

DETEKSI *ESCHERICHIA COLI* PATOGEN DARI USAP KLOAKA AYAM LAYER DARI TUJUH PROVINSI INDONESIA DENGAN MENGGUNAKAN METODE CONGO RED

Novida Ariyani, Maria Fatima Palupi, Nurhidayah, Indriyana, Eli Nugraha,
Dyah Widyarimbi

Unit Uji Farmasetik dan Premiks
Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur-Bogor 16340
*email: novida_07@yahoo.co.id

ABSTRAK

Escherichia coli merupakan bakteri komensal Gram negatif yang secara alami terdapat dalam saluran pencernaan hewan dan manusia. Beberapa bakteri ini dapat bersifat patogen dan menyebabkan kejadian penyakit sistemik baik pada hewan maupun manusia. Tujuan dari pengkajian ini adalah untuk mengetahui jumlah isolat *E. coli* patogen dari 327 isolat *E. coli* hasil isolasi dari 109 pool usap kloaka dengan menggunakan metode Congo Red. Sebanyak 327 isolat *E. coli* diisolasi dari 109 pool usap kloaka yang berasal dari 109 flock ayam layer di tujuh provinsi di Indonesia (Jawa Barat, Jawa Timur, Jawa Tengah, Banten, Sumatera Barat, Sumatera Utara, dan Sulawesi Selatan). Sebelumnya, isolat-isolat tersebut telah diuji resistansinya terhadap siprofloksasin dan didapatkan 166 isolat resistan terhadap siprofloksasin (50,76%). Kemampuan mengikat zat warna pada media congo red dapat digunakan sebagai penanda untuk membedakan isolat *E. coli* bersifat patogen atau non patogen. Isolat dinyatakan patogen jika setelah inkubasi pada suhu 35-37°C selama 18-24 jam, kemudian inkubasi dilanjutkan pada suhu ruang selama 48 jam menunjukkan koloni berwarna merah dan dinyatakan tidak patogen bila koloni berwarna putih. Hasil uji menunjukkan bahwa 59 isolat *E. coli* patogen (18,04%) dan 268 isolat *E. coli* non patogen (81,96%). Berdasarkan hasil uji resistansi yang telah dilakukan sebelumnya, dari 59 isolat *E. coli* patogen, didapatkan 25 isolat diantaranya resistan siprofloksasin (42,37%). Hal ini menunjukkan adanya potensi infeksi *E. coli* patogen resistan siprofloksasin pada ayam layer. Oleh sebab itu, sangat disarankan agar peternak untuk selalu meningkatkan biosekuriti kandang ayam petelur. Apabila dalam penanganan infeksi bakteri diperlukan antibiotik, maka antibiotik harus diberikan dengan sangat bijak untuk menghindari semakin meningkatnya resistansi antimikroba.

Kata kunci: *Escherichia coli*, congo red, patogenesitas, ayam layer

ABSTRACT

Escherichia coli is a Gram negative commensal bacteria that is naturally found in the digestive tract of animals and humans. Some of these bacteria can be pathogenic and cause systemic diseases in both animals and humans. The purpose of this study was to determine the number of pathogenic *E. coli* isolates from 327 isolates of *E. coli* isolated from 109 cloacal swab pools using the Congo Red method. A total of 327 isolates of *E. coli* were isolated from 109 cloacal swab pools from 109 layer chicken flocks in seven provinces in Indonesia (West Java, East Java, Central Java, Banten, West Sumatra, North Sumatra, and South Sulawesi). Previously, these isolates had been tested for resistance to ciprofloxacin and found 166 isolates resistant to ciprofloxacin (50.76%). The ability to bind dyes in congo red media can be used as a marker to distinguish pathogenic or non-pathogenic *E. coli* isolates. Isolates were declared pathogenic if after incubation at a temperature of 35-37°C for 18-24 hours, then incubation was continued at room temperature for 48 hours showing red colonies and declared non-pathogenic if the colonies were white. The test results showed that 59 isolates of pathogenic *E. coli* (18.04%) and 268 isolates of non-pathogenic *E. coli* (81.96%). Based on the results of resistance tests that have been carried out previously, from 59 isolates of pathogenic *E. coli*, 25 isolates were found to be ciprofloxacin resistant (42.37%). This indicates the potential for infection with ciprofloxacin-resistant pathogenic *E. coli* in layer chickens. Therefore, it is highly recommended that breeders always improve the biosecurity of laying hens. If antibiotics are needed in the treatment of bacterial infections, then antibiotics must be given very wisely to avoid emerging the antimicrobial resistance.

Key words: *Escherichia coli*, congo red, pathogenicity, laying hens

PENDAHULUAN

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif yang termasuk dalam familia *Enterobacteriaceae*, berbentuk batang, bersifat fakultatif anaerob dan tidak membentuk spora (Yang dan Hang 2014). Bakteri ini bersifat komensal yang normal ditemukan baik dalam saluran pencernaan manusia maupun hewan dan juga terdapat pada lingkungan. Beberapa bakteri ini bersifat patogen dan dapat menyebabkan penyakit sistemik baik pada manusia dan hewan. *Escherichia coli* merupakan salah satu agen patogen yang penting yang dapat menyebabkan penyakit pada unggas dan mamalia baik sebagai agen primer maupun sekunder dikenal dengan *Avian Pathogenic E.coli* (Ewers *et al.* 2004). Sebagai agen patogen *E. coli* dibedakan menjadi dua kelompok yaitu bersifat oportunistik dan enteropatogenik/enterotoksigenik. *E. coli* bersifat oportunistik yaitu dapat menyebabkan penyakit dalam keadaan tertentu seperti mengikuti penyakit lain atau kekurangan makanan, sedangkan yang bersifat enteropatogenik/enterotoksigenik yaitu karena *E. coli* ini mempunyai antigen perlekatan dan dapat memproduksi toksin yang dapat menyebabkan penyakit (Lay dan Hastowo 1992, Tarmudji 2003). Salah satu penyakit yang disebabkan oleh *E.coli* patogen yaitu kolibasilosis pada unggas. Penyakit ini dapat menyebabkan kerugian ekonomi yang cukup tinggi pada peternakan unggas karena dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan, menurunkan produksi, meningkatkan jumlah ayam yang diafkir, meningkatkan mortalitas, serta menurunkan kualitas karkas, telur dan anak ayam (Tarmudji 2003).

Terkait dengan keamanan pangan bakteri *E. coli* dapat digunakan sebagai indikator untuk higiene dan sanitasi. Adanya bakteri ini pada produk pangan menunjukkan rendahnya tingkat sanitasi (Rahayu *et al.* 2018). Apabila dalam produk pangan ditemukan kontaminasi

E. coli, maka diindikasikan adanya kontaminasi feses pada produk pangan. Hal ini dikarenakan, *E. coli* secara normal terdapat dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. Pangan yang tercemar bakteri ini dapat menyebabkan *foodborne disease*. Disamping itu *E. coli* juga dapat digunakan untuk pemantauan dan surveilans resistansi antimikroba (OIE 2016).

Kemampuan untuk membedakan organisme patogen dan non patogen adalah merupakan parameter yang penting dalam penelitian untuk mengetahui karakteristik virulensi dari organisme tersebut (Berkhoff dan Vinal 1985). Menurut Berkhoff dan Vinal (1985) terdapat korelasi langsung antara kemampuan *E. coli* klinis mengikat zat warna *congo red* dengan kemampuan untuk menyebabkan infeksi pada ayam. Media *congo red* dapat digunakan untuk mengetahui sifat patogenesitas dari isolat *E. coli* dengan melihat kemampuan untuk mengikat zat kimia pada media *congo red*. Pengkajian ini merupakan kelanjutan dari pengkajian sebelumnya mengenai tingkat resistansi siprofloksasin yang hasilnya telah dipublikasikan oleh Nuridayah *et al.* (2021). Tujuan pengkajian ini untuk membedakan isolat *E. coli* patogen dan non patogen yang diisolasi dari ayam layer yang sehat sehingga bisa digunakan sebagai data untuk melakukan penilaian risiko kemungkinan paparan *E. coli* patogen resistan siprofloksasin.

MATERI DAN METODE

Materi dan Alat

Materi yang digunakan yaitu 327 isolat *E. coli* yang diisolasi dari *pool* usap kloaka yang berasal dari 109 flock ayam layer di tujuh provinsi di Indonesia yaitu Jawa Timur (126 isolat), Jawa Tengah (39 isolat), Banten (30 isolat), Jawa Barat (33 isolat), Sulawesi Selatan (30 isolat), dan Sumatera Utara (39 isolat) yang diambil pada tahun 2021.

Bahan yang digunakan yaitu *Congo Red* (Sigma-Aldrich-USA), *Nutrient agar* (Oxoid-Ltd-United), dan *E. coli* ATCC 25922. Isolat-isolat ini sebelumnya telah diuji resistansinya terhadap siprofloksasin dan hasilnya sudah dipublikasikan (Nurhidayah *et al.* 2021)

Peralatan yang digunakan adalah timbangan analitik (Shimadzu-Jepang), inkubator (Hirasawa, Jepang), kompor listrik, *vortex mixer*, erlenmeyer, botol duran 1000 mL, kertas timbang, tabung, *autoklave* (Tomy, Jepang), cawan petri, *waterbath* (Memerth), pipet serologis (pyrex, Jepang), *magnetic stirrer*, dan pH meter (Metrohm).

Metode

Uji patogenesis dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan media *congo red* (Berkhoff dan Vinal 1985). Isolat *E. coli* dan strain bakteri kontrol *E. coli* ATCC 25922 diinokulasi pada media *congo red* dan diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 18-24 jam, kemudian inkubasi dilanjutkan pada suhu ruang selama 48 jam. Pengamatan dilakukan

dengan melihat pertumbuhan koloni pada media *congo red* pada akhir masa inkubasi. Isolat *E. coli* patogen akan berwarna merah (mengikat *congo red*/ CR+) sedangkan koloni isolat *E. non* patogen berwarna putih (tidak mengikat *congo red*/ CR -).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji patogenesis pada 327 isolat *E. coli* dari usap kloaka ayam layer dengan media *congo red* menunjukkan bahwa 59 isolat adalah patogen (18,04%) dan 268 isolat adalah non patogen (81,96%). Jumlah isolat *E. coli* patogen berasal dari Provinsi Jawa Timur yaitu Kabupaten Kediri adalah 16 (27,12%) dan Kabupaten Tulungagung adalah 10 (16,95%), Sumatera Utara terdapat 12 isolat (20,34%), Jawa Barat sebanyak 8 isolat (13,56%) dan Jawa Tengah terdapat 13 isolat (22,03%). Adapun untuk semua isolat yang diambil di provinsi Sulawesi Selatan, Sumatera Barat dan Banten bersifat non patogen. Hasil uji patogenesis secara *in vitro* dengan media *congo red* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Hasil uji patogenesis 327 isolat *E. coli* dari usap kloaka ayam layer dengan

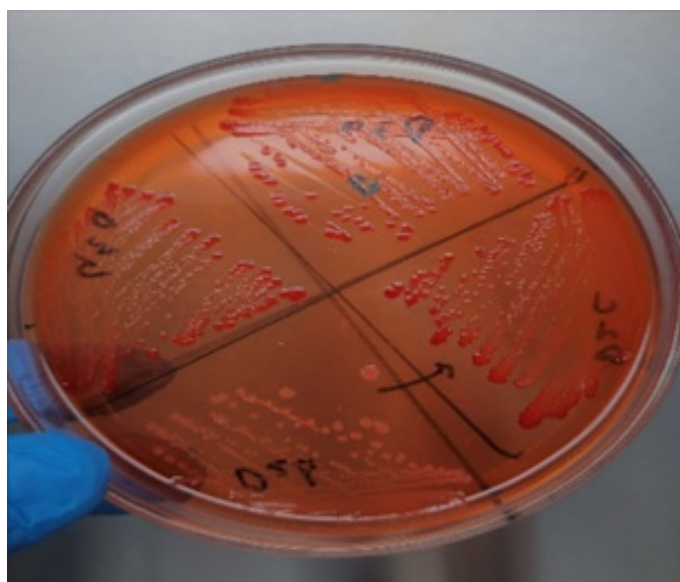
Provinsi	Kabupaten	Jumlah isolat	Jumlah dan persentase isolat <i>E. coli</i> patogen	Jumlah dan persentase isolat <i>E coli non</i> patogen
Jawa Timur	Kediri	63	16 (25,40%)	47 (74,60%)
Jawa Timur	Tulungagung	63	10 (15,87%)	53 (84,13%)
Sumatera Utara	Binjai	39	12 (30,77%)	27 (69,23%)
Sumatera Barat	Lima Puluh Kota	30	0 (0%)	30 (100%)
Jawa Barat	Bandung	33	8 (24,24%)	25 (75,76%)
Jawa Tengah	Kendal	39	13 (33,33)	26 (66,67%)
Sulawesi Selatan	Gowa	30	0 (0%)	30 (100%)
Banten	Tangerang	30	0 (0%)	30 (100%)
Jumlah isolat		327	59 (18,04%)	268 (81,96%)

Metode Congo Red

Hasil uji pada Tabel 1 menunjukkan bahwa persentase isolat *E. coli* patogen yang tertinggi adalah dari provinsi Jawa Tengah (33,33,%), selanjutnya Sumatera Utara (30,77%), Jawa Timur/Kabupaten Kediri (25, 40%), Jawa Barat (24,24 %), dan Jawa Timur/ Kabupaten Tulungagung (15, 87%). Persentase ini dihitung terhadap jumlah isolat *E. coli* yang diuji dari masing-masing provinsi. Jumlah masing-masing isolat yang didapatkan tiap-tiap provinsi ini berbeda karena pengambilan sampel dari tiap provinsi proporsional sesuai jumlah populasi ayam petelur dari tujuh provinsi di Indonesia berdasarkan data dari DJPKH

(2019) dan berdasarkan rumus cara sampling monitoring resistansi antimikroba (FAO 2019) dengan nilai dugaan prevalensi resistansi siprofloksasin yaitu 59,75 % yang merupakan hasil kajian Palupi *et al.* (2020).

Isolat *E. coli* yang bersifat patogen ditandai dengan koloni berwarna merah pada media *congo red*, hal ini menunjukkan bahwa isolat ini memberikan reaksi positif yaitu mengikat zat warna yang terdapat pada media *congo red*. Sedangkan isolat *E. coli* yang bersifat non patogen ditandai dengan koloni yang berwarna putih, hal ini karena tidak mampu mengikat zat warna yang terdapat pada media *congo red* (Gambar.1)



Gambar 1 Hasil uji patogenesitas pada media *congo red*
Isolat *E. coli* non patogen (warna putih)
Isolat *E. coli* patogen (warna merah)

Escherichia coli merupakan mikroflora yang umum terdapat pada saluran pencernaan hewan. Bakteri komensal pada ayam biasanya baru berkembang pada saat ayam berumur tiga hari (Lan *et al.* 2005). Oleh sebab itu, *E. coli* juga digunakan sebagai salah satu parameter dalam monitoring resistansi. Beberapa galur *E. coli* bersifat patogen dan menyebabkan penyakit. Pada penelitian ini digunakan media *congo red*

untuk mengetahui sifat patogenesitas isolat *E. coli* yang didapatkan dari peternakan layer di tujuh provinsi di Indonesia. Media ini dapat membedakan isolat patogen dan non patogen dengan melihat adanya reaksi pengikatan zat warna. Pada media *congo red*, *E. coli* patogen akan bereaksi positif dengan mengikat warna *congo red* sehingga warna koloni menjadi merah, sedangkan *E. coli* non patogen berwarna

putih karena tidak mampu mengikat warna *congo red*. Menurut Berkhoff dan Vinal 1985 reaksi pengikatan warna ini akan tampak setelah isolat diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam dan warna akan lebih nyata setelah diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam. Kemampuan pengikatan *E. coli* pada zat warna *congo red* digunakan sebagai penanda tingkat patogenesitasnya. Gjessing dan Berkhoff (1988) menyatakan bahwa antara ekspresi fenotip dengan tingkat pengikatan *E. coli* pada media *congo red* mempunyai korelasi yang cukup kuat terhadap sifat virulensi bakteri tersebut.

Kemampuan mengikat zat warna pada media *congo red* ini akan menghilang jika isolat tersebut disub kultur pada media komplek seperti pada media agar darah. Mekanisme pengikatan zat warna *congo red* ini belum dapat dijelaskan secara biokimia namun kemungkinan karena adanya β -D-glukan pada dinding sel bakteri (Berkhoff dan Vinal 1985). Pengikatan *congo red* ini melibatkan polisakarida yang terdapat pada dinding sel bakteri, adanya kualitas imunogenik yang kurang pada glukosa β -1-3 (β -D-glucan) yang merupakan membran luar dari polisakarida dapat digunakan oleh bakteri untuk menghindari dari sistem imun *host* (Berkhoff dan Vinal 1985). Widagdo *et al.* (2002) menyatakan bahwa tingkat patogenesitas isolat *E. coli* berhubungan dengan kemampuannya dalam mengikat warna *congo red*. Hal ini terlihat dari angka kematian dari embrio pasca inokulasi dengan *E. coli* positif *congo red*. Beberapa penelitian terdahulu juga menunjukkan adanya korelasi yang positif antara kemampuan mengikat warna *congo red* dan tingkat patogenesitas *E. coli* (Berkhoff dan Vinal 1985, Gjessing KM dan Berkhoff 1988, Panigraphy dan Ling 1990).

Bakteri *E. coli* juga sering digunakan sebagai indikator dalam program

monitoring dan surveilans adanya resistansi antimikroba (OIE 2016). Selain itu, data monitoring resistansi pada *E. coli* dapat digunakan sebagai sumber informasi mengenai potensi penyebaran gen resistan yang dapat ditransfer ke bakteri yang lainnya. *Escherichia coli* mempunyai kemampuan untuk membuat dan menyebarkan sifat resistansinya ke bakteri patogen lainnya serta mengubah material genetik dari bakteri lainnya seperti *Salmonella*, *Shigella*, *Yersenia*, dan *Vibrio* (Okeke *et al.* 2000). Hasil penelitian Nurhidayah *et al.* (2021) menunjukkan dari 327 isolat *E. coli* sebanyak 166 isolat (50,26%) resistan terhadap siprofloksasin. Isolat yang digunakan untuk pengujian resistansi Nurhidayah *et al.* (2021) merupakan isolat sama dengan yang digunakan dalam penelitian ini. Dari 166 isolat *E. coli* yang resistan terhadap siprofloksasin, sebanyak 25 (15,06%) adalah *E. coli* patogen. Adanya *E. coli* patogen yang resistan siprofloksasin ini cukup tinggi yaitu sebesar 42,37% (25/59), hasil ini memberikan informasi yang cukup penting baik mengenai risiko bahaya dan keterpaparan *E. coli* patogen resistan siprofloksasin.

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil pengujian patogenesitas isolat *E. coli* dari sampel usap kloaka ayam layer menunjukkan bahwa 59 (18,04%) isolat adalah *E. coli* patogen dan 268 (81,96%) isolat adalah *E. coli non* patogen. Media *congo red* dapat digunakan untuk membedakan isolat *E. coli* yang bersifat patogen dan non patogen. *E. coli* patogen yang resistan siprofloksasin 42,37% (25/59). Berkenaan hasil ini maka sangat disarankan agar peternak meningkatkan biosekuriti kandang ayam petelur. Selain itu, dalam penggunaan antibiotik dalam menangani infeksi bakteri, harus dilakukan secara bijak

dan berdasarkan resep dokter hewan. Hal ini sangat penting untuk mengurangi laju resistansi antimikroba pada peternakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Berkhoff HA dan Vinal AC. 1985. Congo red medium to distinguish between invasive and non invasive *Escherichia coli* pathogenic for poultry. *Avian Disease*. 30(1): 117-121
- [DJPKH] Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2019. Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan. Kementerian Pertanian. Jakarta
- Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp S dan Wieler LH. 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary Microbiology* (104): 91-101
- [FAO] Food and Agriculture Organisation of the United Nations. 2019. Monitoring and surveillance of antimicrobial resistance in bacteria from healthy food animals intended for consumption. Regional Antimicrobial Resistance Monitoring and Surveillance Guidelines-Volume 1. Bangkok
- Gjessing KM dan Berkhoff HA. 1988. Experimental reproduction of airsacculitis and septicemia by aerosol exposure of 1-day-old chicks using congo red positive *Escherichia coli*. *Avian Diseases* 30(6):473-478
- Lan Y, Vetergen MWA, Tamminga S, Willi BA. 2005. The role of the commensal gut microbial communit in broiler chickens. *World Poult Science Journal* (61): 95-104
- Lay BW dan Hastowo S. 1992. Mikrobiologi. Edisi Pertama. Rajawali Pers. Jakarta.
- Nurhidayah, Palupi MF, Ariyani N, Indriyana, Nugraha E, Widyarimbi D. 2021. Kepekaan isolat *Escherichia coli* terhadap siprofloksasin dari usap kloaka ayam layer. *Buletin BBPMSOH* 30: 10-16
- [OIE] World Organization for Animal Health. (FR). 2016. Terrestrial Animal Health Code Ed.25th. OIE. Paris, France Chapter 6.7-6.8
- Okeke IR, Lamikanra A, Steinruck H, Kaper JB. 2000. Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial Southwestern Nigeria. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(1):7-12
- Palupi MF, Nugraha E, Hayati M, Atikah N. 2020. Evaluasi nilai konsentrasi hambat minimum siprofloksasin terhadap isolat *E. coli* dari usap kloaka broiler. *Prosiding Penyidikan Penyakit Hewan Rapat Teknis dan Pertemuan Ilmiah (Ratekpil) dan Surveilans Kesehatan Hewan Tahun 2020*. Hal:414-422
- Panigraphy P, Ling Y. 1990. Differentiation of pathogenic and non pathogenic *E. coli* isolated from poultry. *Avian Disease* 34 (4): 941 – 943
- Rahayu, WP, Nurjanah S, dan Komalasari S. 2018. *Escherichia coli*: Patogenesitas, Analisis dan Kajian Risiko. IPB Press. Bogor
- Tarmudji. 2003. Kolibasilosis Pada Ayam: Etiologi, Patologi dan Pengendaliannya. *Wartazoa*. Vol.13. No.2
- Widagdo SN, Wibowo H, Asmara W. 2002. Patogenesitas isolat *Escherichia coli* positif congo red p ada telur ayam berembrio umur 12 hari. *Jurnal Sain Veteriner* Vol XX no 1
- Yang X, Wang H. 2014. Pathogenic *E. coli*. Lacombe Research Centre. Lacombe Canada