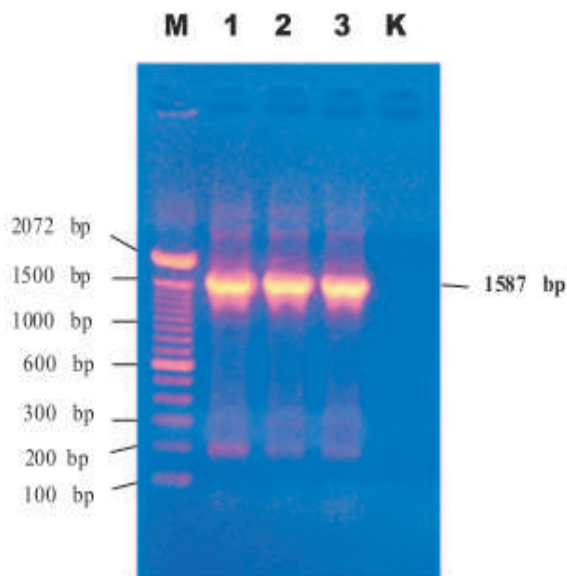
HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi Komplit Gen *Stx2*

Amplifikasi komplit gen *stx2* yang meliputi daerah *open* ORF dilakukan pada isolat asal hewan ataupun manusia yang memiliki similaritas yang tinggi. Dalam penelitian ini berhasil teramplifikasi pada isolat KL-48(2) asal manusia dan isolat SM-25(1) asal sapi, di samping juga isolat kontrol ATCC 43894 dengan hasil amplifikasi seperti Gambar 1.

ada Gambar 1 disajikan bahwa ketiga isolat yaitu KL 48(2) asal manusia sakit dan isolat SM 25(1) asal tinja sapi yang secara jelas dan konsisten teridentifikasi membawa komplit gen *stx2* seperti halnya kontrol ATCC 43894 pada jalur nomor 1 dengan panjang produk 1587 bp. Hasil pada Gambar 1 sekaligus menunjukkan bahwa waktu optimasi untuk amplifikasi DNA target sudah cukup serta desain primer yang dirancang peneliti juga sudah optimal.

Terdeteksinya komplit gen *stx2* pada isolat asal feses manusia sakit (penderita gagal ginjal) dan isolat asal feses sapi, menguatkan hipotesis bahwa isolat *E. coli* O157:H7 tersebut berasal



Gambar 1. Deteksi *open reading frame* (ORF) gene *stx2* dengan primer Stx2(F) dan Stx2(R) pada agarose 1%. Jalur 1 kontrol positif : ATCC 43894; jalur 2: KL(48(2) dan jalur 3: SM25(1), M: Marker 100 bp DNA Ladder (Invitrogen Cat. 15628-019).K-: Kontrol negatif.

dari sumber yang sama serta diduga memiliki ciri genetik yang hampir sama dengan *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 sehingga berpotensi besar sebagai agen zoonosis seperti yang diungkapkan oleh Krauss *et al.* (2003). Untuk lebih memastikan susunan nukleotida penyusunnya, perlu dilakukan konfirmasi berdasarkan hasil sekuensing. Foley *et al.* (2004) menyatakan bahwa DNA sekuensing merupakan suatu metode yang lebih menjanjikan, mudah dikerjakan dan merupakan instrumen pembeda yang sangat akurat.

Analisis Nukleotida *Open Reading Frame* (ORF) Gen *Stx2*

Analisis untuk mengetahui susunan nukleotida dari komplit gen *stx2*, produk PCR dari komplit gene *stx2* isolat KL 48(2) asal manusia sakit dan isolat SM 25(1) asal feses sapi, serta isolat kontrol ATCC 43894 selanjutnya disekuensing di *Eijkman Institute for Molecular Biology* (Jakarta) baik dari sisi *forward* menggunakan primer Stx2(F) maupun dari sisi *reverse* menggunakan primer Stx2 (R). Hasil sekuensing daerah ORF setelah *dialignment* seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. *Alignment* susunan nukleotida (berukuran 1241 nt) daerah *open reading frame* (ORF) dari gene *stx2 E.coli* ATCC 43894, KL-48(2) dan SM-25(1) dengan beberapa isolat lainnya di *genbank* dengan program *clustal W*

E.coli_O157:H7_98-16	ATG	AAG	TGT	ATA	TTA	TTT	AAA	TGG	GTA	CTG	TGC	CTG	TTA	[39]
E.phage_933W	[39]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[39]
E.coli_O157:H7_V20	[39]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[39]
E.coli_O157:H-Thai-13	[39]
E.coli_WUS	[39]
E.coli_O157:H7_144	[39]
E.coli_O157:H7_Fu40	[39]
E.coli_ATCC_43894	[39]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[39]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[39]
E.coli_O157:H7_98-16	CTG	GGC	TTT	TCT	TCG	GTA	TCC	TAT	TCC	CGG	GAA	TTT	ACG	[78]
E.phage_933W	[78]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[78]
E.coli_O157:H7_V20	[78]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[78]
E.coli_O157:H-Thai-13	[78]
E.coli_WUS	[78]
E.coli_O157:H7_144	[78]
E.coli_O157:H7_Fu40	[78]
E.coli_ATCC_43894	[78]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[78]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[78]
E.coli_O157:H7_98-16	ATA	GAC	TTT	TCG	ACT	CAA	CAA	AGT	TAT	GTA	TCT	TCG	TTA	[117]
E.phage_933W	[117]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[117]
E.coli_O157:H7_V20	[117]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[117]
E.coli_O157:H-Thai-13	[117]
E.coli_WUS	[117]
E.coli_O157:H7_144	[117]

Lanjutan Tabel 1

E.coli_O157:H7_144	[351]
E.coli_O157:H7_Fu40	[351]
E.coli_ATCC_43894	[351]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[351]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[351]
E.coli_O157:H7_98-16	ACA	CAT	ATA	TCA	GTG	CCT	GGT	GTG	ACA	ACG	GTT	TCC	ATG	[390]
E.phage_933WC	[390]
E.coli_O157:H7_Thai-12C	[390]
E.coli_O157:H7_V20C	[390]
E.coli_O157:H7_Thai-1	..GC	[390]
E.coli_O157:H-Thai-13C	[390]
E.coli_WUSC	..A	[390]
E.coli_O157:H7_144C	[390]
E.coli_O157:H7_Fu40C	[390]
E.coli_ATCC_43894C	[390]
E.coli_KL_48(2)ManusiaC	[390]
E.coli_SM_25(1)SapiC	[390]
E.coli_O157:H7_98-16	ACA	ACG	GAC	AGC	AGT	TAT	ACC	ACT	CTG	CAA	CGT	GTC	GCA	[429]
E.phage_933W	[429]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[429]
E.coli_O157:H7_V20	[429]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[429]
E.coli_O157:H-Thai-13	[429]
E.coli_WUS	[429]
E.coli_O157:H7_144	[429]
E.coli_O157:H7_Fu40	[429]
E.coli_ATCC_43894	[429]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[429]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[429]
E.coli_O157:H7_98-16	GCG	CTG	GAA	CGT	TCC	GGA	ATG	CAA	ATC	AGT	CGT	CAC	TCA	[468]
E.phage_933W	[468]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[468]
E.coli_O157:H7_V20	[468]
E.coli_O157:H7_Thai-1	..A	[468]
E.coli_O157:H-Thai-13	[468]
E.coli_WUS	[468]
E.coli_O157:H7_144	[468]
E.coli_O157:H7_Fu40	[468]
E.coli_ATCC_43894	[468]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[468]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[468]
E.coli_O157:H7_98-16	CTG	GTT	TCA	TCA	TAT	CTG	GCG	TTA	ATG	GAG	TTC	AGT	GGT	[507]
E.phage_933W	[507]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[507]
E.coli_O157:H7_V20	[507]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[507]
E.coli_O157:H-Thai-13	[507]
E.coli_WUS	[507]
E.coli_O157:H7_144	[507]
E.coli_O157:H7_Fu40	[507]
E.coli_ATCC_43894	[507]
E.coli_KL_48(2)Manusia	[507]
E.coli_SM_25(1)Sapi	[507]
E.coli_O157:H7_98-16	AAT	ACG	ATG	ACC	AGA	GAT	GCA	TCC	AGA	GCA	GTT	CTG	CGT	[546]
E.phage_933WA	[546]
E.coli_O157:H7_Thai-12A	[546]
E.coli_O157:H7_V20A	[546]
E.coli_O157:H7_Thai-1A	[546]
E.coli_O157:H-Thai-13A	[546]
E.coli_WUSA	[546]
E.coli_O157:H7_144A	[546]
E.coli_O157:H7_Fu40A	[546]
E.coli_ATCC_43894A	[546]
E.coli_KL_48(2)ManusiaA	[546]
E.coli_SM_25(1)SapiA	[546]
E.coli_O157:H7_98-16	TTT	GTC	ACT	GTC	ACA	GCA	GAA	GCC	TTA	CGC	TTC	AGG	CAG	[585]
E.phage_933W	[585]
E.coli_O157:H7_Thai-12	[585]
E.coli_O157:H7_V20CT	[585]
E.coli_O157:H7_Thai-1	[585]
E.coli_O157:H-Thai-13	[585]

Pada Tabel 1 disajikan bahwa dari 1241 nukleotida yang *dialignment*, (keseluruhan daerah ORF gen *stx2*) menunjukkan bahwa susunan nukleotida gen *stx2* isolat *E. coli* ATCC 43894, KL-48(2) asal feses manusia penderita gagal ginjal dan SM-25(1) asal feses sapi memiliki susunan yang sama dengan faga 933W yang merupakan faga yang dibawa oleh *E. coli* EDL 933 asal manusia sebagai penyebab wabah *E. coli* O157:H7 tahun 1982 di Amerika. Bakteri *E. coli* EDL 933 diketahui sebagai strain yang sangat virulen dengan gejala timbulnya rasa keram yang menyeluruh di abdominal yang diawali dengan terjadinya diare tanpa darah ataupun dengan darah. Strain ini juga dibuktikan sangat virulen pada saluran cerna babi dan diasumsikan bersifat sangat berbahaya pada manusia (Ding *et al.*, 2010).

Di sisi lain, isolat KL-48(2) dan SM-25(1) memiliki susunan nukleotida yang sangat berbeda jika dibandingkan dengan isolat *E. coli* O157:H7 strain 98-16 (AB168106) asal feses manusia di Jepang, serta strain lainnya yaitu Thai-12 (AB168110) dan Thai-1 (AB168108) asal daging sapi, strain Thai-13 (AB168111), strain 144 (AB168104) dan strain Fu40 (AB168103) asal feses sapi. Hasil *alignment* terhadap strain-strain tersebut, strain lokal KL-48(2) dan SM-25(1) menunjukkan adanya perbedaan nukleotida berupa substitusi transisi (urutan nukleotida ke-45, 72, 93, 369, 513, 753, 867, 971, 1009, 1037, 1074, 1079, 1085, 1091, 1094, 1103 dan 1109), serta substitusi transversi (urutan nukleotida ke-108, 765, 831, 1097 dan 1099). Selain itu, urutan nukleotida berupa substitusi transisi ke- 369 dan ke-513 dapat digunakan sebagai *marker* nukleotida untuk membedakan isolat *E. coli* O157:H7 strain 98-16 dengan beberapa isolat *E. coli* lainnya, termasuk dengan isolat Indonesia KL-48(2) dan SM-25(1).

SIMPULAN

Isolat KL-48(2) asal manusia memiliki susunan nukleotida komplit gen *stx2* yang identik dengan isolat SM-25(1) asal sapi, demikian pula halnya dengan *E. phaga* 933W maupun dengan *E. coli* ATCC 43894 sebagai agen infeksi dengan kemampuan toksin Stx2 yang mematikan.

SARAN

Diketahuinya susunan genetik gen *stx2* yang identik antara isolat lokal *E. coli* O157:H7 dengan strain referen yang diketahui memiliki sifat virulensi tinggi, disarankan untuk melakukan kajian lebih lanjut terhadap tampilan fenotif dari gen *stx2* melalui uji pada hewan coba ataupun pada kultur sel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi-Departemen Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini melalui dana penelitian Strategis Nasional Tahap II Tahun Anggaran 2014 dengan kontrak No. 239.14/UN 14.2/PNL.01.03.00/2014, Tanggal 14 Mei 2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Dahler B. 2002. *Sindrom Hemolitik Uremik. Buku Ajar Nefrologi Anak*. FK-UI. Jakarta.
- Cadirci O, Siriken B, Inat G, Kevenk TO. 2010. The prevalence of *Escherichia coli* O157 and O157:H7 in ground beef and raw meatball by immunomagnetic separation and the detection of virulence genes using multiplex PCR. *Meat Sci* 84: 553-556.
- Ding H, Zhang R, Liu K, Huang L, Tian M, Jiang M, Zao Q, Mao X. 2010. *Escherichia coli* O157:H7 EDL 933 has a strong virulence to bama miniature pigs by injection and fails to colonize to their gastrointestinal tracts. *Afr J Microbiol Res* 4(16): 1742-1746.
- Foley SL, Simjee S, Meng J, White DG, McDermott PF, Zhao S. 2004. Evaluation of molecular typing methods for *E. coli* O157:H7 isolates from cattle, food, and humans. *J Food Protect* 67(4): 651-657.
- Fraser ME, Fujinaga M, Cherney MM, Melton-celsa AR, Twiddy EM, O'Brien AD, James NG. 2004. Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *E. coli* O157:H7. *J Biol Chem* 279: 27511-27517.

- Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol* 140: 360-370.
- Krauss H, Weber A, Appel M, Enders B, Isenberg HD, Schiefer HG, Slenczka W, Graevenitz AV, Zahner H. 2003. *Zoonoses. Infectious diseases transmissible from animals to humans*. 3rd Ed. ASM Press.
- Naylor SW, Gally DL, Low JC. 2005. Review. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 295: 419-441.
- Radu S, Ling OW, Rusul G, Abdul Karim MI, Nisibuchi M. 2001. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE Analyses. *J Microbiol Meth* 46: 131-139.
- Saitou N, Nei M. 1987. *The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. *Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0*. *Molecular Biology and Evolution* 10:1093/molbev/msm 092.



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
DIREKTORAT PENGELOLAAN KEKAYAAN INTELEKTUAL

Sertifikat

Kutipan dari Keputusan Direktur Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia
Nomor: 36a/E/KPT/2016, Tanggal 23 Mei 2016
Tentang Hasil Akreditasi Terbitan Berkala Ilmiah Cetak
Periode I Tahun 2016

Nama Terbitan Berkala Ilmiah
Jurnal Veteriner
ISSN: 1411-8327

Penerbit: Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana
bekerjasama dengan Perhimpunan Dokter Hewan Indonesia

Ditetapkan sebagai Terbitan Berkala Ilmiah

TERAKREDITASI

Akreditasi sebagaimana tersebut di atas berlaku selama
5 (lima) tahun sejak ditetapkan.

Jakarta, 30 Mei 2016

Direktur Jenderal Pengelolaan Kekayaan Intelektual,
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan



[Signature]
Dr. Sadjuga, M.Sc
NIP. 195901171986111001



Sertifikat

Kutipan dari Keputusan Direktur Jenderal Pendidikan Tinggi
Kementerian Pendidikan Nasional Republik Indonesia
Nomor: 81/DIKTI/Kep/2011, Tanggal 15 November 2011
Tentang Hasil Akreditasi Terbitan Berkala Ilmiah

(Periode 1 Tahun 2011)

Nama Terbitan Berkala Ilmiah

Jurnal Veteriner

ISSN: 1411-8327

Penerbit: Fak. Kedokteran Hewan, Univ. Udayana bekerja sama
dengan Perhimpunan Dokter Hewan Indonesia Denpasar

Ditetapkan sebagai Terbitan Berkala Ilmiah

TERAKREDITASI

Akreditasi sebagaimana tersebut di atas berlaku selama
5 (lima) tahun sejak ditetapkan.

Jakarta, 15 November 2011

s.n. Direktur Jenderal Pendidikan Tinggi
Direktur Pembelajaran dan Pengabdian Kepada Masyarakat,



[Handwritten signature]

Suryo Tri Utomo

NIP. 19460901 198503 1 0034