

## **Deteksi Gen eae Sebagai Marker Strain EPEC (Enteropathogenic *Escherichia coli*) pada Daging Ayam yang Dijual di Beberapa Pasar Tradisional Surabaya**

### **Detection of eae Gene as A Marker Strain EPEC (Enteropathogenic *Escherichia coli*) in Chicken Meat Sold at Some Traditional Markets in Surabaya**

Amirul Muslim Amrullah<sup>1</sup>, Fedik Abdul Rantam<sup>2</sup>, Dadik Raharjo<sup>3</sup>, Wiwiek Tyasningsih<sup>2</sup>, Agnes Theresia Soelih Estoepangestie<sup>3</sup>, Martia Rani Tacharina<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Program Profesi Dokter Hewan, <sup>2</sup>Departemen Mikrobiologi Veteriner, <sup>3</sup>Departemen Kesehatan Masyarakat Veteriner  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga  
Corresponding author: [amamrullah@fkh.unair.ac.id](mailto:amamrullah@fkh.unair.ac.id)

#### **ABSTRACT**

This study aimed to detect the presence of eae gene in *E. coli* from chicken meat sold at the traditional market Surabaya. Identification of bacteria was carried out in several stages, inoculated on pre-enrichment media using Buffered Peptone Water (BPW), planting on Levine's Eosin Methylene Blue Agar (L-EMB) media, suspected colonies on L-EMB were subjected to *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) and Indol test for the confirmation of *E. coli*. The confirmed *E. coli* isolates were tested by Polymerase chain reaction (PCR) to determine the presence of the eae gene. The results showed that *E. coli* could be identified in 28 out of 100 (28%) chicken meat samples, and eae gene was detected in three *E. coli* isolates (11%).

**Keywords:** *E. coli*, eae gene, PCR, chicken meat, traditional market

**Received:** 19-02-2022

**Revised:** 29-03-2022

**Accepted:** 23-06-2022

#### **PENDAHULUAN**

Daging ayam merupakan salah satu bahan pangan asal hewan yang paling banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia, untuk memenuhi kebutuhan akan protein hewani. Jumlah konsumsi daging ayam mencapai 84,07% dari total konsumsi daging ternak lainnya (Susanti, 2014).

Menurut WHO (2015) foodborne diseases adalah penyakit yang ditularkan melalui makanan dan WHO memperkirakan bahwa terdapat 600 juta penduduk dunia mengalami kasus foodborne disease serta sebanyak 420.000 di antaranya meninggal pada tahun 2010, dimana 40% dari kematian tersebut adalah anak-anak di bawah usia 5 tahun. *Foodborne diseases* dengan kasus terbanyak adalah diare yang disebabkan oleh agen penyakit *Norovirus*, *Campylobacter sp.*, non-

*typhoidal Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Cryptosporidium sp.*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia sp.*, *Vibrio cholerae*, dan *E. coli*.

Agen penyakit untuk kasus diare terbanyak yang disebabkan oleh bakteri adalah kasus diare yang disebabkan oleh bakteri *E. coli* yaitu sebanyak 110 juta kasus pada interval tahun 2007-2015 secara global, itu dapat terjadi karena *E. coli* memiliki beberapa strain yang masing-masing dapat menjadi penyebab diare (WHO, 2015).

Gen eae sebagai marker strain EPEC menyebabkan lesi A/E pada mukosa usus manusia. Gen eae mengkode intimin yaitu sebuah membran protein 94-kDa yang membantu perlekatan bakteri dengan sel mukosa usus dan menyebabkan kerusakan usus (Jerse and Kaper,

1991). Strain EHEC juga memiliki gen *eae* yang homolog dengan gen *eae* EPEC karena juga membantu perlekatan bakteri dengan mikrovili usus (Donnenberg et al, 1993). Penentuan gen *eae* menjadi penting sebagai faktor patogenesis EPEC dan EHEC.

PCR adalah teknik dalam biologi molekuler yang bertujuan untuk mengamplifikasi satu atau beberapa salinan dari sepotong DNA target, menghasilkan ribuan hingga jutaan salinan sequence DNA tertentu. PCR difungsikan untuk mendeteksi adanya gen *eae* sebagai marker EPEC karena setiap strain *E. coli* memiliki pathotype yang spesifik dan berbeda sehingga tidak mencukupi jika dilakukan diagnostic secara konvensional. Deteksi gen menggunakan PCR memiliki kelebihan yaitu merupakan metode yang sensitif dan spesifik serta dapat diketahui hasilnya dalam waktu satu hari (Guntina dan Kusuma, 2017). Karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi adanya cemaran bakteri *E. coli* dan mendeteksi gen *eae* sebagai marker untuk strain EPEC pada daging ayam yang dijual di pasar tradisional melalui metode uji PCR.

## METODE

Penelitian ini merupakan penelitian survey untuk mendeteksi adanya gen *eae* pada *E. coli* yang mengkontaminasi daging ayam dari pasar tradisional Surabaya. 100 sampel daging ayam didapat dari penjual daging ayam di pasar tradisional Surabaya.

Sampel daging ayam dan kulit ayam sebanyak 10 gram dalam botol duran yang berisi larutan BPW 10% sebanyak 100 ml, diinkubasi pada suhu 35°C-37°C selama 16-20 jam (Zelpina dkk, 2018). Kemudian diinokulasikan pada media selektif L-EMB dengan cara streak pada permukaan media, kemudian diinkubasikan pada suhu 35°C selama 20 jam. Biakan diduga *E.*

*coli* jika pertumbuhan koloni pada media L-EMB, koloninya berwarna ungu gelap dengan hijau metalik yang mengkilat. Satu koloni pada media L-EMB diambil kemudian diinokulasikan pada media TSIA. Media tersebut diinkubasikan pada suhu 35°C selama 20 jam. Sampel diduga *E. coli* positif jika menunjukkan A/A, H<sub>2</sub>S negatif, dan gas positif (FDA, 2020).

Bakteri *E. coli* yang diduga positif pada media L-EMB dan TSIA selanjutnya dilakukan penyimpanan bakteri dengan cara stok. Stok bakteri dilakukan dengan kultur stab yang dipertahankan pada suhu ruang di media Mueller Hinton Agar (MHA). (Angshumanjana et al, 2016).

Bakteri pada stok selanjutnya dilakukan uji biokimiawi dengan Indol. Jika sampel tampak cincin berwarna merah pada permukaan media maka sampel diduga positif *E. coli* sedangkan jika tidak terjadi perubahan warna atau warna permukaan tetap kuning maka akan dianggap hasil negatif (FDA, 2020 dan MacWilliams, 2009).

Sampel kemudian diinokulasikan pada media MCA dengan cara streak pada permukaan media, kemudian diinkubasikan pada suhu 35°C selama 24 jam. Biakan diduga *E. coli* jika pertumbuhan koloni pada media MCA berwarna merah muda. Hanya sampel yang positif mengandung *E. coli* selanjutnya dilakukan isolasi DNA sampel (FDA, 2020 dan Humeau, 2015).

Koloni bakteri pada MCA selanjutnya dilakukan isolasi DNA. Isolasi DNA mengikuti prosedur yang dilakukan oleh Afif dan Putri (2019) menggunakan metode Boiling. Sebanyak 2-3 ose dari koloni MCA dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml yang berisi 500µl agudest steril. Suspensi divorteks sampai homogen. Proses Boiling dilakukan pada suhu 95-100°C, selama 10 menit. Suspensi selanjutnya

disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit hingga terpisah supernatan dan pellet. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus baru dan disimpan pada suhu (-20°C).

DNA bakteri yang sudah diisolasi selanjutnya dilakukan amplifikasi DNA menggunakan Thermalcycler. Amplifikasi DNA mengikuti prosedur yang dilakukan oleh Stanilova et al. (2011) menggunakan campuran reagen yang mengandung 12,5 µl PCR Mix (2x MyTaq HS Red Mix), 5 µl PCR water, 1 µl Primer eaeF (5'-TCAATGCAGTTCCGTTATCAGTT-3'), 1 µl Primer eaeR (5'-GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG-3'), tambahkan 5,5 µl DNA sampel yang sudah diekstrak kedalam campuran reagen dengan total volume reaksi akhir berjumlah 25 µl. Kemudian atur siklus denaturasi awal pada suhu 94°C selama 3 menit, denaturasi 94°C selama 1 menit, primer annealing 60°C selama 90 detik, primer extension 72°C selama 90 detik, kemudian diulangi sebanyak 35 siklus, tahap terakhir adalah Final extension 72°C selama 7 menit.

Hasil amplifikasi DNA dilanjutkan dengan elektroforesis. Cuplikan yang berupa sampel, kontrol positif, kontrol negatif, dan DNA Ladder 100 bp masing-masing sebanyak 5 µl dimasukkan dalam sumur-sumur gel dan dialirkan arus listrik 100 V hingga warna indikator mencapai 1 cm dari tepi bawah gel. (Radji dkk, 2010). Gel agarose hasil elektroforesis dimasukkan kedalam UV transilluminator. Fragmen yang terlihat dibandingkan dengan kontrol positif dan DNA Ladder 100 bp. Sampel menunjukkan positif mengandung *E. coli* yang membawa gen eae jika terdapat pita nyata pada ukuran 482 pasang basa (Stanilova et al, 2011).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil uji bakteriologis dan uji PCR, dari 100 sampel daging ayam yang dibeli dari pedagang di pasar tradisional Surabaya sebanyak 28 sampel positif (28%) terkontaminasi bakteri *E. coli* dan diantaranya sebanyak 3 sampel positif (11%) terkontaminasi bakteri *E. coli* yang membawa gen eae sebagai marker strain EPEC. Koloni bakteri yang diduga *E. coli* dengan ciri khas koloni berwarna ungu gelap dengan hijau metalik pada L-EMB.

Koloni bakteri yang tumbuh pada media L-EMB selanjutnya dilakukan uji biokimiawi pada media TSIA. Koloni bakteri yang diduga *E. coli* tampak permukaan miring tabung berwarna kuning, dasar tabung berwarna kuning, gas positif, dan H<sub>2</sub>S negatif.

Bakteri pada stok selanjutnya dilakukan uji indol. Hasil uji indol yang diduga positif *E. coli* terlihat bentukan cincin berwarna merah di permukaan.

Bakteri yang diduga *E. coli* pada stok diinokulasikan pada media MCA. Koloni bakteri yang diduga *E. coli* dengan ciri khas koloni berwarna merah muda pada MCA. Koloni bakteri yang diduga positif *E. coli* pada media L-EMB, TSIA, Indol, dan MCA ditemukan pada 28 sampel dari 100 sampel dapat.

Bakteri yang telah diisolasi DNA selanjutnya dilakukan uji PCR dilanjutkan dengan Elektroforesis dan hasilnya dilihat dengan menggunakan gel documentation, Sampel dikatakan positif mengandung *E. coli* yang membawa gen eae sebagai marker strain EPEC jika terdapat pita nyata pada ukuran 482 pasang, hasilnya ditemukan *E. coli* yang membawa gen eae sebanyak 3 sampel dari 28 sampel (lihat Gambar 1, Gambar 2, Tabel 1, dan Tabel 2).

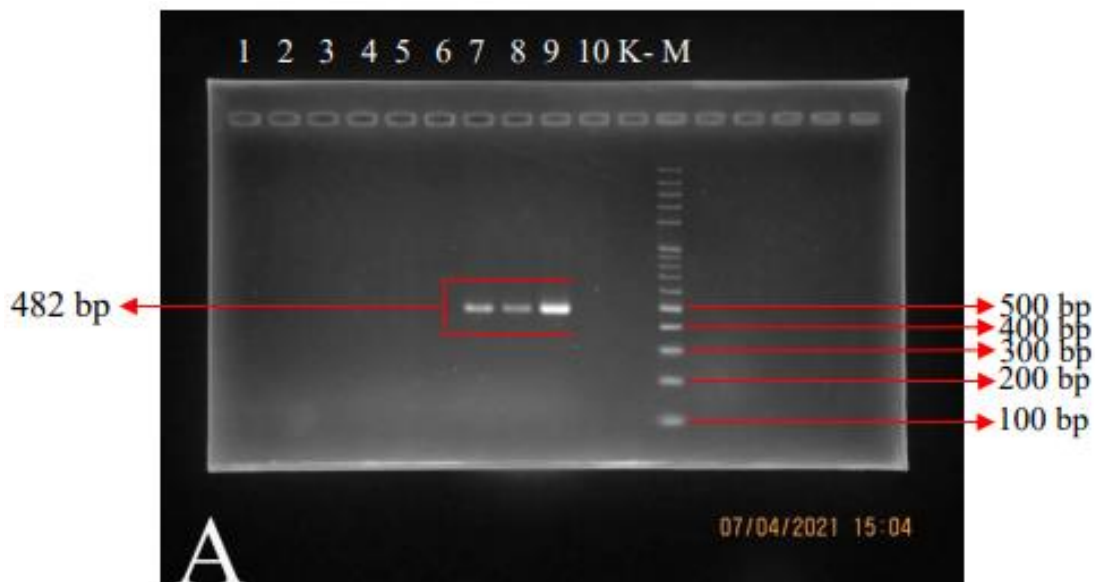
Berdasarkan penelitian ini, menunjukkan bahwa beberapa daging ayam yang dijual di pasar P, pasar M,

**Tabel 1.** Hasil Uji PCR

No. Sampel	Kode Sampel	Hasil PCR	No. Sampel	Kode Sampel	Hasil PCR
1	DP002	(-)	15	DP037	(-)
2	DK043	(-)	16	DP039	(-)
3	DM059	(-)	17	DP040	(-)
4	DM071	(-)	18	DK044	(-)
5	DM087	(-)	19	DK047	(-)
6	DT091	(-)	20	DK048	(-)
7	DT092	(+)	21	DK049	(-)
8	DT094	(+)	22	DK055	(-)
9	DT096	(+)	23	DM061	(-)
10	DP001	(-)	24	DM072	(-)
11	DP026	(-)	25	DM074	(-)
12	DP030	(-)	26	DM085	(-)
13	DP033	(-)	27	DM086	(-)
14	DP034	(-)	28	DM089	(-)

**Tabel 2.** Hasil dan Prevalensi tiap Pasar

Nama Pasar	Jumlah Sampel	Positif <i>E. coli</i>	Prevalensi (jumlah sampel/positif <i>E. coli</i> )	Positif <i>E. coli</i> membawa gen <i>eae coli</i> gen <i>eae</i>	Prevalensi (positif <i>E. coli</i> /positif <i>E. coli</i> )
P	40	9	22,5 %	0	0%
M	34	9	26,5%	0	0%
K	16	6	37,5%	0	0%
T	10	4	40%	3	75%
Total	100	28	28%	3	11%



**Gambar 1.** Hasil uji PCR terlihat pita nyata pada tiga sampel nomor 7, 8, dan 9 yang menandakan hasil uji positif.



**Gambar 2.** Hasil uji PCR tidak terlihat pita nyata pada semua sampel yang menandakan tidak ada sampel yang positif.

pasar K, dan pasar T sudah terkontaminasi oleh bakteri *E. coli* namun hanya pasar T saja yang terkontaminasi oleh bakteri *E. coli* yang membawa gen *eae* sebagai marker strain EPEC. Adanya bakteri *E. coli* pada daging menunjukkan adanya sanitasi yang tidak baik dalam pengelolaan bahan makanan. Bakteri tersebut menyebabkan kerusakan pada daging seperti timbulnya bau dan lendir. Higiene tentang pengolahan daging dan perlakuan daging sangat penting karena *E. coli* dapat berasal dari manapun (Zakki, 2015).

Kondisi di pasar tradisional mempermudah terjadinya kontaminasi bakteri *E. coli* pada daging ayam dikarenakan tata letak ruang yang tidak sesuai, yaitu hanya dengan meletakkan daging ayam di atas meja dan disimpan pada suhu ruang serta jaraknya yang masih berdekatan dengan bahan kebutuhan lainnya (Juwita, 2014). Selain itu, penjual ataupun penjamah daging ini perlu memperhatikan kebersihan peralatan untuk mengolah daging. Sebab peralatan yang kotor

dapat menjadi sumber kontaminasi bakteri *E. coli* ke daging. Demikian pula kebersihan tangan penjual, apabila tidak terpelihara akan dapat menyebabkan bakteri berpindah dari tangan ke daging tersebut (Bahri dkk, 2019).

Oleh karenanya masyarakat perlu memperhatikan kebersihan dan sanitasi yang berada di lingkungan sekitar. Peralatan yang digunakan dalam pengolahan daging harus dijaga kebersihannya. Begitu pula makanan yang dimakan terutama daging harus dimasak hingga matang sebelum dikonsumsi. Jika daging yang terkontaminasi bakteri *E. coli* tetap dikonsumsi maka akan bisa menyebabkan penyakit.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa *E. coli* pada keseluruhan sampel daging ayam yang dijual oleh pedagang di pasar tradisional P, M, K, dan T Surabaya sebanyak 28 sampel (28%) terdeteksi adanya cemaran bakteri *E. coli* dan diantaranya

sebanyak 3 sampel (11%) terdeteksi adanya cemaran bakteri *E. coli* yang membawa gen *eae* sebagai marker strain EPEC pada pasar tradisional T Surabaya.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Afif, R. and Putri, D. H. 2019. 16S rRNA Gene Amplification Of Endophytic Bacteria Which Produces Antimicrobial Compounds. *Bio Sains*. 4(1): 48-53.
- Afrianti, M., Dwiloka, B., Setiani, B. E. 2013. Perubahan Warna, Profil Protein, dan Mutu Organoleptik Daging Ayam Broiler Setelah Direndam Dengan Ekstrak Daun Senduduk. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 2(3): 116-120.
- Angshumanjana, Anirbanjana, Dipjitdey, Arijitmajumdar, Jayantabikashdey, and Tudu, N. 2016. Selection of Storage Methods for Maintenance of Different Stock Cultures. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 5(10): 1097-1104.
- Bahri, S., Rokhim, S., dan Prasiska, Y. S. 2019. Kontaminasi Bakteri *Escherichia coli* pada Sampel Daging. *Journal of Health*
- Donnenberg, M. S., Tzipori, S., McKee, M. L., O'Brien, A. D., Alroy, J., Kaper J. B. 1993. *Journal of Clinical Investigation*. 92(3): 1418-1424.
- Food and Drug Administration. 2020. *Bacteriological Analytical Manual 8th Edition Revision A Chapter 4 and Chapter 4A*. [Online] <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria#conventional>, <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4a-diarrheagenic-escherichia-coli> diakses pada 27 Oktober 2020 pukul 20.10 WIB.
- Guntina, R. K. dan Kusuma, S. A. F. 2017. Deteksi Bakteri *Vibrio cholerae*. *Farmaka*. 15(1): 92-104.
- Humeau. 2015. *MacConkey Agar*. Laboratoires Humeau. Liofilchem.
- Jerse, A. E. and Kaper, J. B. 1991. The *eae* Gene of Enteropathogenic *Escherichia coli* Encodes a 94-Kilodalton
- Juwita, U., Haryani, Y., Jose, C. 2014. Jumlah Bakteri Coliform dan Deteksi *Escherichia coli* Pada Daging Ayam Di Pekanbaru. *JOM FMIPA*. 1(2): 48-55.
- MacWilliams, M. P. 2009. *Indole Test Protocol*. American Society for Microbiology.
- Marliena, L. 2016. Uji Bakteriologis dan Organoleptik Daging Ayam (*Gallus gallus domesticus*) Di Pasar Tradisional dan Pasar Modern Kota Bandar Lampung. Skripsi.
- Membrane Protein, the Expression of Which Is Influenced by the EAF Plasmid. *Infection and Immunity*. 59(12): 4302-4309.
- 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.
- Rafika, N., Irmawaty, Kiramang, K. 2018. Tingkat Cemaran Bakteri *Escherichia coli* Pada Daging Ayam yang dijual di pasar Tradisional Makassar. *Prosiding Seminar Nasional Megabiodiversitas Indonesia. Science and Prevention*. 3(1): 62-67.
- Stanilova, S., Rusenova, N., Petrova, D., and Stoyanchev, T. 2011. Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains In Meat. *Trakia Journal of Sciences*. 9(3): pp 51-57.

- Susanti, N. 2014. Penerapan Model Neural Network Backpropagation Untuk Prediksi Harga Ayam. Prosiding SNATIF. 325-332.
- World Health Organization (WHO). 2015. WHO Estimates Of The Global Burden Of Foodborne Diseases. Switzerland: WHO Press.
- Zakki, G. I. 2015. Pengetahuan Dan Perilaku Preventif Terhadap Bakteri E-coli Pada Masyarakat Kecamatan Gondomanan Di Kota Yogyakarta. Skripsi. Fakultas Ilmu Pendidikan. Universitas Negeri Semarang: Semarang.
- Zelpina, E., Purnawarman, T., dan Lukman, D. W. 2018. Keberadaan Salmonella sp. Pada Daging Ayam Suwir Bubur Ayam Yang Dijual Di Lingkar Kampus Institut Pertanian Bogor Dramaga Bogor. Jurnal Penelitian PascaPanen Pertanian. 15(2): 73-79.

\*\*\*