

**DETEKSI BAKTERI *Escherichia coli* O157:H7
PADA SAMPEL AIR DI LINGKUNGAN
UIN SUNAN AMPEL SURABAYA
MENGGUNAKAN METODE MULTIPLEX PCR**

SKRIPSI



**OLEH:
KHOIRUN NIHAYATI
H91214029**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
JURUSAN SAINS
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL**

**SURABAYA
2018**

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Khoirun Nihayati
NIM : H91214029
Program Studi : Biologi
Angkatan : 2014

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul:

Deteksi Bakteri *Escherichia coli* O157:H7 Pada Sampel Air Di Lingkungan UIN Sunan Ampel Surabaya Menggunakan Metode Multiplex PCR.

Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 31 Juli 2018



Khoirun Nihayati

PERSETUJUAN PEMBIMBING

Setelah memeriksa dan memberikan arahan terhadap skripsi yang ditulis oleh:

Nama : Khoirun Nihayati

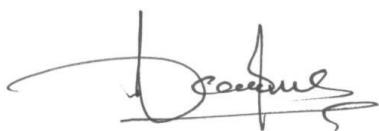
NIM : H91214029

Program Studi : Biologi

yang berjudul: "**Deteksi Bakteri *Escherichia coli* O157:H7 Pada Sampel Air Di Lingkungan UIN Sunan Ampel Surabaya Menggunakan Metode Multiplex PCR**", Tim Pembimbing berpendapat bahwa skripsi tersebut dapat diajukan untuk disidangkan.

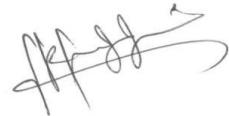
Surabaya, 6 Juli 2018

Pembimbing I



Yuanita Rachmawati, M. Sc.
NUP. 201603302

Pembimbing II



Saiku Rokhim, M. KKK.
NIP. 198612212014031001

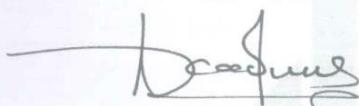
**DETEKSI BAKTERI *Escherichia Coli* O157:H7 PADA SAMPEL AIR DI
LINGKUNGAN UIN SUNAN AMPEL SURABAYA MENGGUNAKAN
METODE MULTIPLEX PCR**

Disusun oleh
Khoirun Nihayati
H91214029

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
Pada tanggal 17 Juli 2018
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat
untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains (S. Si)

Susunan Dewan Penguji

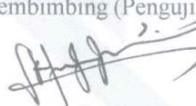
Surabaya, 31 JULI 2018
Pembimbing (Penguji) I


Yuanita Rachmawati, M. Sc.
NUP. 201603302

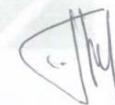
Surabaya, 25 JULI 2018
Penguji III


Linda Prasetyaning W., M. Kes.
NIP.198704172014032003

Surabaya, 25 JULI 2018
Pembimbing (Penguji) II


Saiku Rokhim, M. KKK.
NIP. 198612212014031001

Surabaya, 25 JULI 2018
Penguji IV


Dr. dr. Hj. Siti Nur Asiyah, M. Ag.
NIP. 197209271996032002





**KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
PERPUSTAKAAN**

Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300
E-Mail: perpus@uinsby.ac.id

**LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : KHOIRUN NIHAYATI
NIM : H91214029
Fakultas/Jurusan : SAINS DAN TEKNOLOGI / BIOLOGI
E-mail address : khoirun.nihayati15@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :

Sekripsi Tesis Desertasi Lain-lain (.....)
yang berjudul :

DETEKSI BAKTERI *Escherichia coli* O157: H7 PADA SAMPEL AIR
DI LINGKUNGAN UIN SUNAN AMPEL SURABAYA MENGGUNAKAN
METODE MULTIPLEX PCR

berserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Ekslusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara **fulltext** untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 02 Agustus 2018

Penulis

(**KHOIRUN NIHAYATI**)
nama terang dan tanda tangan

DETEKSI BAKTERI *Escherichia coli* O157:H7 PADA SAMPEL AIR DI LINGKUNGAN UIN SUNAN AMPEL SURABAYA MENGGUNAKAN METODE MULTIPLEX PCR

ABSTRAK

Diare merupakan penyakit yang berpotensi menyebabkan Kejadian Luar Biasa (KLB) dan sering disertai dengan kematian. Umumnya penyebab diare yaitu infeksi oleh mikroorganisme. Mikroorganisme tersebut umumnya menginfeksi saluran pencernaan manusia melalui makanan dan air yang telah tercemar (*food or water borne disease*). UIN Sunan Ampel Surabaya merupakan Universitas dalam tahap menuju *eco-campus*. *Eco-campus* identik dengan lingkungan kampus yang hijau, asri, bersih, termasuk kebersihan air. Salah satu bakteri penyebab diare yaitu *Escherichia coli*. *Enterohaemorrhagic E. coli* (EHEC) merupakan strain bakteri *E. coli* yang paling berbahaya karena memproduksi *Shiga like toxin*, yang menyebabkan penyakit *Haemorrhagic Colitis* (HC) dan *Haemolytic Uremic Syndrom* (HUS). Kontaminasi makanan dan air telah teridentifikasi sebagai sumber yang potensial dari penyebaran patogenitas EHEC pada manusia.

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi bakteri *Escherichia coli* O157:H7 pada sampel air di lingkungan UIN Sunan Ampel Surabaya menggunakan metode multiplex PCR dengan menggunakan beberapa primer spesifik terhadap gen target dalam satu reaksi. Gen-gen tersebut diantaranya *fliCh7*, *rfbE*, *stx1*, *stx2*, *eaeA* dan *hly*. Amplifikasi dilakukan selama 35 siklus, pada predenaturasi 94°C-2 menit, denaturasi 94°C-20 detik, annealing 63°C-1 menit, dan extension 72°C-1 menit, dan post-extension 72°C-10 menit, dilanjutkan elektroforesis gel agarosa 2% dan visualisasi menggunakan *gel documentation*. Dari hasil pengujian, 30 sampel positif bakteri *coliform*, 28 sampel positif bakteri *Escherichia coli* dan 12 sampel positif terhadap *E. coli* O157:H7. Sampel yang positif terhadap *E. coli* O157:H7 memiliki gen virulen yang berbeda-beda diantaranya *stx1*, *fliCh7*, *eaeA*, dan *rfbE*. Perlu dilakukan analisis dari semua sistem pengairan untuk menentukan masuknya kontaminasi *coliform*, *E. coli* dan *E. coli* O157:H7.

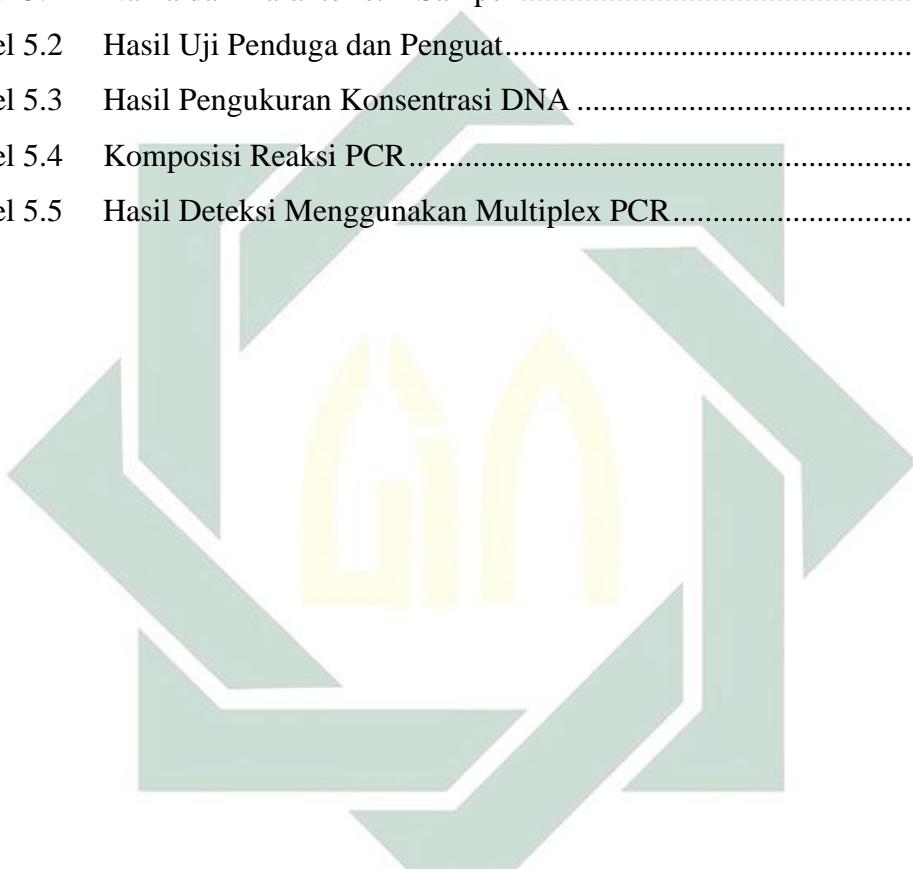
Kata kunci: Diare, *Escherichia coli* O157:H7, Multiplex PCR.

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
ABSTRAK	x
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	8
C. Tujuan Penelitian	8
D. Batasan Penelitian	8
E. Manfaat Penelitian	9
BAB II KAJIAN PUSTAKA	
A. <i>Escherichia Coli</i>	10
B. Deteksi <i>Escherichia Coli</i> O157:H7	15
1. Mikrobiologi	15
2. Molekular.....	16
a. Isolasi DNA.....	16
b. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	17
c. Multiplex PCR	25
d. Elektroforesis	26
e. Gel Documentation	28
BAB III KERANGKA TEORI DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
A. Kerangka Konsep	29
B. Hipotesis Penelitian	30
BAB IV METODE PENELITIAN	
A. Jenis Penelitian	31
B. Waktu dan Lokasi Penelitian	31
C. Bahan dan Alat Penelitian	32
D. Prosedur Penelitian	33
E. Prosedur Operasional	37
F. Analisis Penelitian	39
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Pengambilan Sampel	41
B. Isolasi Bakteri <i>Escherichia Coli</i>	44
C. Hasil Pengujian Kuantitatif DNA.....	48
D. Hasil Pengujian Kualitatif DNA.....	52
BAB VI PENUTUP	
A. Simpulan.....	63
B. Saran	63
DAFTAR PUSTAKA	65
LAMPIRAN	73

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	<i>Timeline Penelitian.....</i>	31
Tabel 4.2	Macam-macam Primer Multiplex PCR.....	35
Tabel 4.3	Komposisi Pereaksi Multiplex PCR	35
Tabel 5.1	Nama dan Karakteristik Sampel	41
Tabel 5.2	Hasil Uji Penduga dan Penguat.....	47
Tabel 5.3	Hasil Pengukuran Konsentrasi DNA	49
Tabel 5.4	Komposisi Reaksi PCR	52
Tabel 5.5	Hasil Deteksi Menggunakan Multiplex PCR.....	56

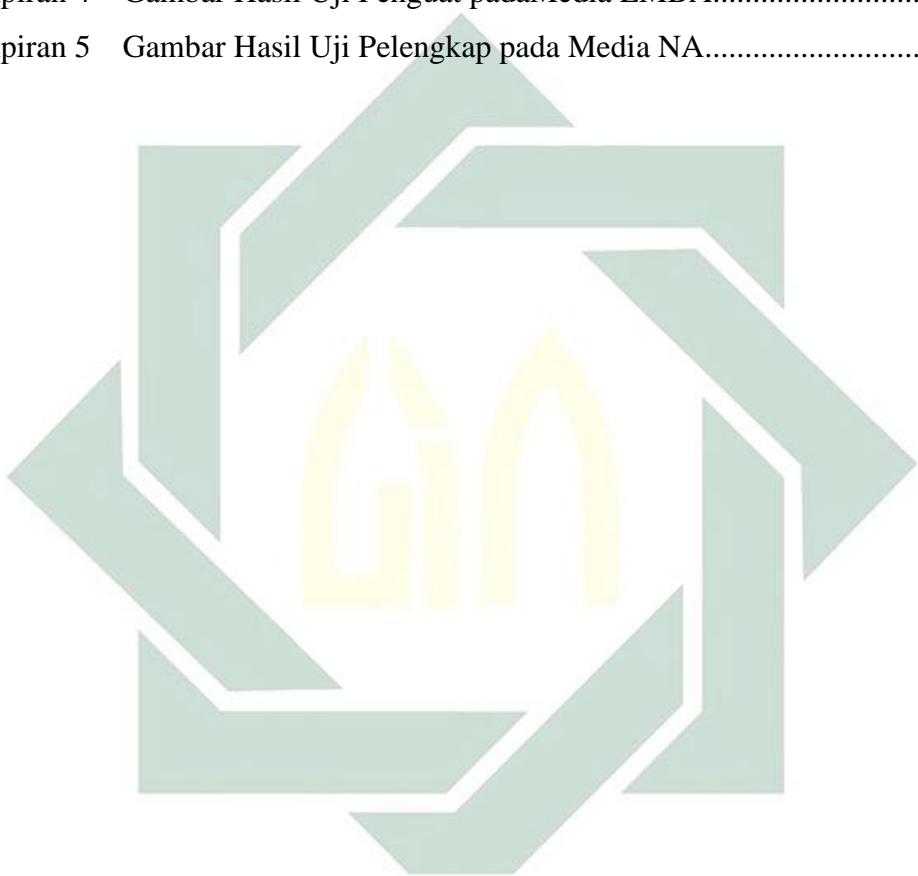


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Denaturasi	23
Gambar 2.2	Annealing	24
Gambar 2.3	Elongation	24
Gambar 3.1	Kerangka Konsep	29
Gambar 4.1	Prosedur Operasional Isolasi Bakteri <i>Escherichia coli</i>	37
Gambar 4.2	Prosedur Operasional Isolasi DNA Metode <i>Boiling Cell</i>	38
Gambar 4.3	Prosedur Operasional Multiplex PCR	39
Gambar 5.1	Pengambilan Sampel	43
Gambar 5.2	Hasil Uji Penduga (<i>Presumptive Test</i>)	45
Gambar 5.3	Hasil Uji Penguat (<i>Confirmed Test</i>)	46
Gambar 5.4	Hasil Uji Pelengkap (<i>Completed Test</i>)	46
Gambar 5.5	Diagram Hasil Pengukuran Konsentrasi & Kemurnian DNA	51
Gambar 5.6	Hasil Elektroforesis Sampel Nomor 2-11	53
Gambar 5.7	Hasil Elektroforesis Sampel Nomor 12-22	54
Gambar 5.8	Hasil Elektroforesis Sampel Nomor 23-30	55
Gambar 5.9	Skema Infeksi EHEC pada Manusia	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Proses Pengambilan Sampel.....	74
Lampiran 2	Foto Sampel.....	75
Lampiran 3	Gambar Hasil Uji Penduga pada Media LB	76
Lampiran 4	Gambar Hasil Uji Penguat padaMedia EMBA.....	77
Lampiran 5	Gambar Hasil Uji Pelengkap pada Media NA.....	80



BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Diare merupakan penyakit yang dicirikan dengan buang air besar (defekasi) dengan feses dalam bentuk cair, kandungan air pada feses lebih banyak yaitu lebih dari 200 g atau 200 ml/24 jam. Pengertian lain menyebutkan bahwa diare adalah buang air besar dalam bentuk encer yang terjadi lebih dari 3 kali per hari, dapat atau tidak disertai lendir dan darah (Ciesla *et al.*, 2003; Guerrant *et al.*, 2001). Umumnya diare disebabkan karena adanya infeksi maupun non infeksi, akan tetapi penyebab utama penyakit diare yaitu karena adanya infeksi mikroorganisme seperti bakteri, parasit dan virus yang menginfeksi saluran pencernaan manusia melalui makanan dan air yang terkontaminasi (*food or water borne disease*) (Lung, 2003).

Berdasarkan gejala klinisnya, diare dibedakan menjadi 3. Pertama, yaitu diare cair akut yang dapat menyebabkan penderita kehilangan cairan tubuh dalam jumlah yang banyak (dehidrasi) dalam waktu cepat. Kedua, adalah diare akut berdarah (disentri) yang ditandai dengan adanya darah pada feses yang disebabkan oleh kerusakan pada dinding usus. Akibatnya, penderita akan kehilangan banyak zat gizi. Jenis yang ketiga yaitu diare persisten ditandai dengan diare secara terus menerus dan dapat berlangsung ≥ 14 hari. Diare persisten umumnya terjadi pada orang dengan status gizi rendah,

penderita AIDS, dan orang yang sedang mengalami infeksi (WHO, 2010). *Escherichia coli*, *Shigella dysentriiae*, *Campylobacter*, *Salmonella* dan *Vibrio cholera* merupakan beberapa bakteri patogen yang dapat menyebabkan diare. Di Indonesia kasus infeksi oleh bakteri yang menyebabkan diare banyak sekali dilaporkan. Data statistika menunjukkan terjadinya 300 kasus diare per 1000 penduduk Indonesia setiap tahunnya (Suardana, 2005).

Diare merupakan penyakit endemis di Indonesia dan juga merupakan penyakit yang berpotensi dapat menyebabkan Kejadian Luar Biasa (KLB) yang sering disertai dengan kematian. Menurut data hasil survei morbiditas yang dilakukan oleh Kementerian Kesehatan RI dari tahun 2000 sampai 2010 menemukan kecenderungan peningkatan insiden diare. Pada tahun 2000, *Incidence Rate* (IR) penyakit diare 301/1000 penduduk, sedangkan pada tahun 2003 naik menjadi 374/1000 penduduk, pada tahun 2006 mengalami kenaikan kembali menjadi 423/1000 penduduk dan pada tahun 2010 menjadi 411/1000 penduduk. Kejadian Luar Biasa (KLB) diare juga masih sering terjadi, dengan angka kematian yang masih tinggi. Pada tahun 2008 terjadi KLB di 69 Kecamatan dengan jumlah kasus 8133 orang, kematian 239 orang *Case Fatality Rate* (CFR 2.94%). Tahun 2009 terjadi KLB di 24 Kecamatan dengan jumlah kasus 5756 orang, dengan kematian 100 orang (CFR 1.74%), sedangkan tahun 2010 terjadi KLB diare di 33 Kecamatan dengan jumlah penderita 4204 orang dengan kematian 73 orang (CFR 1.74%) (Kemenkes RI, 2011). Pada tahun 2015 terjadi 18 kali KLB diare yang tersebar di 11 Provinsi, 18 kabupaten/kota, dengan jumlah pederita 1.213 orang (Kemenkes

RI, 2016). Pada tahun 2014 di Kota Surabaya ditemukan sebanyak 86.893 kasus diare dari 60.601 perkiraan kasus yang ada atau sebesar 143,39% (Tim Penyusun Profil DinKes Kota Surabaya, 2014). Sedangkan pada tahun 2015 penyakit yang ditangani Kota Surabaya sebanyak 65.447 kasus dari 60.960 perkiraan kasus yang ada atau sebesar 107,36% (Tim Penyusun Profil Dinas Kesehatan Kota Surabaya, 2015). Dari data tersebut diketahui prevalensi kejadian diare di Kota Surabaya pada tahun 2014-2015 sedikit menurun, akan tetapi kasus yang terjadi pada tahun 2015 masih melebihi perkiraan kasus. Sedangkan data yang diperoleh dari rumah sakit yang terletak disekitar kampus UIN Sunan Ampel Surabaya tepatnya Rumah Sakit Islam Jemursari diperoleh data jumlah penderita penyakit diare pada tahun 2014 sebanyak 508 kasus dengan diare berdarah sebanyak 9 kasus, pada tahun 2015 sebanyak 918 kasus dengan diare berdarah 14 kasus, pada tahun 2016 sebanyak 721 kasus dengan diare berdarah 2 kasus, dan pada tahun 2017 sampai dengan Bulan Oktober sebanyak 320 kasus dengan diare berdarah 2 kasus (Data Rekam Medis RSI Jemursari, 2014-2017). Hal tersebut perlu mendapatkan perhatian agar kejadian diare terutama di Kota Surabaya tidak kembali meningkat.

Salah satu penyebab penyakit diare yaitu bakteri *Escherichia coli*. *Escherichia coli* pertama kali diisolasi pada tahun 1885 dari feses anak-anak oleh Bakteriologis Jerman Theodor Escherichia. Bakteri tersebut merupakan flora normal yang terdapat dalam saluran pencernaan manusia, dan walaupun umumnya tidak berbahaya, *E. coli* dapat menyebabkan sejumlah infeksi

seperti sepsis Gram-negatif, infeksi saluran kencing, pneumonia pada pasien *immunocompromised* dan meningitis. Strain *E. coli* pertama kali dikenal sebagai penyebab enteritis dari pekerja di Inggris pada awal tahun 1940-an (Adam dan Moss 1995). Sampai tahun 1982, tiga strain utama telah diketahui yaitu, *enteropathogenic E. coli* (EPEC), *enteroinvasive E. coli* (EIEC) dan *enterotoxigenic E. coli* (ETEC). Pada tahun 1982, *E. coli* serotype O157:H7 terlibat dalam dua kejadian yaitu *Haemorrhagic Colitis* (HC) dan *Haemolytic Uremic Syndrome* (HUS). Organisme ini dikelompokkan dalam *verocytotoxigenic E. coli* (VTEC) atau *enterohaemorrhagic E. coli* (EHEC). Sifat patogen dari EHEC/VTEC berasal dari toksin yang diproduksinya yaitu *Shiga-like Toxin*.

EHEC adalah bakteri yang memproduksi *Shiga like toxin* yang dikode oleh gen *eae* (Nataro and Kaper 1998). Toksin tersebut dapat menyebabkan penyakit *Haemorrhagic Colitis* (HC) dan *Haemolitic Uremic Syndrom* (HUS) (Karmali *et. al.*, 1983; Riley *et. al.*, 1983). Faktor virulen utama EHEC adalah *Shiga toxin* (Stx) yang terdiri dari dua tipe utama yaitu Stx1 dan Stx2. Stx1 dan Stx2 dikode oleh masing-masing gen *stx1* dan *stx2* (Griffin, 1995). Isolat EHEC mungkin memproduksi salah satu gen *stx1* atau *stx2* atau bahkan memproduksi keduanya. Telah diketahui bahwa Stx1 1000 kali lebih bersifat sitotoksik daripada Stx2 pada sel endotelial ginjal manusia (Louise and Obrig, 1995). Jauh sebelum dilakukannya penelitian mengenai penyebab diare yang berupa mikroorganisme Allah SWT terlebih dahulu

menyebutkannya dalam kitab suci Al-Qur'an dalam Surat Al-Baqarah ayat 26 sebagai berikut :

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَا بَعْوَضَهُ فَمَا فَوْقَهَا فَإِنَّمَا الَّذِينَ آمَنُوا قَيْعَلَمُونَ أَنَّهُ
الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي
بِهِ كَثِيرًا وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ

Artinya :

“Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih kecil dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka. Dan adapun mereka yang kafir mengatakan: “Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan?” dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah, dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. Dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik (QS. Al-Baqarah: 26).”

Kontaminasi makanan dan air telah teridentifikasi sebagai sumber yang potensial dari penyebaran patogenitas EHEC O157 pada manusia (Tutenel *et al.*, 2003). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia mengimbau masyarakat agar waspada terhadap penyakit yang disebabkan bakteri *E. coli*. Sebab, menurut dari data Kementerian Kesehatan, wabah penyakit ini sebenarnya mulai terjadi di Jerman pada pertengahan Mei 2011. Sampai 2 Juni 2011, Jerman menemukan 520 kasus *haemolytic uraemic syndrome* (HUS) dengan 11 kematian. Terdapat 1.213 kasus *enterohaemorrhagic Escherichia coli* (EHEC), 6 diantaranya meninggal. Artinya, di Jerman terdapat 1.733 kasus dan 17 kematian (Zakki, 2015). Kasus infeksi *E. coli* O157:H7 banyak dilaporkan terjadi di negara maju seperti Amerika Serikat dan Jepang, tetapi data untuk kasus yang terjadi di Indonesia sangat sedikit. Hal tersebut disebabkan karena belum tersedianya media selektif untuk isolasi bakteri patogen ini (Aziz *et al.*, 2009). Hill dan Jinneman (2000) memaparkan

bahwa, untuk tujuan kajian epidemiologi suatu agen zoonosis sebaiknya digunakan aplikasi teknik genetik karena data yang dihasilkan memiliki keakuratan yang sangat tinggi. Salah satu metode molekular yang dapat digunakan yaitu dengan metode multiplex PCR. Metode ini menggunakan berbagai macam primer untuk menghasilkan amplikon dari berbagai ukuran yang spesifik untuk sekuen DNA yang berbeda dalam satu kali *running-test*.

Universitas Islam Negeri Sunan Ampel merupakan universitas dalam tahap menuju *eco-campus*. *Eco-campus* sendiri identik dengan lingkungan kampus yang hijau, asri, dan bersih (Lakswendra, 2013). Tentunya kebersihan lingkungan tersebut juga mencakup kebersihan air. Seperti yang kita ketahui air merupakan komponen abiotik yang sangat penting bagi kehidupan manusia. Air merupakan sumber kehidupan manusia dan makhluk hidup lainnya. Tanpa adanya air, mustahil terdapat kehidupan dimuka bumi ini. Seperti firman Allah SWT sebagai berikut:

أَوْلَمْ يَرَ الَّذِينَ كَفَرُوا أَنَّ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضَ كَانَتَا رَتْقًا فَفَنَقْنَا هُمَا مُطْهَى وَجَعَلْنَا مِنَ
الْمَاءِ كُلَّ شَيْءٍ حَتَّىٰ أَفَلَا يُؤْمِنُونَ

Artinya :

“Dan apakah orang-orang yang kafir tidak mengetahui bahwasanya langit dan bumi itu keduanya dahulu adalah suatu yang padu, kemudian Kami pisahkan antara keduanya. Dan dari air Kami jadikan segala sesuatu yang hidup. Maka mengapakah mereka tiada juga beriman?” (Al-Anbiya: 30)

Secara transparan dalam ayat tersebut Allah menyebut air sebagai sumber kehidupan. Tidak hanya ketersediaan air saja yang dibutuhkan makhluk hidup terutama manusia untuk kelangsungan hidupnya, akan tetapi kebersihan air merupakan hal yang sangat penting. Masalah utama yang dihadapi dalam

pengolahan air yaitu semakin tingginya tingkat pencemaran air yang berasal dari limbah rumah tangga maupun limbah industri. Air sangat potensial dalam penyebaran berbagai penyakit, contohnya air yang terkontaminasi oleh patogen dan diminum oleh manusia dapat menyebabkan penyakit (*water born disease*). Tidak hanya itu, air yang tercemar terutama sampai mengalami perubahan bau, warna dan rasa jelas tidak dapat digunakan untuk kebutuhan sehari-hari terutama bersuci. Seperti djelaskan dalam hadist yang diriwayatkan oleh Al-Baihaqi dalam Kitab *Bulughul Maram* karangan Al-Asqalany (2008) sebagai berikut:

وَلِلْبَيْهَقِيِّ الْمَاءُ طَهُورٌ إِلَّا إِنْ تَغْيِيرَ رِيحَهُ أَوْ طَعْمَهُ أَوْ لَوْنَهُ بِنَجَاسَةٍ تَحْدُثُ فِيهِ

Artinya:

“Air itu suci mensucikan kecuali jika ia berubah baunya, rasanya atau warnanya dengan suatu najis yang masuk di dalamnya (HR. Al-Baihaqi)”.

Oleh karena itu perlu untuk dilakukan penelitian mengenai deteksi bakteri EHEC pada sampel air secara molekular menggunakan metode multiplex PCR terutama di lingkungan UIN Sunan Ampel Surabaya. Penggunaan metode secara molekular dilakukan karena dapat mendeteksi suatu organisme lebih spesifik yaitu dengan menggunakan DNA, selain itu waktu yang digunakan untuk pengujian secara molekular lebih singkat jika dibandingkan dengan pengujian secara mikrobiologi dan biokimia.

B. Rumusan Masalah

1. Bagaimana hasil deteksi bakteri *Escherichia coli* O157:H7 pada sampel air di lingkungan UIN Sunan Ampel Surabaya?
2. Bagaimana ekspresi gen toksin pada sampel yang positif terhadap bakteri *Escherichia coli* O157:H7?

C. Tujuan Penelitian

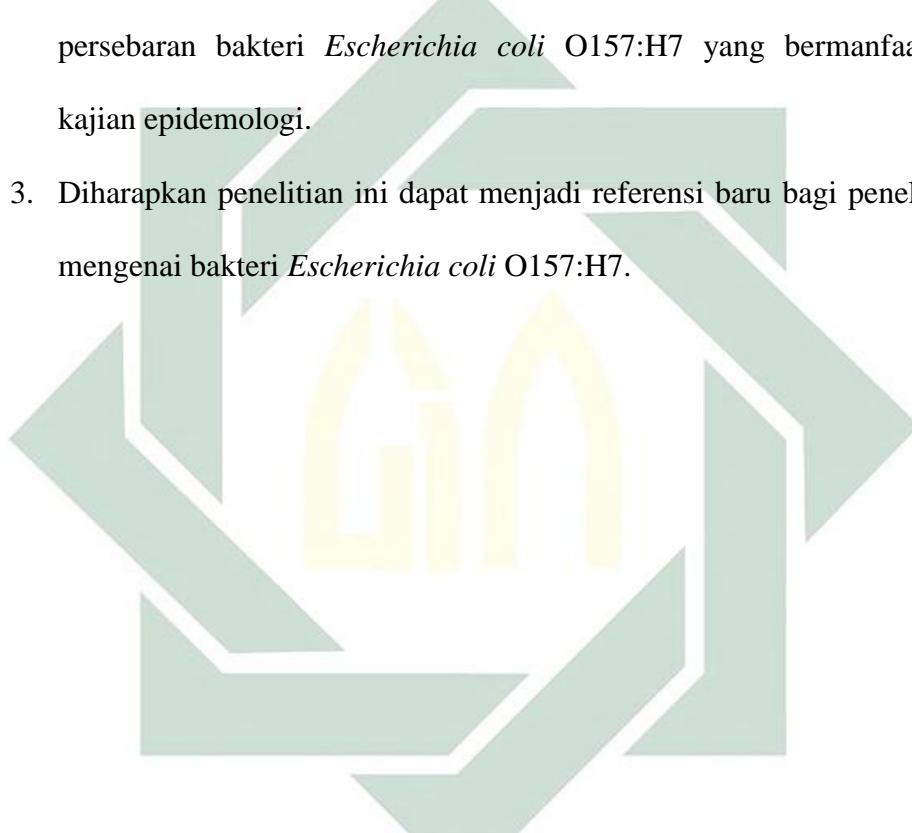
1. Mendeteksi adanya bakteri *Escherichia coli* O157:H7 pada sampel air di lingkungan UIN Sunan Ampel Surabaya menggunakan metode multiplex PCR.
2. Mengetahui ekspresi gen toksin pada sampel yang positif terhadap bakteri *Escherichia coli* O157:H7.

D. Batasan Penelitian

1. Sampel air yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari lingkungan UIN Sunan Ampel Surabaya yang meliputi air selokan, air pada bak mandi, dan air sumber konsumsi.
2. Penelitian ini difokuskan untuk mendeteksi adanya bakteri *Escherichia coli* O157:H7 secara molekular dengan menggunakan beberapa primer yang spesifik terhadap gen target. Gen-gen tersebut diantaranya yaitu *fliCh7* (antigen flagellar), *rbf E* (antigen O157), *stx 1* (shiga toxin 1), *stx 2* (shiga toxin 2), *eae A* (intimin), dan *hly* (haemolysin).

E. Manfaat Penelitian

1. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat mencegah terjadinya kejadian luar biasa yang dapat disebabkan oleh *Escherichia coli* O157:H7 seperti diare berdarah.
 2. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat diketahui sejauh mana persebaran bakteri *Escherichia coli* O157:H7 yang bermanfaat bagi kajian epidemiologi.
 3. Diharapkan penelitian ini dapat menjadi referensi baru bagi peneliti lain mengenai bakteri *Escherichia coli* O157:H7.



BAB II

KAJIAN PUSTAKA

A. *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan mikroba flora normal di dalam saluran pencernaan manusia dan hewan berdarah panas yang bersifat fakultatif anaerob (Drasar dan Hill, 1974). *Escherichia coli* termasuk dalam Famili Enterobacteriaceae, Genus *Escherichia* yang mempunyai karakteristik berbentuk batang, mempunyai flagela, dan termasuk kedalam bakteri gram negatif (Cowan, 1984). Berdasarkan patogenitasnya, *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).

1. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

Kelompok EPEC merupakan penyebab utama diare pada bayi, khususnya yang terjadi di negara berkembang. EPEC melekat pada sel mukosa usus kecil. Akibatnya terjadi diare cair, umumnya sulit ditangani akan tetapi tidak termasuk kronis. EPEC merupakan penyebab diare pada wisatawan yang mengunjungi negara dengan standar higienitas makanan dan air minum lebih rendah dibandingkan negara asalnya. Selain itu EPEC juga merupakan penyebab utama diare pada bayi di negara berkembang (Brooks *et al.*, 2005).

2. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)

Kelompok ETEC merupakan penyebab diare enterotoksigenik pada mamalia, seperti anak sapi, anak babi, dan anak domba. Gejala klinis yang terjadi antara lain diare, dehidrasi, asidosis, bahkan kematian. Faktor virulensi yang digunakan untuk identifikasi ETEC adalah enterotoksin dan antigen pili (*fimbriae*). Enterotoksin ETEC berupa toksin tidak tahan panas (*heat-labile toxins/LT*) dan toksin tahan panas (*heat-stable toxins/ST*). ETEC dapat menghasilkan satu atau dua enterotoksin tergantung pada plasmid (Salyers dan Whitt 1994).

3. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

EIEC menyebabkan penyakit yang sangat mirip dengan shigellosis. Penyakit ini sering terjadi pada anak-anak di Negara berkembang dan para wisatawan yang menuju ke Negara tersebut. EIEC dapat memfermentasi laktosa dengan lambat dan bersifat non-motil. EIEC menyebabkan penyakit melalui invasi ke dalam sel epitel mukosa usus. Diare ini ditemukan hanya pada manusia (Pelczar , 1988).

4. Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)

EAEC telah ditemukan di berbagai negara di dunia. Transmisinya dapat melalui *food-borne* maupun *water-borne disease*. Patogenitas EAEC terjadi karena bakteri melekat pada bagian mukosa intestinal sehingga menimbulkan gangguan. Mekanisme terjadinya diare yang disebabkan oleh EAEC belum jelas diketahui, akan tetapi EAEC diperkirakan menghasilkan sitotoksin yang menyebabkan terjadinya diare.

EAEC menyebabkan diare berair pada anak-anak dan dapat berlanjut menjadi diare persisten (Pelczar,1988).

5. Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC)

EHEC memproduksi *verotoksin*. Nama toksin didasarkan pada efek sitotoksik pada *sel vero*, yang merupakan biakan sel ginjal monyet hijau di Afrika. EHEC banyak dihubungkan dengan *hemorrhagic colitis*, merupakan diare yang parah yang menyebabkan *hemolytic uremic syndrome*, yang merupakan penyakit akibat kegagalan ginjal akut. *E. coli* O157:H7 akhir-akhir ini diketahui merupakan bakteri patogen penyebab *foodborne disease*.

Diantara tipe patogenitas tersebut, EHEC diketahui memiliki efek paling patogen yang menyebabkan kasus kematian dari berbagai negara (Dundas *et al.*, 2001; Michino *et al.*, 1999; Rangel *et al.*, 2005; Siegler 1995). *Escherichia coli* O157:H7 adalah bagian dari kelompok *enterohemorrhagic E. coli* (EHEC). Bakteri patogen ini memproduksi verotoxin yang dapat menyebabkan *thrombotic thrombocytopenic purpura* (TTP), *hemorrhagic colitis* dan *hemolytic ureamic syndrom* (HUS) (Law, 2000). Penyakit ini terjadi akibat adanya *verotoxin* atau *shiga like toxin* yang dihasilkan *E. coli* O157:H7. Serotype ini sering disebut *verotoxigenic E. coli* (VTEC) yang bersifat ekstraseluler, neurotoksik, dan imunogenik. *E. coli* O157:H7 memiliki patogenitas yang ditentukan oleh kemampuannya untuk menghasilkan satu atau lebih sitotoksin yang sangat potensial yang dikenal dengan nama *shiga like toxin* atau *verotoxin*, di samping kemampuan bakteri

ini untuk melakukan penempelan dan perlekatan terutama pada sekum dan kolon (Krauss *et al.*, 2003; Barlow *et al.*, 2006). Toksin ini bekerja dengan cara menghilangkan satu basa adenin dari unit 28S rRNA, sehingga menghentikan sintesis protein. *E. coli* O157:H7 merupakan jenis *E. coli* yang patogen terhadap manusia dan banyak menyebabkan penyakit pada manusia (Perna *et al.*, 2001). *E. coli* O157:H7 memiliki ciri-ciri dengan kondisi lingkungan yang berbeda dengan *E. coli* lainnya, *E. coli* tersebut dapat bertahan hidup pada kondisi suhu yang rendah dan dalam kondisi asam. Hal ini tidak terjadi pada *E. coli* lain yang tidak dapat bertahan hidup pada kondisi suhu rendah dan dalam kondisi pH asam (Madigan *et al.*, 2009).

EHEC memproduksi *Shiga toxin* *E. coli* (STEC) yang dikode oleh gen *eae* (Nataro & Keper, 1998). Toksin tersebut dapat menyebabkan *Hemorrhagic Colitis* (HC) dan *Hemolytic Uremic Syndrom* (HUS) (Karmali *et al.*, 1983; Riley *et al.*, 1983). Umumnya faktor virulen EHEC adalah *Shiga toxin* (Stx) yang terdiri dari dua tipe utama, yaitu Stx1 dan Stx2. Stx1 dan Stx2 dikode oleh gen *stx1* dan *stx2* (Griffin, 1995). Pada isolat EHEC mungkin memproduksi Stx1 atau Stx2 atau keduanya, dan telah diketahui bahwa Stx1 1000 kali bersifat lebih *cytotoxic* daripada Stx2 pada sel endothelial ginjal manusia (Louise & Obrig, 1995). STEC atau EHEC merupakan flora *fecal* dari berbagai jenis hewan termasuk hewan ternak domba, kambing, babi dan ayam. Oleh karena itu daging merupakan sumber utama kontaminasi EHEC (Law, 2000).

Escherichia coli O157:H7 telah diketahui dapat menyebabkan sakit pada manusia (bersifat patogen). Penyakit *E. coli* O157:H7 pada manusia yaitu *hemorrhagic colitis* (HC), *hemolytic uremic syndrome* (HUS), dan *thrombotic thrombocytopenic purpura*. *Haemorrhagic colitis* memiliki gejala diare berdarah, kram perut, gagal ginjal, dan menyebabkan kematian mikroflora dalam usus dan berlanjut menjadi *haemolytic uraemic syndrome* yang dapat menyebabkan kerusakan sel darah merah, dan gagal ginjal, serta diare dengan feses yang mengeluarkan darah (pendarahan yang dapat berakibat fatal, bahkan menyebabkan kematian, khususnya pada anak-anak). Penyakit *thrombotic thrombocytopenic purpura* dapat menyebabkan *thrombocytopenia*, *anemia*, demam, kerusakan pencernaan, dan kerusakan saraf. Penyakit - penyakit ini umumnya disebakan oleh konsumsi daging maupun sayuran yang tidak masak. Daging maupun sayuran yang tidak masak ini merupakan habitat dari *E. coli* patogen (Perna *et al.*, 2001). *Haemolytic Uremic Syndrom* (HUS) didefinisikan sebagai 3 ciri utama yaitu kerusakan ginjal akut, *thrombocytopenia* dan *microangiopathic haemolytic anemia*, yang terjadi dalam 2-5% kasus (Carter *et al.*, 1987; Slustker *et al.*, 1997; Rowe *et al.*, 1998). Mortalitas yang disebabkan oleh HUS terbilang cukup tinggi yaitu 3-17% (Griffin, 1991) dan jumlahnya meningkat kurang lebih 30% pada orang yang menderita penyakit tersebut.

Infeksi *Escherichia coli* O157:H7 kebanyakan disebabkan dari makanan atau susu yang berasal dari peternakan, termasuk buah segar, sayur-sayuran dan air. Di Amerika, kejadian pertama dilaporkannya infeksi *Escherichia coli*

O157:H7 setelah meminum air yang terkontaminasi terjadi pada tahun 1989 di Desa Missouri. Sejak kejadian tersebut, enam kejadian selanjutnya berhubungan dengan meminum air yang terkontaminasi. Enam gen pada bakteri *Escherichia coli* O157:H7 umumnya digunakan sebagai target konfirmasi PCR yaitu *rfbE* (antigen O157), *eae* (intimin), *stx1* (Shiga toxin 1), *stx2* (Shiga toxin 2), *hlyA* (hemolysin) dan *fliC* (antigen flagellar) (Chapman, 2001). *Escherichia coli* O157:H7 dapat membentuk vero toksin dan faktor virulen tersebut dikode oleh gen *stx1* dan *stx2*. Gen *eaeA* mengkode intimin yang bertanggungjawab untuk *adherence* dalam patogenitasnya terhadap lapisan intestinal dan menyebabkan kerusakan usus (*intestine*). Sementara itu hemolysin dikode oleh gen *hlyA* (Boerling *et al.*, 1999), antigen O157 dikode oleh gen *rfbE* dan antigen flagellar dikode oleh gen *fliC* (Fleds *et al.*, 1997).

B. Deteksi *Escherichia coli* O157:H7

1. Mikrobiologi

Deteksi secara mikrobiologi biasa disebut dengan metode konvensional yaitu dengan menginokulasi, mengkultur dan menggunakan uji biokimia. Untuk deteksi bakteri *Escherichia coli* O157:H7 menggunakan media Sorbitol Mac Conkey agar (SMAC) yang mengandung garam empedu, sumber karbohidrat, sorbitol dan suatu indikator. Dalam kondisi yang normal, *Escherichia coli* O157:H7 tidak memfermentasi sorbitol, jika terdapat bakteri *Escherichia coli* O157:H7

maka koloni yang tampak tidak berwarna, sementara jika Enterobacteriaceae yang lain maka koloni akan tampak berwarna merah muda. Penelitian sebelumnya menemukan bahwa penggunaan media SMAC mempunyai tingkat akurasi dan sensitivitas yang tinggi terhadap bakteri *Escherichia coli* O157:H7 (March dan Ratnam, 1986). Akan tetapi kelemahan deteksi secara mikrobiologi yaitu waktu yang dibutuhkan relatif lama dalam proses pengujian.

2. Molekular

Biologi molekular yaitu pengujian yang dilakukan dengan mempelajari aktivitas biologi pada level molekular, termasuk interaksi antara perbedaan tipe DNA, RNA, protein, dan biosintesisnya (Arie, I. W., 2015). Berikut ini langkah-langkah dilakukan pada pengujian secara molekular:

a. Isolasi DNA

Isolasi DNA adalah serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen sel lainnya. Umumnya DNA (*Deoxyribonucleid Acid*) terdapat di dalam inti sel, dan beberapa organel lain di dalam sel seperti mitokondria (DNA mitokondria) dan kloroplas. Prinsip isolasi DNA terdapat 3 tahap yaitu proses penghancuran dinding sel (*lysis of cell wall*), penghilangan protein dan RNA (*cell digestion*), pengendapan DNA (*precipitation of DNA*) (Sulandari, S. dan Arifin, M.S.Z., 2003). Kemurnian DNA hasil isolasi ditentukan dengan tidak adanya kontaminan seperti RNA, protein, lipid, dan debris sel

lainnya. Hal yang perlu di perhatikan dalam proses isolasi DNA yaitu, harus terbebas dari enzim DNA nuklease yang dapat merusak DNA yang akan diisolasi (Merante *et al.*, 1998).

Metode yang digunakan untuk melisiskan sel umumnya menggunakan buffer yang mengandung satu atau lebih jenis detergen, seperti SDS (B), NP-40, atau Triton X-100. Setelah sel mengalami *lysis*, residu dari protein dan lipid dihilangkan dengan menggunakan larutan fenol dan kloroform. Selanjutnya, Isoamil alkohol digunakan untuk memisahkan fase air dan fase organik. Dengan perbandingan masing-masing fenol, kloroform, dan isoamyl alkohol sebesar 25;24;1 (Burden dan Whithney, 1995).

Teknik isolasi telah dikembangkan dengan berbagai metode dengan tetap berpegang pada 3 prinsip diatas, sehingga saat ini muncul teknik isolasi DNA dalam bentuk kit.

b. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

PCR merupakan suatu metode yang digunakan untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan mensintesis molekul DNA baru yang komplementer melalui bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu alat yang disebut *thermocycler*. Dengan kata lain, PCR merupakan teknik yang mampu menggandakan (mengamplifikasi) DNA secara *in vitro* dengan bantuan enzim *DNA polymerase* dan beberapa bahan pokok lainnya dalam waktu singkat. Teknik tersebut ditemukan oleh ilmuan bernama

Kary Mullis pada tahun 1985 (Muladno, 2010). Berkat karyanya tersebut, Kary Mullis mendapatkan penghargaan Nobel dalam bidang Kimia pada tahun 1993.

1) Komponen PCR

Beberapa komponen penting yang dibutuhkan dalam reaksi PCR adalah DNA *template*, sepasang primer oligonukleotida, DNA *polymerase*, deoksinukleosida trifosfat (dNTPs), dan larutan buffer (Yusuf, 2010; Muladno, 2010; Sulistyaningsih, 2007).

a) DNA Template

DNA *template* merupakan molekul DNA yang mengandung sequen target yang akan diamplifikasi (DNA cetakan). Ukuran DNA bukanlah faktor utama dalam penentu keberhasilan proses PCR, yang terpenting adalah DNA *template* harus mengandung sequen target yang akan diamplifikasi (Sulistyaningsih, 2007).

DNA *template* yang digunakan umumnya berukuran 105-106 molekul. Dua hal penting tentang DNA *template* yaitu kemurnian dan konsentrasi DNA (Yusuf, 2010). Jika konsentrasi DNA terlalu rendah besar kemungkinan primer tidak dapat menemukan target, sedangkan jika konsentrasi DNA terlalu tinggi dapat menyebabkan kemungkinan terjadinya *mispriming*. Selain itu kemurnian DNA *template*

harus diperhatikan karena dapat mempengaruhi hasil reaksi (Sulistyaningsih, 2007).

b) Primer

Salah satu komponen dalam metode PCR yang sangat penting yaitu primer oligonukleotida (*amplifiers*). Primer DNA adalah suatu sekuens oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA (Yusuf, 2010). Primer yang berada sebelum daerah target disebut primer *forward* dan primer yang berada setelah daerah target disebut primer *reverse*. Susunan primer menentukan keberhasilan proses PCR. Pasangan primer terdiri dari 2 oligonukleotida yang mengandung 18-28 oligonukleotida dan mempunyai 45-60% GC *content* yang digunakan untuk mengawali sintesis DNA (Yusuf, 2010). Sequen primer yang lebih pendek akan memicu amplifikasi produk PCR non spesifik. Ujung 3' primer penting dalam menentukan spesifitas dan sensitifitas PCR. Ujung ini tidak boleh memiliki 3 atau lebih basa G atau C, karena dapat menstabilisasi *annealing* primer non spesifik. Disamping itu ujung 3' kedua primer tidak boleh komplementer satu sama lain, karena dapat mengakibatkan pembentukan *primer-dimer* yang akan menurunkan hasil produk yang diinginkan. Ujung 5' primer tidak terlalu penting dalam penempelan primer, sehingga memungkinkan untuk

menambahkan sequen tertentu misalnya sisi restriksi enzim, *start codon* ATG atau sequen promoter (Sulistyaningsih, 2007). Dalam penentuan urutan primer, perlu diketahui urutan nukleotida pada awal dan akhir DNA target. Primer oligonukleotida disintesis menggunakan suatu alat yang disebut DNA *Synthesizer* (Gaffar, 2007).

Spesifitas PCR sangat tergantung pada suhu *melting* (Tm) primer, yaitu suhu dimana separuh jumlah primer *annealing* pada *template*. Tm kedua primer serupa (dalam 2-4°C) dan diatas 60°C. Konsentrasi primer biasanya optimal pada 0.1-0.5 µM. Konsentrasi primer yang terlalu tinggi akan menyebabkan *misprimiring* (penempelan pada tempat yang tidak spesifik) dan akumulasi produk non spesifik serta meningkatkan kemungkinan terbentuk *primer-dimer*, sebaliknya bila konsentrasi primer terlalu sedikit maka PCR menjadi tidak efisien sehingga hasilnya rendah (Sulistyaningsih, 2007).

c) DNA Polymerase

DNA polymerase adalah enzim yang mengkatalisis proses polimerasi DNA. Sebelum ditemukannya enzim *Taq Polymerase*, PCR dilakukan dengan menggunakan Klenow fragmen DNA polimerase I selama reaksi polimerasinya. Enzim tersebut tidak tahan panas, sehingga akan rusak pada saat proses denaturasi, sehingga harus ditambahkan pada

setiap siklusnya. Sekarang ini telah ditemukan enzim DNA *Taq Polymerase* yang memiliki keaktifan pada suhu tinggi sehingga penambahan enzim tidak perlu dilakukan disetiap siklus dan proses PCR dapat dilakukan dalam satu mesin (Gaffar, 2007). Enzim tersebut diperoleh dari kelompok *Eubacterium* spesies *Thermus aquaticus*, spesies ini diisolasi dari taman *Yellowstone* pada tahun 1969. (Yusuf, 2007).

Enzim DNA *Taq Polymerase* terdiri atas dua macam yaitu enzim alami yang diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* dan enzim rekombinan yang disintesis di dalam sel bakteri *Escherichia coli* (Muladno, 2010). Enzim ini masih mempunyai aktivitas eksonuklease dari 5' ke 3' tetapi tidak mempunyai aktivitas eksonuklease 3' ke 5'. Konsentrasi enzim yang dibutuhkan untuk PCR umumnya 0.5-2.5 unit. Kelebihan jumlah enzim mengakibatkan akumulasi produk non spesifik, sedangkan jika terlalu rendah maka dihasilkan sedikit produk yang diinginkan (Sulistyaningsih, 2007)

d) Deoxynucleotide Thriposphates (dNTPs)

Deoxynucleotide Thriposphate merupakan bahan utama dalam proses sintesis DNA, terdiri dari dATP (nukleotida berbasis adenin), dGTP (Guanin), dCTP (Sitosin), dan dTTP (Timin). dNTPs mengikat ion Mg^{2+} yang dapat mengubah konsentrasi efektif ion. Hal tersebut diperlukan untuk reaksi

polimerasi (Yusuf, 2010). Konsentrasi dNTPs yang digunakan umumnya masing-masing sebesar 20-200 μM , yang dapat menghasilkan kesetimbangan optimal antara hasil, spesifitas dan ketepatan PCR. Cara kerjanya yaitu, *Deoxynucleotide Thriposphate* akan menurunkan Mg^{2+} bebas sehingga mempengaruhi aktivitas polymerase dan menurunkan annealing primer. Konsentrasi dNTP yang rendah akan meminimalkan mispriming pada daerah non target dan menurunkan kemungkinan peranjangan nukleotida yang salah. Oleh karena itu spesifitas dan ketepatan PCR meningkat pada konsentrasi dNTP yang lebih rendah (Sulistyaningsih, 2007).

e) Larutan Buffer

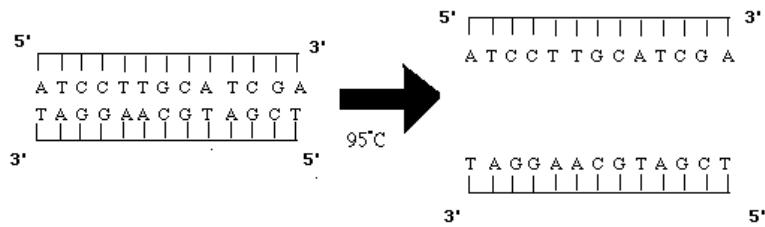
Larutan buffer yang biasa digunakan untuk reaksi PCR umumnya mengandung 10-50 mM Tris-HCl pH 8.3-8.8 (suhu 20°C); 50 mM KCl; 0.1% gelatin atau BSA (*Bovine Serum Albumin*); Tween 20 sebanyak 0.01% atau dapat diganti dengan Triton X-100 sebanyak 0.1%; di samping itu perlu ditambahkan 1.5 mM MgCl₂ (Yusuf, 2010). Optimalisasi konsentrasi ion ini mempengaruhi beberapa hal yaitu *annealing* primer, suhu pemisahan untai template dan produk PCR, spesifitas produk, pembentukan primer-dimer serta aktivitas dan ketepatan enzim *Taq Polymerase*. PCR harus mengandung 0.5-2.5 μM Mg²⁺ dari total konsentrasi dNTP.

Konsentrasi yang lebih tinggi akan meningkatkan produk PCR tapi menurunkan spesifitasnya. Konsentrasi ion ini tergantung pada konsentrasi bahan-bahan yang mengikatnya seperti dNTP, EDTA, dan fosfat (Sulistyaningsih, 2007).

2) Tahap dalam Siklus PCR

a) Denaturasi

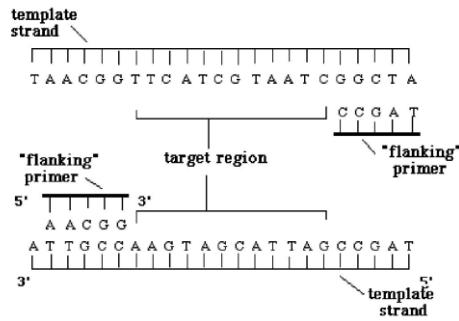
Pada tahap ini untai ganda DNA dipisahkan menjadi untai tunggal, melalui proses pemanasan pada suhu kurang lebih 94°C Untai DNA tunggal yang sudah terpisah akan menjadi cetakan bagi untai DNA baru yang akan dibuat.



Gambar 2.1 Denaturasi
Sumber: Innis M., et. al., 1990

b) Penempelan (*Annealing*)

Annealing merupakan proses penempelan primer pada DNA template. Proses penempelan primer tersebut dibantu oleh enzim DNA *Taq polymerase*. Umumnya, proses *annealing* atau penempelan primer terjadi pada suhu kurang lebih 55°C selama 30-60 detik.

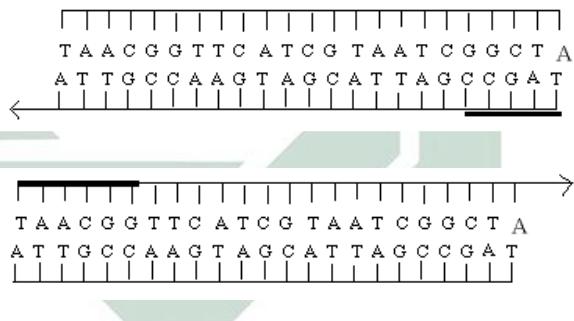


Gambar 2.2 Annealing
Sumber: Innis M., et al., 1990

c) Pemanjangan (*Elongation*)

Proses elongasi dibantu oleh enzim DNA *Taq Polymerase*.

Enzim tersebut akan membantu atau mengkatalis pemanjangan DNA baru gabungan antara primer, DNA template dan nukleotida.



Gambar 2.3 Elongation
Sumber: Innis M., *et al.*, 1990

Ketiga tahap tersebut dilakukan berulang secara terus menerus sesuai jumlah siklus yang diinginkan. Pengulangan proses PCR akan menghasilkan amplifikasi DNA cetakan baru secara eksponensial (Marks Dawn, *et al.*, 2000).

c. Multiplex PCR

Multiplex PCR merupakan salah satu variasi dari teknik PCR. Metode ini menggunakan beberapa set primer dalam campuran PCR tunggal untuk menghasilkan amplikon dari berbagai ukuran yang spesifik untuk sekuen DNA yang berbeda. Dengan pentargetan gen sekaligus, informasi tambahan dapat diperoleh dari *running-test* tunggal yang tidak akan membutuhkan beberapa kali reagen dan lebih banyak waktu untuk melakukan. Temperatur *annealing* untuk masing-masing set primer harus dioptimalkan untuk bekerja dengan benar dalam reaksi tunggal, dan ukuran amplikon. Artinya, panjangnya pasangan basa harus berbeda, cukup untuk membentuk band yang berbeda ketika divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa. Menurut Fratamico *et al* (1995) dalam jurnal *Detection of Escherichia coli O157:H7 by Multiplex PCR* menyatakan bahwa deteksi menggunakan multiplex PCR lebih cepat dibandingkan dengan menggunakan metode kultur secara konvensional (mikrobiologi) pada media sorbitol Mac Conkey agar (SMAC), selain itu penggunaan PCR juga menghilangkan kemungkinan kesalahan deteksi ada atau tidaknya bakteri *Escherichia coli* O157:H7 dalam suatu sampel karena menggunakan berbagai macam primer yang spesifik terhadap gen tertentu.

d. Elektroforesis

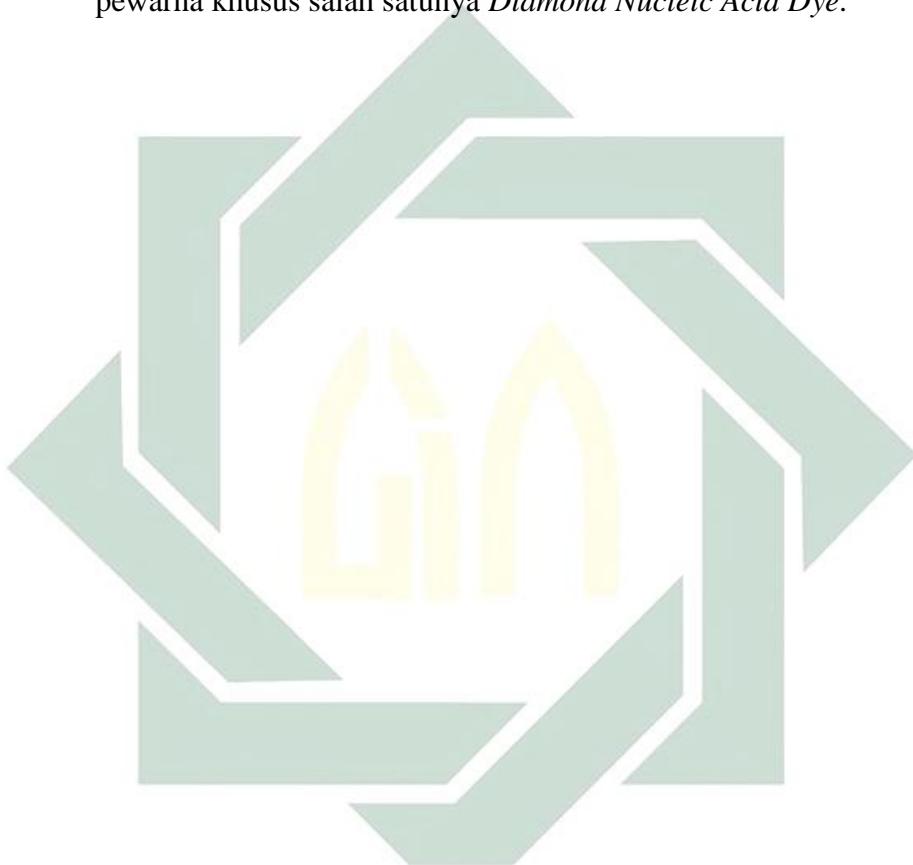
Elektroforesis gel agarosa adalah metode yang umum digunakan untuk pemisahan, identifikasi, dan purifikasi fragmen DNA (Sudjadi, 2008). Salah satu faktor yang berpengaruh dalam laju migrasi DNA untuk memisahkan molekul DNA berdasarkan berat molekulnya yaitu konsentrasi gel agarosa yang digunakan dalam proses elektroforesis (Sambrook, 2007) . Penggunaan gel dengan konsentrasi yang berbeda, dapat menghasilkan perbedaan ukuran fragmen DNA. Molekul DNA berbanding terbalik dengan konsentrasi gelnya yaitu konsentrasi gel agarosa yang rendah memberikan resolusi yang baik untuk fragmen yang besar antara *band* yang dekat ukurannya (Bahar, 2013).

Agarosa merupakan polisakarida turunan yang dieroleh dari alga merah. Gel agarose dapat digunakan untuk memisahkan DNA berukuran lebih dari 100 bp, sedangkan untuk memisahkan DNA dengan ukuran lebih pendek dapat digunakan gel poliakrilamid. Gel agarose merupakan fase diam dalam pemisahan fragmen DNA, konsentrasi agarose yang digunakan dalam pemisahan fragmen DNA sangat mempengaruhi mobilitas fragmen DNA, semakin besar konsentrasi agarose yang digunakan maka semakin kecil pori-pori gel, dan semakin kecil konsentrasi agarose maka semakin besar pori-pori gel. Metode elektroforesis pada prinsipnya melibatkan fase stasioner yang berupa gel agarosa dan fase gerak berupa buffer Tris-acetate EDTA (TAE) atau Tris-borat EDTA (TBE) (Switzer *et al.*, 1999).

TBE (Tris-borat EDTA) 1X, Tris/Borat merupakan buffer yang umum digunakan sebagai buffer elektroforesis karena memiliki kapasitas buffering yang tinggi pada titik isoelektriknya (Ausubel *et al.*, 2003). Borat bertindak sebagai conducting ion sehingga dapat mempertahankan kesetimbangan ion H^+ dan OH^- yang dihasilkan oleh elektrode, hal ini berhubungan dengan fungsi buffer dalam menjaga kesetimbangan pH saat migrasi fragmen DNA berlangsung, perubahan pH dapat mendenaturasi struktur DNA sehingga merubah elektromobilitas DNA (Martin, 1996). Pada elektroforesis agarosa terdapat sejumlah buffer yang dapat digunakan. Contoh buffer yang paling umum adalah: Tris/Asetat/EDTA (TAE), Tris/Borat/EDTA (TBE) dan Borate Litium (LB). Fungsi dari buffer pada elektroforesis adalah mengaktifkan DNA, menjaga pH dan memberikan ion untuk mendukung konduktivitas. Hasil elektroforesis dapat divisualisasi dengan menggunakan pewarna fluoresensi ethidium bromide (EtBr). Secara teknis, setelah proses running, gel direndam dalam larutan buffer TBE atau TAE yang mengandung ethidium bromide, selanjutnya EtBr akan berdifusi kedalam gel dan berasosiasi dengan DNA (Switzer *et al.*, 1999). Ethidium bromide mampu berinterkalasi diantara pasangan basa nukleotida pada struktur double helix dan saat gel hasil elektroforesis disinari dengan ultraviolet maka fragmen-fragmen DNA yang telah terpisah tampak sebagai band atau pita berwarna oranye.

e. Gel Documentation

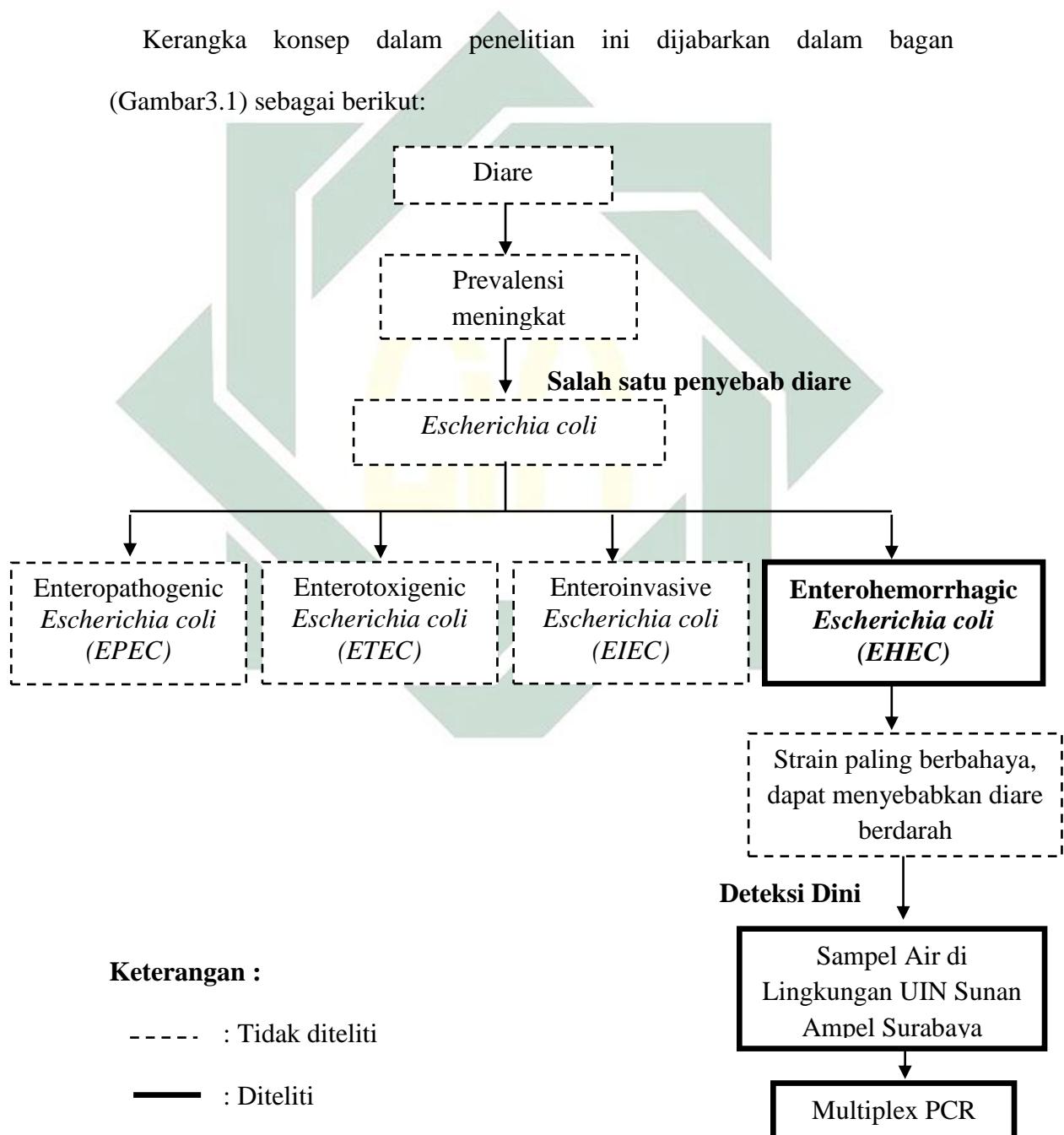
Gel documentation adalah alat yang digunakan untuk mengamati mendokumentasikan hasil elektroforesis dengan memanfaatkan sinar UV untuk memendarkan fragmen DNA pada agarose yang telah diberi pewarna khusus salah satunya *Diamond Nucleic Acid Dye*.



BAB III

A. Kerangka Konsep

Kerangka konsep dalam penelitian ini dijabarkan dalam bagan (Gambar 3.1) sebagai berikut:



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

B. Hipotesis Penelitian

Menurut Bertrand dan Roig (2007) dalam Jeshveen (2012) reservoir primer dari bakteri *Escherichia coli* O157:H7 adalah hewan ternak dan produk daging, namun kontaminasi air juga bertanggungjawab dalam terjadinya infeksi. Diketahui bahwa di Jepang, Amerika dan Eropa telah terjadi infeksi oleh bakteri *Escherichia coli* O157:H7 yang disebabkan karena mengkonsumsi air yang terkontaminasi. Berdasarkan hal tersebut dapat ditemukan bakteri *Escherichia coli* O157:H7 pada sampel air di lingkungan UIN Sunan Ampel Surabaya atau bakteri *Escherichia coli* O157:H7 dapat berpotensi mencemari air di lingkungan sekitar UIN Sunan Ampel Surabaya.

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional deskriptif yang meneliti ada atau tidaknya kontaminan *Escherichia coli* O157:H7 pada sampel yang diuji.

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Genetika dan Kultur Jaringan, Laboratorium Integrasi UIN Sunan Ampel Surabaya Jalan Ahmad Yani Nomor 117 Surabaya pada bulan Februari sampai Juli 2018.

Tabel 4.1 *Timeline* Penelitian

C. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya yaitu sampel air yang diperoleh dari lingkungan kampus UIN Sunan Ampel Surabaya, aquadest, media *Lactose Broth* (LB), media selektif *Eosin Methylen Blue* (EMB), media *Nutrient Agar* (NA), aquadest steril, larutan mastermix, enam pasang *forward* dan *reverse* primer untuk deteksi *multiplex PCR* diantaranya *fliCh7* (antigen flagellar), *rbf E* (antigen O157), *stx 1* (shiga toxin 1), *stx 2* (shiga toxin 2), *eae A* (intimin), dan *hly* (haemolysin) (Tabel 4.1), agarose, pewarna DNA *Diamond Nucleic Acid Dye*, larutan Buffer TAE, *loading dye*, DNA *Ladder* 100 bp, isolat bakteri *Escherichia coli* O157:H7 sebagai kontrol positif yang diperoleh dari Laboratorium Kesmavet Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, isolat *Candida albicans* sebagai kontrol negatif.

2. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cawan petri, jarum ose, *Laminar Air Flow* (LAF), *beaker glass*, gelas ukur, *hot plate*, pipet ukur, mikropipet 10 µl, 20 µl, 200 µl, dan 1000 µl, erlenmeyer, neraca analitik, *centrifuge*, *autoclave*, inkubator, *waterbath*, *Thermocycler* (*Labnet*), spektrofotometer (*Bio-Drop*), perangkat elektroforesis (*Mupid-Exu*), dan perangkat *gel documentation* (*Enduro GDS-1302 Labnet*).

D. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 30 sampel.

Proses pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan metode *purposive sampling*. Sampel air yang digunakan didapatkan dari berbagai macam air meliputi air selokan, air bak mandi, dan air sumber konsumsi di lingkungan UIN Sunan Ampel Surabaya.

2. Isolasi Bakteri

- a. Sampel (sampel air) dibiakkan (*enriched*) dalam media *Lactose Broth* (LB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk mengetahui adanya bakteri *coliform* pada sampel. Hasil positif *coliform* ditunjukkan dengan terbentuknya gas pada tabung durham dan perubahan warna media menjadi keruh.

b. Sampel yang positif mengandung *coliform* kemudian diinokulasikan pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) menggunakan metode *streak* untuk mengetahui ada tidaknya bakteri *Escherichia coli*. Adanya bakteri *E. coli* ditandai dengan munculnya koloni berwarna hijau metalik. Hanya sampel yang positif mengandung *E. coli* selanjutnya dipindahkan ke media *Nutrient Agar* (NA) dan dilakukan uji deteksi bakteri *Escherichia coli* O157:H7 secara molekular dengan menggunakan primer yang spesifik (Sujaya *et al.*, 2010)

3. Isolasi DNA E. coli

Isolasi DNA dilakukan dengan metode *Boiled Cell Method* (BPOM, 2008) sebagai berikut:

- a. Hasil inkubasi pada media NA diambil 2-8 koloni
 - b. Dimasukkan ke dalam tube 1.5 ml berisi aquadest steril sebanyak 500 μ l.
 - c. Kemudian dipanaskan (*boiling*) selama 15 menit pada suhu 100°C.
 - d. Tube berisi suspensi bakteri diinkubasi pada suhu -4°C selama 3 menit.
 - e. Suspensi bakteri disentrifuge pada 12.000 rpm selama 5 menit
 - f. Supernatan diambil sebanyak 400 μ l sebagai hasil akhir isolat DNA yang digunakan untuk analisis selanjutnya.

4. Pengukuran Konsentrasi DNA

Penentuan konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi dilakukan menggunakan alat *Bio-Drop* dengan melihat nilai serapan pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. DNA dikatakan mempunyai kemurnian yang tinggi apabila hasil perbandingan nilai serapan pada panjang gelombang 260/280 nm berada dalam kisaran 1.8-2.0.

Larutan hasil isolasi DNA diambil sebanyak 2 µl menggunakan mikropipet, kemudian diteteskan tepat dibagian tengah *Bio-Drop* setelah itu dapat diketahui nilai kemurnian dan konsentrasi DNA yang didapat. Sebelum dilakukan pengukuran terhadap sampel, terlebih dahulu dilakukan pengujian terhadap larutan blanko, pada penelitian ini larutan blanko yang digunakan yaitu aquadest steril yang merupakan pelarut akhir

dalam proses isolasi DNA. Hasil pengukuran larutan blanko harus menunjukkan angka nol (Instruksi Kerja BPOM, 2008).

5. Amplifikasi DNA

Deteksi keberadaan *E. coli* O157:H7 dilakukan dengan menggunakan primer sebagai berikut:

Tabel 4.2 Macam-Macam Primer Multiplex PCR

Primers	Sequences (5'-3')	Target Gene	Amplicon Size (bp)	Reference
FLICH7-F	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	<i>FliCh7</i>	625	Sarimehmetoglu <i>et al.</i> , 2009
FLICH7-R	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC			
rfb E-F	CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGTC	<i>rfb E</i>	296	Bertrand <i>et al.</i> , 2007
rfb E-R	TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG			
SLT1-F	TGTAACTGGAAAGGTGGAGTATACA	<i>stx1</i>	210	Sarimehmetoglu <i>et al.</i> , 2009
SLT1-R	GCTATTCTGAGTCAACGAAAAATAAC			
SLT1 1-F	GTTCCTCTCGGTATCCTATTCC	<i>stx2</i>	484	Sarimehmetoglu <i>et al.</i> , 2009
SLT1 1-R	GATGCATCTCTGGTCATTGTATTAC			
AE22	ATTACCATCCACACAGACGGT	<i>eaeA</i>	397	Sarimehmetoglu <i>et al.</i> , 2009
AE20-2	ACAGCGTGGTTGGATCAACCT			
MFS1-F	ACGATGTGGTTATTCTGGA	<i>hly</i>	166	Sarimehmetoglu <i>et al.</i> , 2009
MFS1-R	CTTCACGTCACCATACATAT			

Sumber: (Jeshveen *et al.*, 2012)

Reaksi PCR dilakukan pada total volume 40 µl pada masing-masing tube yang terdiri dari:

Tabel 4.3 Komposisi Perekasi Multiplex PCR

Perekusi	Volume (μl)
Larutan Mastermix PCR	15 μl
DNA Template	9 μl
Forward dan reverse Primer @0.5 μl x 12 pasang primer	6 μl
Nuclease Free Water	10 μl
Total Volume	40 μl

Amplifikasi dilakukan menggunakan *Thermocycler* dengan pada kondisi denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit, diikuti 35 siklus denaturasi pada suhu 94°C selama 20 detik, *annealing* pada suhu 63°C selama 1 menit, dan *extension* selama 1 menit pada suhu 72°C, dengan *extension* akhir selama 10 menit pada suhu 72°C diakhiri dengan pemeliharaan pada suhu 4°C.

6. Elektroforesis

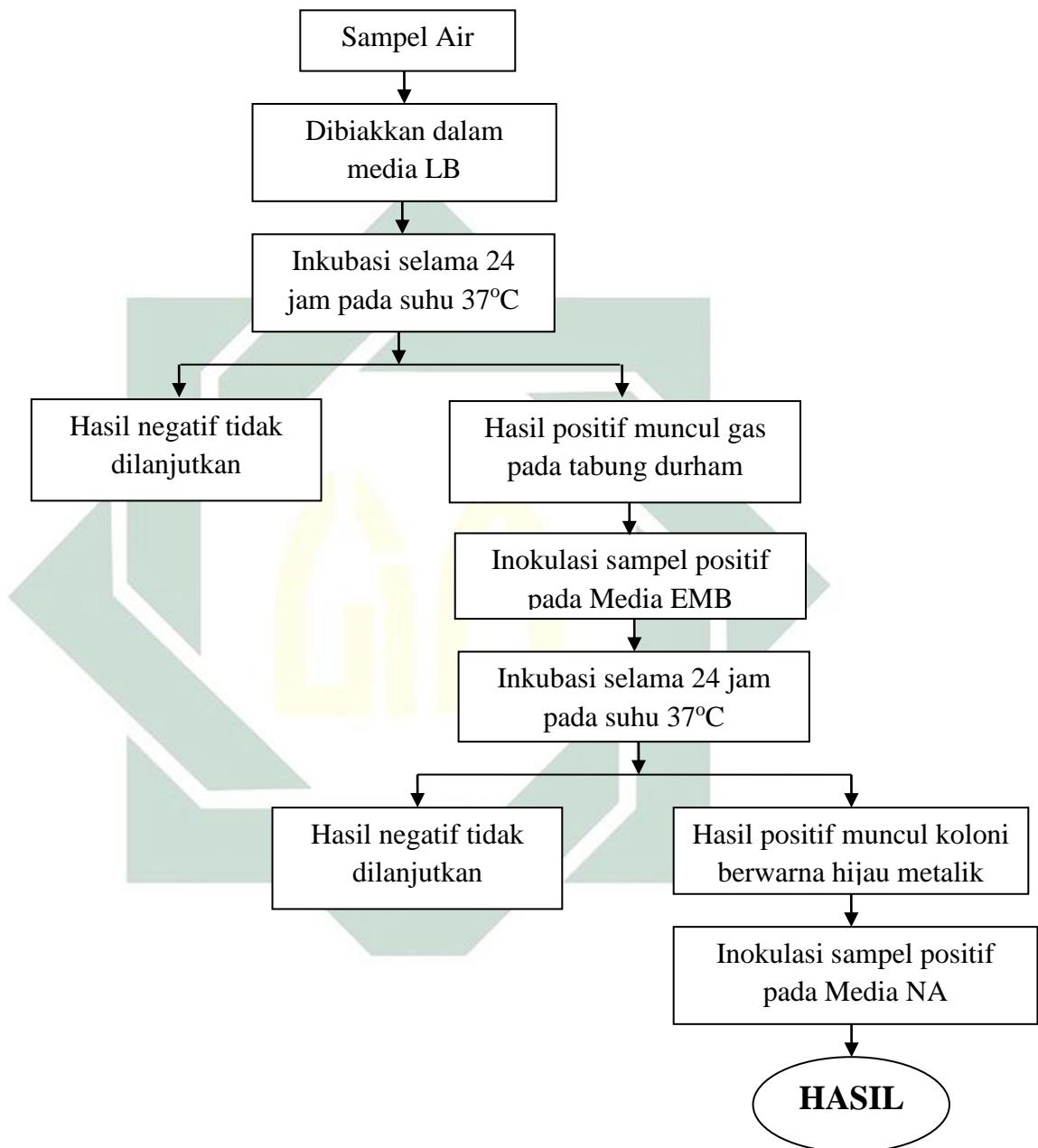
Setiap produk PCR diambil 3 µl, dielektroforesis pada gel agarose 2.0% yang dilarutkan pada buffer TAE 1x. Elektroforesis dilakukan pada kondisi 50 volt, selama 65 menit menggunakan DNA *ladder* atau *marker* berukuran 100 bp sebanyak 2 µl. Masing-masing larutan ditambahkan 1 µl *loading dye* sebagai pemberat DNA. Pita DNA diamati dibawah sinar ultraviolet (UV) menggunakan *gel documentation system*.

7. Gel Documentation

Gel agarose hasil elektroforesis dimasukkan kedalam UV transluminator. UV transluminator dinyalakan melalui software yang terdapat dalam komputer dan pita DNA akan berpendar saat terkena sinar UV. Hasil gel agarosa saat disinari sinar UV didokumentasikan didalam komputer dan diberikan keterangan.

E. Prosedur Operasional

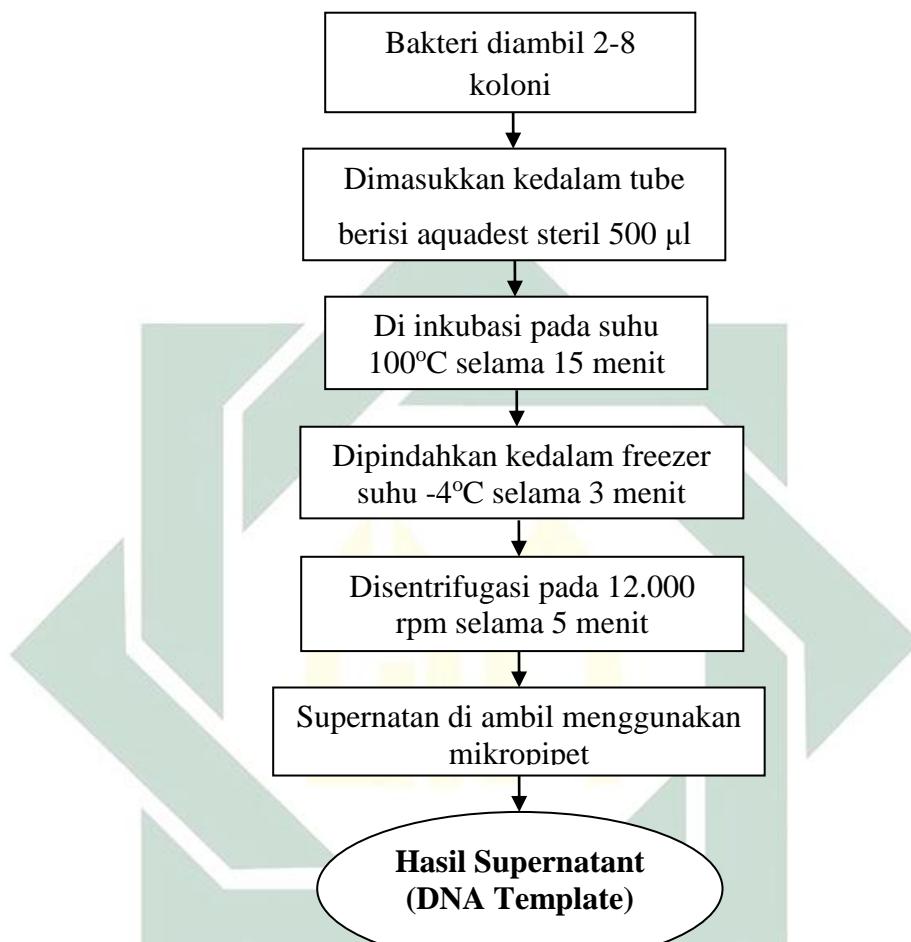
1. Isolasi Bakteri *Escherichia coli*



Gambar 4.1 Prosedur Operasional Isolasi Bakteri *Escherichia coli*

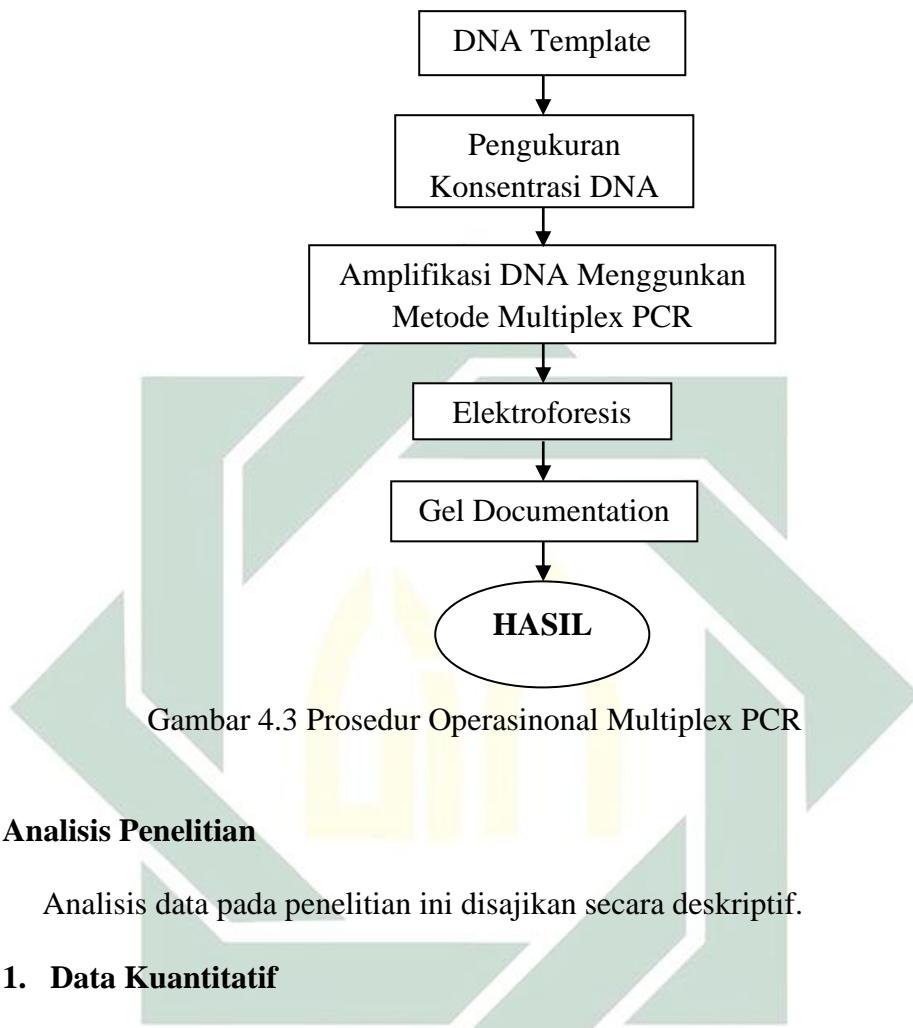
2. Deteksi *Escherichia coli* O157:H7 Secara Molekular

a. Isolasi DNA Metode *Boiling Cell*



Gambar 4.2 Prosedur Operasional Isolasi DNA Metode *Boiling Cell*

b. Multiplex PCR



F. Analisis Penelitian

Analisis data pada penelitian ini disajikan secara deskriptif.

1. Data Kuantitatif

Analisis kuantitatif dilakukan dengan mengukur konsentrasi DNA hasil isolasi menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis (*Bio-Drop*). Nilai konsentrasi DNA diperoleh dari nilai serapan panjang gelombang pada 260 nm dikalikan 50, kemudian dikali dengan faktor pengenceran (Fatchiyah, 2011). DNA dapat menyerap sinar UV karena mengandung basa-basa purin dan pirimidin. Pita DNA dapat menyerap sinar UV pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan berupa protein atau phenol akan menyerap sinar pada panjang gelombang 280 nm. Sehingga

kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dibagi nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm ($\text{A}260/\text{A}280$), dan nilai kemurnian DNA berkisar antara 1.8-2.0.

2. Data Kualitatif

Analisis kualitatif dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa. Metode ini digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi dan memurnikan fragmen DNA. Adanya gen toksin *FliCh7* ditandai dengan munculnya pita DNA pada daerah 625 bp, gen toksin *rfb E* pada daerah 296 bp, gen toksin *stx1* pada daerah 210 bp, gen toksin *stx2* pada daerah 484 bp, gen toksin *eaeA* pada daerah 397 bp, dan gen toksin *hly* pada daerah 166 bp.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu proses pengambilan sampel, isolasi bakteri *Escherichia coli*, isolasi DNA template, amplifikasi DNA menggunakan metode multiplex PCR, dan visualisasi hasil PCR menggunakan teknik elektroforesis dan *gel documentation*. Penelitian ini bersifat observasional dan analisis data secara deskriptif menggunakan analisis data uji kuantitatif dan uji kualitatif.

A. Pengambilan Sampel

Proses pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan metode *purposive sampling*. Metode *purposive sampling* sendiri merupakan metode pengambilan sampel berdasarkan pada keperluan penelitian dengan berbagai pertimbangan tertentu (Purwanto dan Sulistyastuti, 2007). Sampel dalam penelitian ini diambil dari lingkungan kampus UIN Sunan Ampel Surabaya yang meliputi air kran, air bak mandi, air selokan, dan air dari es batu. Total sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 30 sampel. Berikut ini merupakan data sampel yang digunakan dalam penelitian ini:

Tabel 5.1 Nama dan Karakteristik Sampel

No	Sampel	Label	Karakteristik
1	Bak mandi SAC	S1	Warna bening Tidak berbau
2	Selokan depan Auditorium	S2	Warna bening Terdapat sedikit kotoran berwarna hitam Bau pesing

No	Sampel	Label	Karakteristik
3	Selokan depan Tarbyiah baru	S3	Warna bening sedikit keruh Terdapat sedikit kotoran
4	Es batu kantin (balok)	S4	Warna bening agak keruh Terdapat endapan warna putih
5	Es batu Pesmi	S5	Warna bening Terdapat kotoran berwarna putih
6	Air kran kantin	S6	Warna bening Tidak berbau
7	Selokan di samping Laboratorium Komputer	S7	Warna putih keruh Terdapat banyak kotoran warna hitam Bau tidak sedap
8	Selokan di samping Laboratorium Integrasi	S8	Warna putih keruh Terdapat sedikit kotoran Bau tidak sedap
9	Selokan di samping Gedung ELTIS	S9	Warna bening sedikit keruh Terdapat kotoran
10	Selokan di belakang Laboratorium Integrasi	S10	Warna bening sedikit kehijauan Terdapat sedikit kotoran
11	Selokan di belakang rektorat lama	S11	Warna putih keruh Terdapat gumpalan warna putih berbentuk serabut
12	Air kran masjid (Perempuan)	S12	Warna bening
13	Air bak mandi masjid (Perempuan)	S13	Warna bening Terdapat sedikit kotoran
14	Es batu Kantin Magha	S14	Warna bening Terdapat endapan warna putih
15	Air Kran Makha	S15	Warna bening
16	Kran Pesmi	S16	Warna bening Terdapat sedikit kotoran
17	Bak Ushuluddin	S17	Warna bening
18	Selokan Ushuluddin	S18	Terdapat sedikit kotoran Sedikit keruh (abu-abu) Terdapat kotoran Bau tidak sedap
19	Bak Syariah	S19	Warna bening
20	Genangan Ukor	S20	Sedikit keruh Terdapat kotoran

No	Sampel	Label	Karakteristik
21	Kran Pesma	S21	Warna bening Terdapat kotoran
22	Selokan di dekat Twin Tower	S22	Agak keruh Terdapat kotoran
23	Bak Ukor	S23	Warna bening agak kecoklatan Terdapat kotoran berwarna kecoklatan
24	Kran Ukor	S24	Warna bening sedikit kecoklatan Terdapat kotoran
25	Bak Tarbiyah A	S25	Warna bening agak kekuningan
26	Kran Tarbiyah A	S26	Warna bening
27	Kran Masjid Laki-laki	S27	Warna bening
28	Bak Masjid Laki-laki	S28	Warna bening agak kekuningan
29	Bak Dakwah	S29	Warna bening
30	Bak Adab	S30	Warna bening

Proses pengambilan sampel dilakukan secara aseptis, sampel diletakkan di dalam botol yang sudah disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit. Proses sterilisasi ini bertujuan untuk menghilangkan berbagai macam mikroorganisme yang terdapat pada botol sampel, sehingga mikroorganisme yang ada pada botol sampel tidak bercampur dengan sampel air yang diambil.

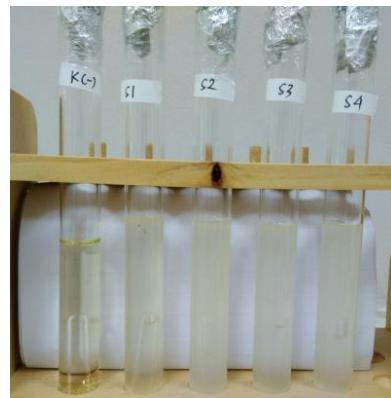


Gambar 5.1 Pengambilan Sampel
Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2018

Pengambilan sampel dilakukan sesuai dengan standar baku yang telah diakui secara internasional maupun nasional. Pengambilan sampel yang diambil dari air sungai mengalir dilakukan dengan mencelupkan botol dengan posisi miring dan mulut botol melawan arus air. Jika pengambilan sampel air dilakukan pada kondisi air yang tenang, botol dicelupkan menggunakan tali. Sedangkan pengambilan sampel dari air kran dilakukan dengan membakar mulut kran beberapa saat, kemudian mengalirkan kran untuk beberapa detik (Tim Asisten Praktikum Mikrobiologi Lingkungan, 2014).

B. Isolasi Bakteri *Escherichia coli*

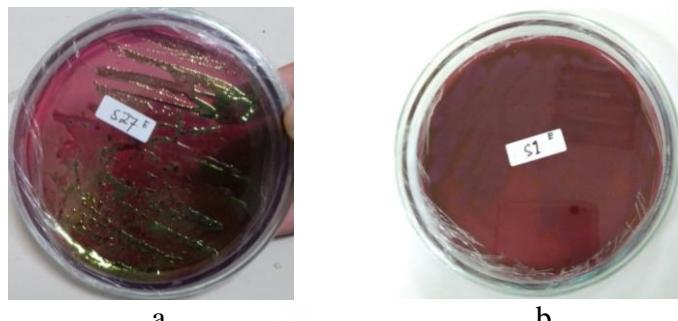
Proses isolasi bakteri *Escherichia coli* dilakukan melalui beberapa tahap. Tahap pertama yaitu uji penduga (*Presumptive Test*) merupakan tes pendahuluan yang bertujuan untuk mendeteksi ada atau tidaknya bakteri *coliform* dalam suatu sampel dengan menginokulasikannya kedalam media *Lactose Broth* (LB). Adanya bakteri *coliform* dalam suatu sampel ditandai dengan terbentuknya asam dilihat dari perubahan warna media dari bening menjadi keruh dan terbentuknya gas pada tabung durham, hal tersebut dikarenakan fermentasi laktosa oleh bakteri golongan *coliform* (Widiyanti dan Ristiani, 2004). Masing-masing sampel diinokulasikan kedalam media LB, kemudian di inkubasi pada suhu 36°C selama 24-48 jam. Proses inkubasi ini bertujuan untuk menumbuhkan bakteri pada media dan lingkungan yang sesuai dan optimal.



Gambar 5.2 Hasil Uji Penduga (*Presumptive Test*)
Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2018

Setelah diinkubasi selama 24-48 jam, semua sampel positif terhadap bakteri *coliform* ditandai adanya perubahan warna media menjadi keruh dan muncul gas pada tabung durham. Bakteri *coliform* merupakan salah satu indikator penentu kualitas air. *Coliform* banyak ditemukan di alam seperti tanah, akan tetapi air konsumsi bukan merupakan lingkungan alami bakteri *coliform* (Sengupta dan Saha, 2013).

Tahap kedua yaitu, dilakukan uji penguat (*Confirmed Test*), hasil positif bakteri *coliform* pada media LB diinokulasikan kedalam media *Eosyn Methylen Blue Agar* (EMBA), kemudian diinkubasi pada suhu 36°C selama 24-48 jam yang bertujuan untuk mendeteksi adanya bakteri *Escherichia coli*, media EMBA merupakan media selektif terhadap adanya pertumbuhan bakteri *E. coli* yang ditandai dengan adanya pertumbuhan koloni berwarna merah kehijau dengan kilau metalik (Sayutri *et al.*, 2011).



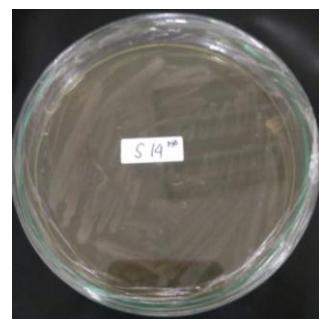
Gambar 5.3 Hasil Uji Penguat (*Confirmed Test*)

- a. Hasil positif bakteri *E. coli* (tampak koloni berwarna hijau metalik)
b. Hasil negatif bakteri *E. coli* (tidak tampak koloni berwarna hijau metalik)

Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2018

Hasil uji penguat menunjukkan dari 30 sampel yang diuji, dua sampel negatif bakteri *E. coli* yaitu S1 dan S16, dan 28 sampel lainnya positif terhadap bakteri *E. coli*, hal tersebut ditandai dengan munculnya koloni berwarna hijau metalik. *Escherichia coli* merupakan kelompok bakteri *coliform*, dan umumnya bakteri *E. coli* digunakan sebagai indikator spesifik adanya kontaminasi fekal pada suatu sampel (Rompre' *et al.*, 2002).

Proses terakhir yaitu uji pelengkap (*Completed Test*), dilakukan dengan mengambil koloni berwarna hijau metalik pada media EMBA untuk diinokulasikan pada media *nutrient agar* (NA) yang merupakan media pertumbuhan *universal*, proses ini bertujuan untuk memurnikan dan memperbanyak jumlah koloni yang diduga bakteri *E. coli*.



Gambar 5.4 Hasil Uji Pelengkap (*Completed Test*)

Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2018

Berikut ini rangkuman hasil uji penduga (*Presumptive Test*) dan uji penguat (*Confirmed Test*) yang telah dilakukan pada 30 sampel air.

Tabel 5.2 Hasil Uji Penduga dan Uji Penguat

No	Sampel	Uji Penduga (Coliform)	Uji Penguat (Escherichia coli)
1	S1	+	-
2	S2	+	+
3	S3	+	+
4	S4	+	+
5	S5	+	+
6	S6	+	+
7	S7	+	+
8	S8	+	+
9	S9	+	+
10	S10	+	+
11	S11	+	+
12	S12	+	+
13	S13	+	+
14	S14	+	+
15	S15	+	+
16	S16	+	-
17	S17	+	+
18	S18	+	+
19	S19	+	+
20	S20	+	+
21	S21	+	+
22	S22	+	+
23	S23	+	+
24	S24	+	+
25	S25	+	+
26	S26	+	+
27	S27	+	+
28	S28	+	+
29	S29	+	+
30	S30	+	+

Keterangan: (+): Sampel positif; (-): Sampel Negatif

Tabel tersebut menunjukkan dari 30 sampel yang diambil semuanya positif mengandung bakteri *coliform* ditandai dengan terbentuknya asam dan gas pada tabung durham. Sedangkan pada uji penguat menggunakan media EMBA, dari 30 sampel yang diteliti 28 sampel positif *E. coli* ditandai dengan

terbentuknya koloni berwarna hijau metalik sedangkan 2 sampel (S1 dan S16) negatif bakteri *E. coli*.

C. Hasil Pengujian Kuantitatif DNA

Proses isolasi DNA pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode *boiling cell*. Metode *boiling cell* merupakan metode yang menggunakan suhu panas untuk melisiskan sel, metode ini tergolong cepat, sederhana, dan merupakan metode yang efektif digunakan untuk isolasi DNA bakteri (Reischl *et al.*, 2000; Queipo-Ortuño *et al.*, 2008). Proses tersebut membutuhkan tiga kali sentrifugasi untuk mendapatkan sel, membuang debris sel setelah proses perebusan dari jumlah total endapan DNA (Araújo *et al.*, 2004; Deak *et al.*, 2000). Untuk mengetahui hasil isolasi DNA selanjutnya dilakukan pengukuran kuantitas DNA yang diperoleh.

Uji kuantitas DNA dilakukan dengan menggunakan alat *Bio-Drop*. DNA yang mengandung basa-basa purin dan pirimidin dapat menyerap cahaya UV. Untai ganda DNA dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan seperti protein dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm, sehingga kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi pada 260 nm dibagi nilai absorbansi pada 280 ($\text{A}260/280$) (Fatchiyah, *et al.*, 2011). Data kemurnian dan konsentrasi hasil isolat DNA sangat dibutuhkan untuk mengetahui derajat kontaminasi suatu sampel dan untuk mengetahui apakah suatu sampel DNA layak untuk diuji pada tahap selanjutnya (Amanda dan Certaely, 2015)

Proses pengukuran kuantitas DNA pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *Bio-Drop*, sampel diambil sebanyak 2 µl dan menggunakan aquades steril 2 µl sebagai larutan blanko, kemudian diperoleh hasil sebagai berikut:

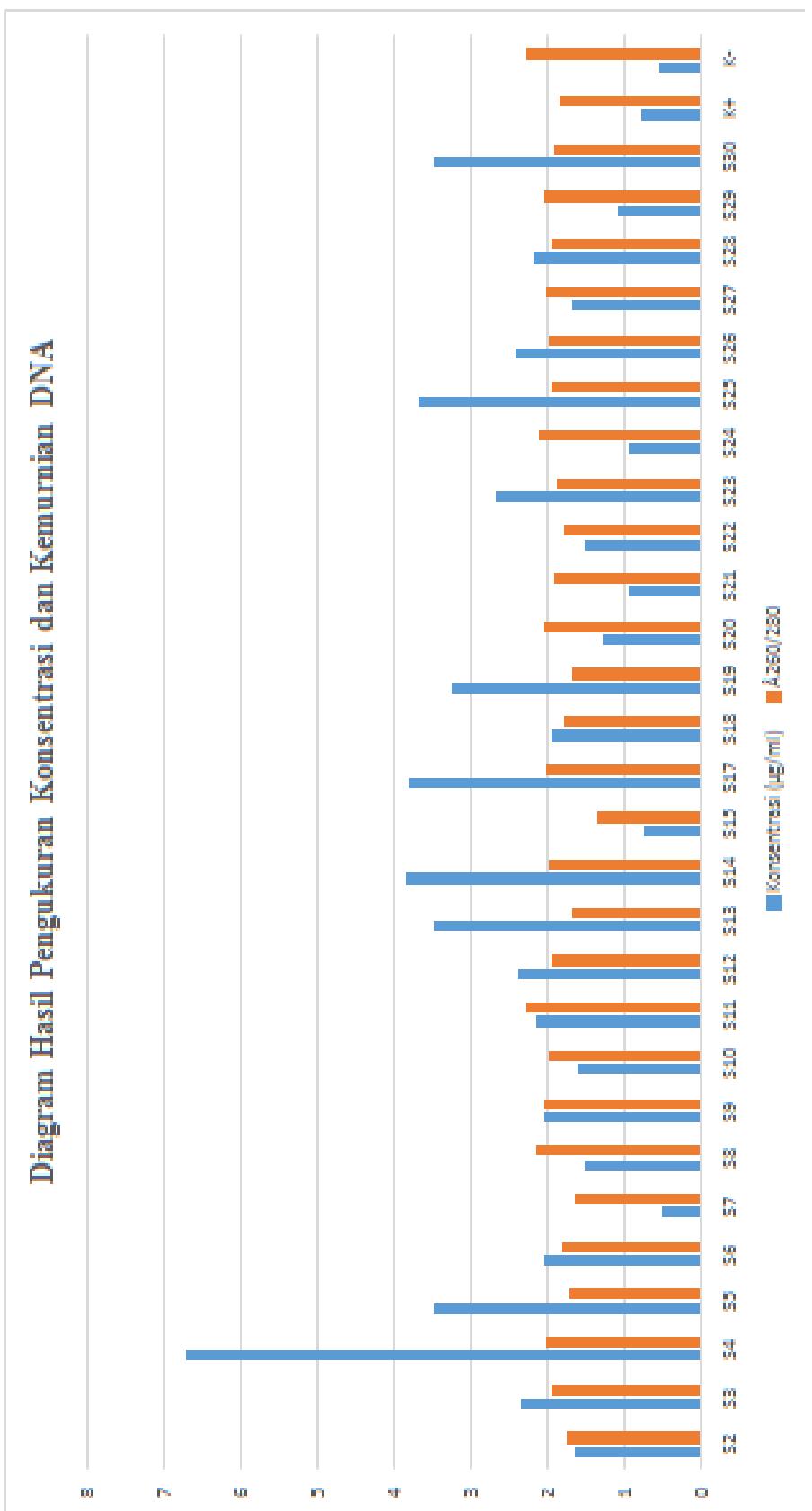
Tabel 5.3 Hasil Pengukuran Konsentrasi DNA

No	Sampel	Konsentrasi (µg/ml)	Å260/280
1	S2	1.657	1.731
2	S3	2.348	1.960
3	S4	6.720	1.994
4	S5	3.474	1.716
5	S6	2.033	1.795
6	S7	0.507	1.651
7	S8	1.508	2.130
8	S9	2.054	2.046
9	S10	1.610	1.988
10	S11	2.131	2.289
11	S12	2.377	1.937
12	S13	3.488	1.670
13	S14	3.853	1.973
14	S15	0.755	1.361
15	S17	3.801	1.999
16	S18	1.930	1.787
17	S19	3.253	1.666
18	S20	1.282	2.029
19	S21	0.949	1.901
20	S22	1.499	1.766
21	S23	2.674	1.878
22	S24	0.945	2.124
23	S25	3.691	1.952
24	S26	2.426	1.978
25	S27	1.684	2.019
26	S28	2.182	1.928
27	S29	1.077	2.043
28	S30	3.483	1.900
29	Kontrol Positif	0.768	1.838
30	Kontrol Negatif	0.536	2.269

Berdasarkan tabel di atas, dapat diketahui rata-rata konsentrasi DNA yang didapatkan cukup baik. Nilai konsentrasi DNA terendah diperoleh sampel nomor 7 (S7) yaitu sebesar 0.507 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sedangkan konsentrasi DNA tertinggi diperoleh pada sampel nomor 4 (S4) dengan nilai konsentrasi 6.720 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Banyak faktor yang dapat mempengaruhi nilai konsentrasi DNA. Nilai konsentrasi DNA yang dihasilkan dipengaruhi oleh beberapa faktor pada saat ekstraksi DNA dan kondisi sampel. Selain itu, faktor kecepatan ekstraksi merupakan faktor yang paling berpengaruh terhadap besar kecilnya konsentrasi DNA (Komalasari, 2009).

Sedangkan nilai kemurnian DNA yang diperoleh dilihat dari serapan panjang gelombang $\text{\AA}260/280$, nilai kemurnian terendah terdapat pada sampel nomor 15 (S15) yaitu sebesar 1.361, sedangkan nilai absorbansi $\text{\AA}260/280$ tertinggi diperoleh sampel nomor 8 (S8) yaitu sebesar 2.130. Isolat DNA dikatakan murni jika nilai rasio pada $\text{\AA}260/280$ bernilai antara 1.8 sampai 2.0. Jika nilai rasio pada $\text{\AA}260/280$ kurang dari 1.8 maka isolat DNA terkontaminasi fenol atau pelarut yang digunakan terlalu banyak, dan DNA yang diambil terlalu sedikit. Sedangkan jika nilai rasio pada $\text{\AA}260/280$ lebih dari 2.0, maka isolat DNA mengandung kontaminan protein membran atau senyawa lainnya (Sambrook dan Ruslle, 2001)

DNA dengan kemurnian tinggi dan bebas kontaminan sangat dibutuhkan dalam teknologi molekular. Adanya kontaminan dapat mengahambat proses pengujian secara molekular. Umumnya kontaminan yang terdapat pada isolat DNA yaitu berupa enzim, protein, dan lipid (Padhye *et al.*, 1997).



Gambar 5.5 Diagram Hasil Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

D. Hasil Pengujian Kualitatif DNA

Isolat DNA yang sudah didapatkan kemudian diamplifikasi menggunakan metode multiplex PCR. Pada penelitian ini digunakan 6 pasang primer yang mengkode masing-masing gen yang terdapat pada bakteri *Escherichia coli* O157:H7, primer-primer tersebut diantaranya *fliCh7* (antigen flagellar), *rfb E* (antigen O157), *stx 1* (shiga toxin 1), *stx 2* (shiga toxin 2), *eae A* (intimin), dan *hly* (haemolysin). Setelah dilakukan optimasi, didapatkan hasil komposisi reaksi PCR sebagai berikut:

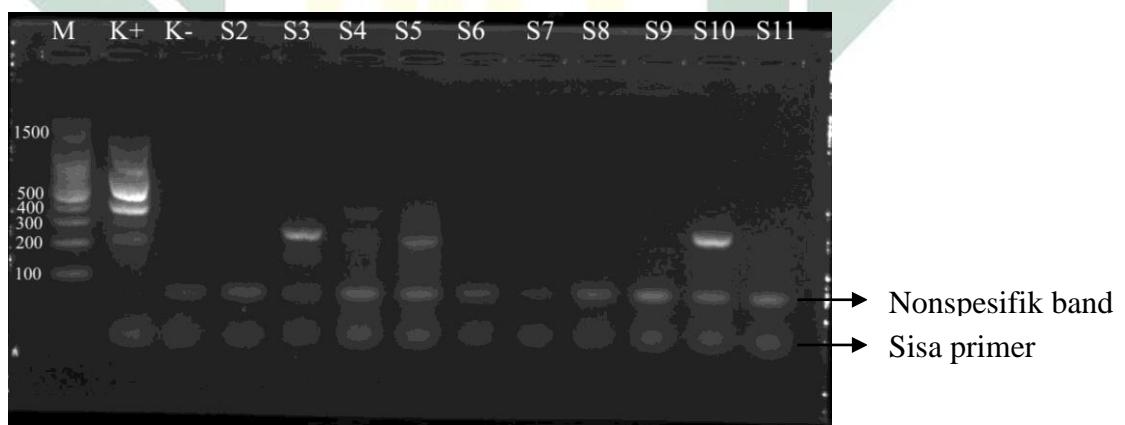
Tabel 5.4 Komposisi Reaksi PCR

Perekusi	Volume (µl)
Larutan Mastermix PCR	15 µl
DNA Template	9 µl
Forward dan reverse Primer @0.5 µl x 12 pasang primer	6 µl
Nuclease Free Water	10 µl
Total Volume	40 µl

Proses amplifikasi dilakukan pada kondisi pre-denaturasi 94°C dilanjutkan 35 siklus denaturasi pada suhu 94°C selama 20 detik, annealing 63°C selama 1 menit, dan elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit, kemudian diakhiri dengan post-elongasi pada suhu 72°C selama 10 menit.

Uji kualitatif DNA dilakukan dengan menguji 28 sampel positif terhadap bakteri *Escherichia coli* yang sudah diamplifikasi menggunakan metode multiplex PCR. Pengujian dilakukan dengan teknik elektroforesis menggunakan gel agarosa 2% dan buffer TAE 1x. Proses elektroforesis bertujuan untuk pemisahan, identifikasi, dan purifikasi fragmen DNA (Sudjadi, 2008). Gel agarose ditambahkan pewarna *Diamond Nucleic Acid Dye* agar pita DNA dapat berpendar dibawah sinar UV pada saat dilakukan

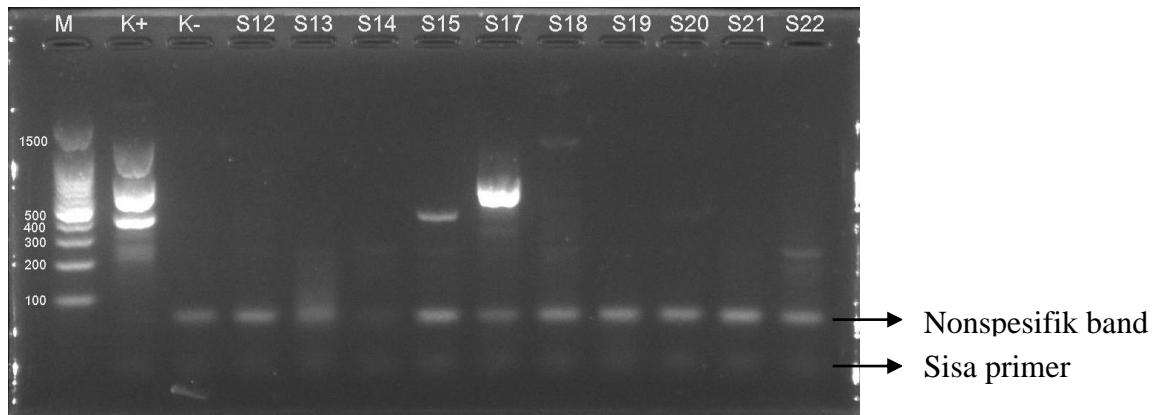
visualisasi menggunakan *gel documentation*. DNA Ladder 100 bp sebanyak 2 μl digunakan sebagai *marker* atau penanda dalam penelitian ini, sedangkan kontrol positif, kontrol negatif dan sampel diambil sebanyak 3 μl . Sebelum dimasukkan kedalam sumuran (*well*) gel agarosa, masing-masing sampel dan *marker* ditambahkan *loading dye* yang berfungsi sebagai pemberat DNA. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasikan di bawah sinar UV menggunakan alat *gel documentation*. Setelah dilakukan uji kualitatif 28 sampel menggunakan teknik elektroforesis diperoleh hasil, 12 sampel positif terhadap beberapa gen yang ada pada bakteri *Escherichia coli* O157:H7. Hasil uji kualitatif DNA menggunakan teknik elektroforesis, disajikan pada gambar berikut:



Gambar 5.6 Hasil Elektroforesis Sampel Nomor 2-11
Keterangan : M= DNA Ladder 100 bp (*Marker*), K+ = Kontrol Positif bakteri *Escherichia coli* O157:H7, K- = Kontrol Negatif Jamur *Candida albicans*, Sampel Nomor 2 -11.

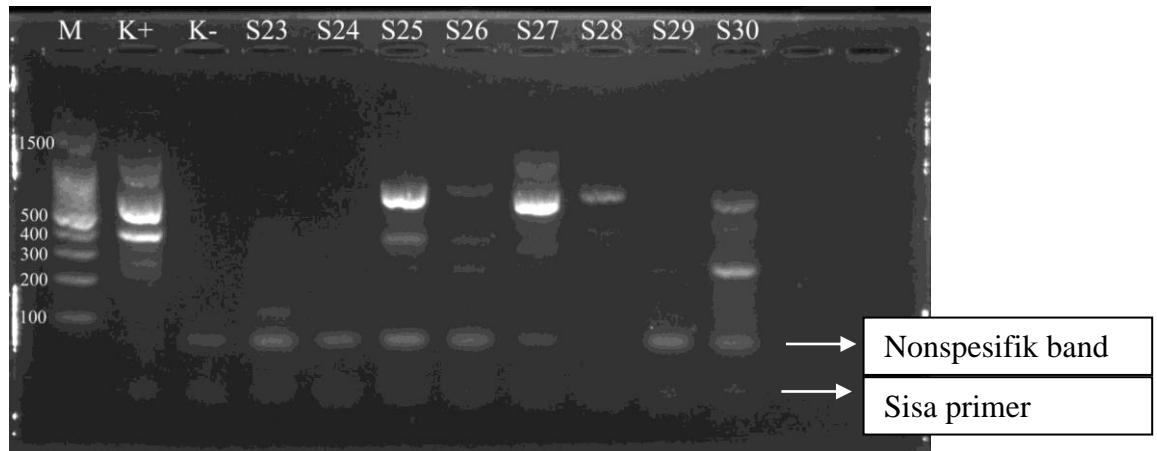
Gambar diatas menunjukkan hasil elektroforesis sampel nomor 2 sampai 11 (S2 sampai S11). Pada sampel nomor 3 (S3) muncul pita DNA pada daerah ± 210 bp yang artinya pada sampel nomor 3 positif terhadap gen *stx1*, pada sampel nomor 4 (S4) muncul pita DNA pada daerah ± 210 bp dan ± 397

bp (positif gen *stx1* dan *eaeA*), pada sampel nomor 5 (S5) dan sampel nomor 10 (S10) muncul pita DNA pada daerah ± 210 bp (positif gen *stx1*).



Gambar 5.7 Hasil Elektroforesis Sampel Nomor 12-22
Keterangan : M= DNA Ladder 100 bp (*Marker*), K+ = Kontrol Positif bakteri *Escherichia coli* O157:H7, K- = Kontrol Negatif Jamur *Candida albicans*, Sampel Nomor 12 -22.

Gambar diatas menunjukkan hasil elektroforesis sampel nomor 12 sampai 22 (S12 sampai S22). Dari gambar tersebut, didapatkan hasil pada sampel nomor 15 (S15) muncul pita DNA pada daerah ± 397 bp (positif gen *eaeA*), pada sampel nomor 17 (S17) muncul pita DNA pada daerah ± 625 bp (positif gen *fliCh 7*), dan pada sampel nomor 22 (S22) muncul pita DNA pada daerah ± 296 bp (positif gen *rfb E*).



Gambar 5.8 Hasil Elektroforesis Sampel Nomor 23-30

Keterangan : M= DNA Ladder 100 bp (*Marker*), K+ = Kontrol Positif bakteri *Escherichia coli* O157:H7, K- = Kontrol Negatif Jamur *Candida albicans*, Sampel Nomor 23-30.

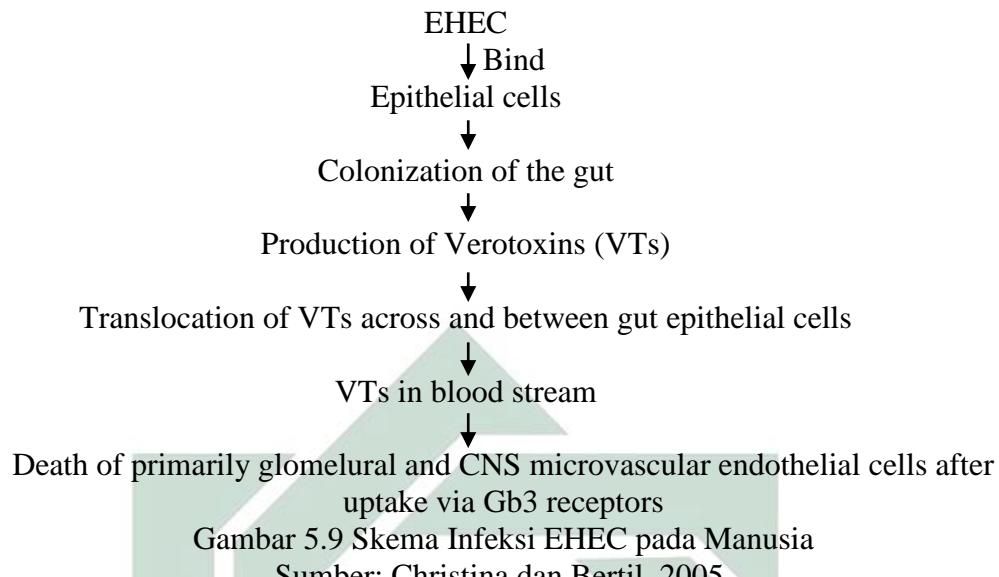
Gambar diatas menunjukkan hasil elektroforesis sampel nomor 23 sampai 30 (S23 sampai S30). Dari gambar tersebut, didapatkan hasil pada sampel nomor 25 (S25) muncul pita DNA pada daerah \pm 397 bp dan \pm 625 bp (positif gen *eaeA* dan *fliCh*), pada sampel nomor 26 (S26) muncul pita DNA pada daerah \pm 625 bp, \pm 397 bp, dan \pm 210 bp (positif gen *fliCh 7*, *eaeA* dan *stxI*), pada sampel nomor 27 (S27) dan nomor 28 (S28) muncul pita DNA pada daerah \pm 625 bp (positif gen *fliCh 7*), dan pada sampel 30 (S30) muncul tiga pita DNA pada daerah \pm 210 bp dan \pm 625 bp (positif gen *stxI* dan *fliCh 7*).

Hasil penelitian menunjukkan ekspresi gen yang paling sering muncul dari 12 sampel yang positif terhadap bakteri *E. coli* O157:H7 yaitu gen *stx1* dan *fliCh*. Ekspresi gen yang muncul pada 12 sampel positif bakteri *E. coli* O157:H7 dirangkum pada tabel dibawah ini (Tabel 5.5):

Tabel 5.5 Hasil Deteksi Menggunakan Multiplex PCR

No	Sampel	Gen yang Muncul
1	S3	<i>stx1</i>
2	S4	<i>stx1</i> dan <i>eaeA</i>
3	S5	<i>stx1</i>
4	S10	<i>stx1</i>
5	S15	<i>eaeA</i>
6	S17	<i>fliCh7</i>
7	S22	<i>rbfE</i>
8	S25	<i>fliCh7</i> dan <i>eaeA</i>
9	S26	<i>fliC7</i> , <i>eaeA</i> dan <i>stx1</i>
10	S27	<i>fliCh7</i>
11	S28	<i>fliCh7</i>
12	S30	<i>Stx1</i> dan <i>fliCh7</i>

Escherichia coli O157:H7 dapat membentuk vero toksin dan faktor virulen tersebut dikode oleh gen *stx1* dan *stx2*. Shigatoxin (stx) dapat menghambat sintesis protein dan dapat menyebabkan kerusakan dan kematian sel eukariotik (Boerling *et al.*, 1999; Lahtia *et al.*, 2001; Rey *et al.*, 2006; Bentancor *et al.*, 2012). Gen *eaeA* mengkode intimin yang bertanggungjawab untuk *adherence* dalam patogenitasnya terhadap lapisan intestinal dan menyebabkan kerusakan usus (*intestine*). Sementara itu enterohemolysin dikode oleh gen *hlyA* yang bertanggungjawab terhadap virulen lisinya sel eritrosit sehingga menyediakan sumber zat besi bagi bakteri untuk bertahan didalam saluran pencernaan (Paton dan Paton, 1998; Boerling *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2005; Rey *et al.*, 2006), antigen O157 dikode oleh gen *rfbE* dan antigen flagellar dikode oleh gen *fliCh7* (Fleds *et al.*, 1997). Berikut ini ilustrasi skema infeksi EHEC pada manusia menurut Christina dan Bertil (2005):



Bakteri *E. coli* O157:H7 termasuk kedalam bakteri patogen jenis EHEC (*Enterohaemorrhagic E. coli*), jenis ini dapat menyebabkan infeksi yang serius khususnya pada anak-anak, salah satunya yaitu HUS (*Haemolytic Uremic Syndrom*). HUS merupakan hasil dari penyakit mikrovaskular ketika toxin masuk kedalam aliran darah dan berikatan dengan reseptor sel endotelial pada ginjal dan otak (Nataro dan Kaper, 1998). Karakteristik kerusakan intestinal yang disebabkan oleh EHEC meliputi perdarahan (*haemorrhage*) dan edema pada daerah lamina propria ditandai dengan nekrosis dan infiltrasi neutrofil (Hurley *et al.*, 1999). Sumber utama penyebaran EHEC yaitu melalui makanan atau air yang terkontaminasi, kontak secara langsung maupun tidak langsung dengan hewan reservoir EHEC, dan penularan dari orang yang terinfeksi (Christina dan Bertil, 2005).

Seperti yang kita ketahui air merupakan kebutuhan mendasar bagi makhluk hidup tidak terkecuali manusia, air banyak digunakan untuk

dikonsumsi, industri, peternakan, irigasi, dan lain sebagainya. Seperti yang dijelaskan Allah dalam Firman-Nya Surat Qaf ayat 9-11:

وَنَرَّلَنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً مُبَرَّكًا فَأَنْبَتْنَا بِهِ جَنَّتٍ وَحَبَّ الْحَصِيدِ (9) وَالنَّخلَ بَا سِقْتٍ لَهَا طَلْعُ نَضِيْدِ (10) رَزْقًا لِلْعِبَادِ وَأَحْيَنَا بِهِ بُلْدَةً مَيْنَانِ كَذَلِكَ الْخُرُوفُ (11)

Artinya:

Dan dari langit Kami turunkan air yang memberi berkah lalu Kami tumbuhkan dengan (air) itu pohon-pohon dan biji-biji tanaman yang diketam(9), dan pohon kurma yang tinggi-tinggi yang mempunyai mayang yang bersusun-susun (10), untuk menjadi rezeki bagi hamba-hamba (Kami), dan Kami hidupkan dengan air itu tanah yang mati (kering). Seperti itulah terjadinya kebangkitan.

Di dalam tafsir Al Misbah karangan Muhammad Quraish Shihab, dijelaskan Allah menurunkan air sebagai sumber kehidupan. Allah menurunkan air yang membawa banyak kebaikan dan manfaat dari langit, lalu dengan air itu Allah menumbuhkan kebun-kebun yang mempunyai pohon-pohonan, bunga-bungaan dan buah-buahan. Dengan air itu Allah juga menumbuhkan biji tumbuhan yang dituai, dan pohon kurma yang tumbuh menjulang tinggi ke langit yang mempunyai mayang yang bersusun karena banyaknya zat buah yang ada didalamnya. Semua itu Allah tumbuhkan untuk menjadi rezeki bagi hamba-Nya. Dengan air Allah menghidupkan tumbuhan dari tanah yang kering. Seperti itulah orang-orang yang mati akan dikeluarkan dari kubur mereka pada hari kebangkitan.

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya cemaran bakteri *Escherichia coli* O157:H7 pada sampel air di lingkungan UIN Sunan Ampel Surabaya. Salah satu faktor yang menyebabkan banyaknya pencemaran air yaitu pertumbuhan penduduk dan pembangunan yang semakin padat sehingga menyebabkan redahnya kemampuan tanah untuk menyerap air karena perubahan fungsi

tanah yang tidak terkendali (Andrian *et al.*, 2014). Seperti yang kita ketahui, setiap tahunnya UIN Sunan Ampel Surabaya menerima ribuan mahasiswa baru, dan beberapa tahun terakhir sedang melakukan pembangunan kampus secara besar-besaran. Bertambahnya warga kampus yang sangat pesat menyebabkan polusi atau pencemaran juga semakin meningkat terutama pencemaran air yang sebagian besar diakibatkan oleh limbah industri dan limbah rumah tangga.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa strain *E. coli* O157:H7 dari berbagai sampel air memiliki gen virulen yang berbeda-beda. Umumnya pencemaran air yang diakibatkan oleh mikroorganisme adalah masalah serius yang harus segera ditangani (Sengupta dan Saha, 2013). Penemuan ini harus segera ditangani, karena air yang terkontaminasi bakteri *coliform*, *E. coli*, terutama *E. coli* O157:H7 berpotensi dapat membahayakan kesehatan dan menyebabkan wabah penyakit (*water born disease*). Adanya bakteri tersebut tidak selalu berarti kontaminasi dari air limbah atau sanitasi lainnya akan tetapi dengan indikasi adanya bakteri tersebut dibutuhkan analisis dari semua fasilitas sistem pengairan dan pengoprasianya untuk menentukan jalur masuknya organisme tersebut ke dalam sistem pengairan. Kesadaran berbagai pihak terhadap penggunaan sistem pengairan diperlukan sejak konstruksi atau pembangunan dan perawatan sistem pengairan tersebut yang seharusnya tidak mengandung bakteri *coliform* (Sengupta dan Saha, 2013).

Wabah penyakit yang diakibatkan oleh mikroorganisme bukan baru-baru ini saja terjadi. Sejak zaman Nabi Muhammad SAW sudah terdapat adanya

mikroorganisme yang menyebabkan wabah penyakit menular. Hal tersebut dijelaskan pada hadist nomor 4110 dalam kitab Shahih Muslim karangan Imam Abul Husain Muslim bin al-Hajjaj al-Naisaburi, Rasulullah pernah bersabda:

وَحَدَّ شَنَا مُحَمَّدُ بْنُ عَبْدِ اللَّهِ بْنِ ثَمَيرٍ حَدَّثَنَا أَبِي حَدَّثَنَا سُفِّيَانُ عَنْ نَبِيِّنَا مُحَمَّدٍ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ إِنَّ هَذَا الظَّأَأْعُونَ رِجْزُ سُلْطَنٍ عَلَى مَنْ كَانَ قَبْلَكُمْ مِنْهَا فَرَارًا مِنْهُ أَوْ عَلَى بَنِي إِسْرَائِيلَ فَإِذَا كَانَ بِأَرْضٍ فَلَا تَخْرُجُوا وَإِذَا كَانَ بِأَرْضٍ فَلَا تَدْخُلُوهَا

Artinya;

Dan telah menceritakan kepada kami [Muhammad bin 'Abdillah bin Numair]; Telah menceritakan kepada kami [Bapakku]; Telah menceritakan kepada kami [Sufyan] dari [Muhammad bin Al Mukandir] dari ['Amir bin Sa'd] dari [Usamah] dia berkata; Rasulullah shallallahu 'alaihi wasallam bersabda: "Penyakit Thaa'uun ini adalah suatu peringatan Allah yang ditimpakan kepada umat sebelum kalian atau kepada Bani Israil. Maka apabila wabah itu berjangkit di negeri tempat kamu berada, janganlah kamu keluar lari daripadanya. Dan bila penyakit itu berjangkit di suatu negeri, janganlah kamu masuk ke negeri itu" (HR. Imam Muslim).

Secara bahasa *tha'un* berarti penyakit pes atau wabah penyakit menular, *tha'un* cukup menggelisahkan masyarakat pada masa itu. Akan tetapi *tha'un* maupun mikroorganisme lainnya seperti bakteri merupakan salah satu tanda kekuasaan Allah SWT. Di dalam tafsir Al Misbah surat An Nuur ayat 45 dijelaskan Allah adalah pencipta segala sesuatu yang dikehendaki-Nya. Allah menciptakan berbagai macam jenis hewan dari segi jenis, potensi dan perbedaan lainnya. Hewan-hewan tersebut ada yang berjalan menggunakan perut (Gastropoda), dan hewan lainnya. Allah menciptakan berbagai macam jenis hewan untuk menunjukkan kekuasaan dan pengetahuan-Nya. Dia adalah

dzat yang berkehendak dan Maha Kuasa atas segala sesuatu. Selain itu didalam Al-Qur'an Surat Al Baqarah ayat 26 Allah SWT berfirman:

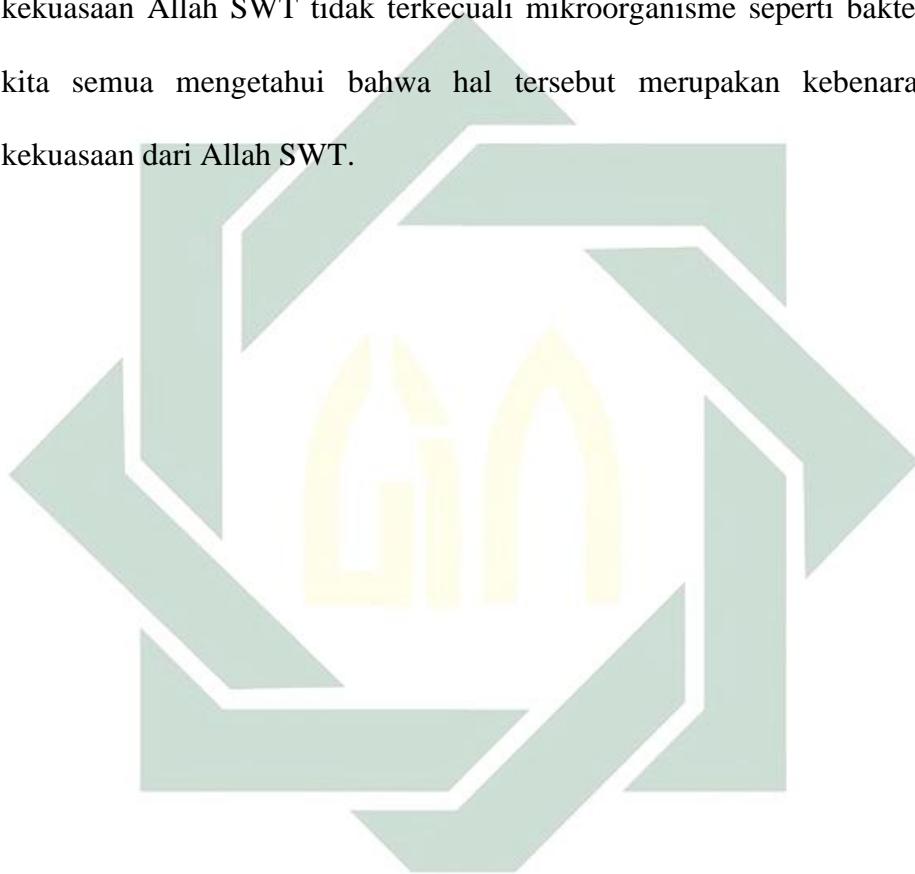
إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا فَأَمَّا الَّذِينَ آمَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ
الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي
بِهِ كَثِيرًا وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ

Artinya :

"Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih kecil dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka. Dan adapun mereka yang kafir mengatakan : "Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan?." dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah, dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. Dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik. (QS.Al-Baqarah : 26)"

Di dalam tafsir Al Misbah surat Al Baqarah ayat 26 menjelaskan bahwa Allah memberikan perumpamaan kepada manusia untuk menjelaskan segala hakikat dengan berbagai macam makhluk hidup maupun dengan benda, baik kecil atau besar. Orang-orang yang tidak beriman, akan menganggap remeh perumpamaan dengan makhluk kecil seperti lalat, laba-laba, dan nyamuk atau yang lebih kecil dari itu. Allah memberitahukan bahwa Allah tidak pernah menganggap remeh sesuatu pun untuk dijadikan sebagai perumpamaan, meskipun sesuatu itu kecil seperti nyamuk atau bahkan lebih kecil dari nyamuk. Hanya orang-orang beriman yang dapat mengetahui maksud perumpamaan itu dan mengetahui bahwa hal tersebut merupakan kebenaran dari Allah. Sedangkan orang-orang kafir menerima dengan sikap ingkar dengan mengatakan "Apa yang dikehendaki Allah dengan perumpamaan ini?". Perumpamaan ini akan menjadi sebab kesesatan bagi orang yang tidak mencari kebenaran, dan bagi orang yang beriman yang mencari kebenaran

akan mendapatkan petunjuk dari Allah. Firman Allah dalam surat Al Baqarah ayat 26 di atas menunjukkan bahwa Al-Qur'an diturunkan agar manusia mencari kebenaran yaitu dengan ilmu pengetahuan. Oleh karena itu sudah sepatutnya bagi orang-orang yang beriman untuk mempelajari segala sesuatu kekuasaan Allah SWT tidak terkecuali mikroorganisme seperti bakteri agar kita semua mengetahui bahwa hal tersebut merupakan kebenaran dan kekuasaan dari Allah SWT.



BAB VI

PENUTUP

A. Simpulan

1. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pada 30 sampel air yang diambil dari lingkungan UIN Sunan Ampel Surabaya, 30 sampel positif bakteri *coliform*, 28 sampel positif bakteri *Escherichia coli* dan 12 sampel positif terhadap bakteri *Escherichia coli* O157:H7.
 2. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa strain *E. coli* O157:H7 dari berbagai sampel air memiliki ekspresi virulen gen yang berbeda-beda diantaranya *stx1*, *fliCh7*, *eaeA*, dan *rfbE*. Dari sampel yang positif terhadap bakteri *Escherichia coli* O157:H7, sampel nomor 26 (S26) paling banyak mengekspresikan gen yaitu *stx1*, *fliCh7*, dan *eaeA*.

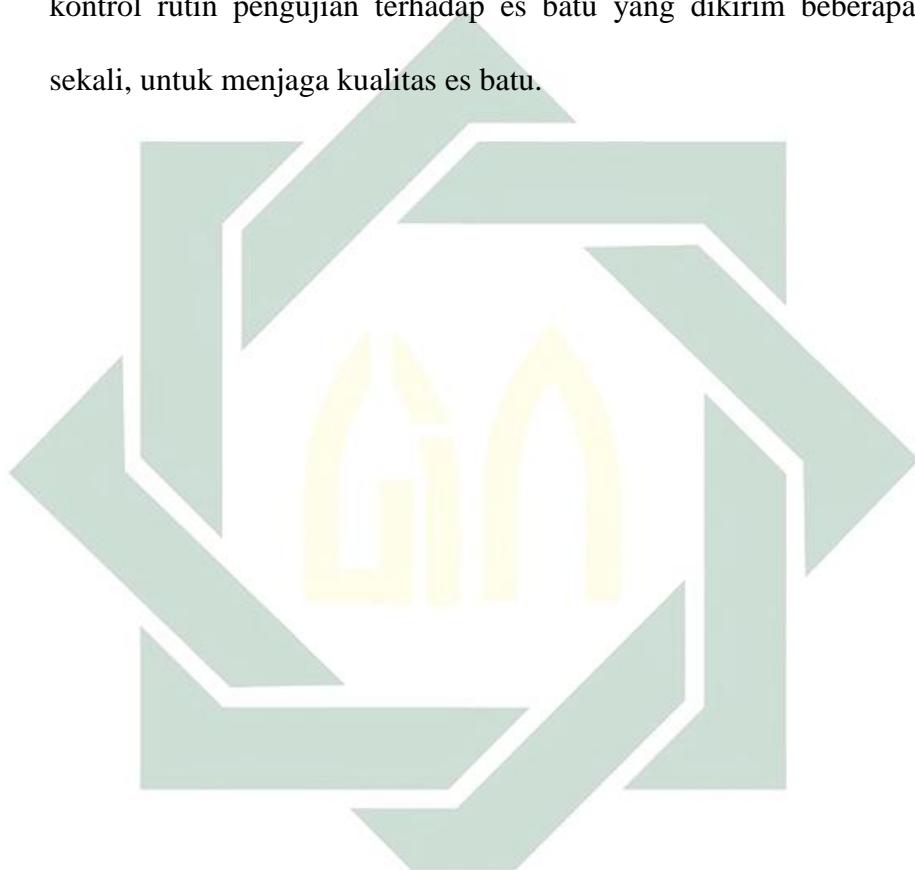
Dengan adanya hasil temuan ini diharapkan dapat dijadikan sebagai bahan kajian atau pertimbangan untuk merumuskan langkah menuju *eco-campus*.

B. Saran

1. Perlu dilakukan *sequencing* terhadap sampel yang positif terhadap bakteri *Escherichia coli* O157:H7 untuk memastikan bahwa gen yang muncul benar merupakan gen yang diekspresikan oleh bakteri tersebut.
 2. Untuk sampel yang berasal dari air kran, air bak mandi dan selokan, diperlukan analisis dari semua fasilitas sistem pengairan dan pengoprasianya untuk dapat menentukan jalur masuknya

mikroorganisme seperti *coliform* dan *Escherichia coli* ke dalam sistem pengairan.

3. Untuk sampel yang berasal dari es batu diperlukan adanya penyeleksian distributor es batu yang terjamin kebersihannya, selain itu diperlukan kontrol rutin pengujian terhadap es batu yang dikirim beberapa bulan sekali, untuk menjaga kualitas es batu.



DAFTAR PUSTAKA

- Adam, M. R. & Moss, M. O. 1995. *Food Microbiology*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge University Press, USA.

Al-Asqalany, H. I. I. H. 2008. *Bulughul Maram Min Adillatil Akhkaam Versi 2.0*. Pustaka Al-Hidayah, Tasikmalaya.

Amanda, U. D., & Cartealy, I. C. 2015. Isolasi RNA total dari mesokarp buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera). *Proceeding Semin. Nas. Masy. Biodivers. Indones.* 1: 171–176.

Andrian, G. B., Fatimawali & Novel S. K. 2014. Analisis Cemaran Bakteri Coliform dan Identifikasi *Escherichia coli* pada Air Isi Ulang dari Depot di Kota Manado. *Jurnal Ilmiah Farmasi Pharmacon.* 3: 325-333.

Araújo, W. L., de Angelis, D. A., & Azevedo, J. L. 2004. Direct RAPD evaluation of bacteria without conventional DNA extraction. *Braz Arch Biol Technol.* 47: 375-380.

Arie, I. W. 2015. Resensi Biologi Molekular Adalah Ilmu yang Menyenangkan dan Mudah. *Jurnal Teknoains.* 4: 101-198.

Ausubel, F. M., R. Bent, R. E. Kingston, J. G. Sediman, J.A. Smith, & K. Struhl. 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc, USA.

Aziz, D. A., Marlina, & Yuherman. 2009. Karakterisasi Gen Penghasil Toksin pada Bakteri Patogen *Escherichia Coli* O157 dalam Rangka Penanggulangan Penyakit Diare Berdarah pada Masyarakat. *Artikel. Universitas Andalas, Sumatera Barat.*

Bahar, Elizabeth. 2013. *Aplikasi Metoda Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Terhadap Gen MPB64 (Rv3036c) Sebagai Diagnosis Cepat Infeksi M. Tuberculosis*. Lampung.

Barlow, R. S., K. S. Gobius., & P. M. Desmarchelier. 2006. Shiga toxin-producing *E. coli* in ground beef. *Int. J. Food Microbiol.* 111:1-5.

Bentancor, A., Rumi, M. V., Carbonari, C., Gerhardt, E., Larza, M., Vilte, D. A., Creydt, V. P., & Chinen, I. 2012. Profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats and genetic relationships with isolates from cattle, meat and humans. *Vet Microbiol.* 156: 336–342.

- Boerling, P., Mc Ewen, S. A., Wilson, J. B., Johnson, R. P. & Gyles, C. L. 1999. Association between virulence factors of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 497–503.
- BPOM. 2008. Info POM. *Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia*. Vol. 9, No. 2
- Brooks, G. F., Butel, J. S., & Morse, S.A. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran Alih Bahasa*. Salemba Medika, Jakarta.
- Burden, D. W., & Whitney, D. B. 1995. *Biotechnology: Proteins to PCR*. Birkhauser Verlag AG Boston, Berlin.
- Carter, A. O., Borczyk, A. A., Carlson, J. A., Harvey, B., Hockin, J. C., & Karmali, M. A. 1987. A Severe Outbreak Of *Escherichia Coli* O157:H7-Associated Haemorrhagic Colitis in a Nursing Home. *N Engl J Med*. 317:1496.
- Chapman, P. A., Ellin, M., Ashton, R. & Shafique, W. 2001. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *E. coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *International Journal of Food Microbiology*. 68 (1–2): 11-20.
- Christina, W. O. & Bertil, K. 2005. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Scandavian Journal of Infectious Disease*. 37:405-416.
- Ciesla, W. P, Guerrant, R. L. Infectious Diarrhea. In: Wilson WR, Drew WL, Henry NK, et al editors. 2003. *Current Diagnosis and Treatment in Infectious Disease*. Lange Medical Books, New York.
- Cowan, S. T. 1984. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 2nd ed. Cambridge University Press, USA.
- Deak, T., Chen, J., & Beuchat, L. R. 2000. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Appl Environ Microbiol*. 66 (10): 4340- 4344.
- Drasar, B. S. & Hill, M. J. 1974. *Human Intestinal Flora*. Academic Press Ltd, London.
- Dundas, S., Andrew Todd, W. T., Stewart, A. I., Murdoch, P. S., Chaudhuri, A. K. R. & Hutchinson, S. J. 2001. The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: Risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients. *Clinical Infectious Diseases* 33: 923-931.

Fatchiyah., Estri Laras A., Sri Widyarti, & Sri Rahayu. 2011. *Biologi Molekular: Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga, Jakarta.

Fratamico, M. P., Solomon K. S., Martin W., & Ming Y. D. 1995. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(8): 2188-2191.

Felds, P. I., Blom, K., Hugues, H. J., Helsel, L. O., Feng, P. & Swaminathan, B. 1997. Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 1066-1070.

Fu, Z., Rogelj, S. & Kieft, T. L. 2005. Rapid detection of Escherichia coli O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR. *Int J Food Microbiol.* 99: 47–57.

Gaffar, S., 2007. *Buku Ajar Bioteknologi Molekul*. Universitas Padjajaran, Bandung.

Griffin, P. M. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and Other Hemorrhagic *Escherichia coli*. In *Infection of the Gastrointestinal Tract*, edited by Blaster, M.J., Smith, P.D.

Griffin, P. M., Tauxe, R. V. 1991. The Epidemiology Of Infections Caused by Escherichia coli O157:H7, Other Enterohaemorrhagic *E. coli*, and the Associated Haemolytic Uraemic Syndrome. *Epidemiol* 3:60-98.

Guerrant, R. L., Gilder, T. V., & Steiner, T. S. 2001. Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*. 32:331-51.

Hill, W. E., & Jinneman, K. C. 2000. *Principles and Application of Genetic Techniques for Detection, Identification, and subtyping of Food-Associated Pathogenic Microorganism in The Microbiological Safety and Quality of Food*. Vol. II (ed) Barbara ML, Baird- Parker TC, Gould GW. Maryland Aspen Publishers, Inc, Gaithersburg.

Hurley, B. P., Jacewicz, M., Thorpe, C. M., Lincicome, L. I., King, A. J., Keusch, G. T., & Acheson, D. W. 1999. Shiga Toxin 1 and 2 Translocation Differently Across Polarized Intestinal Epithelial Cells. *Infect Immun.* 67:6670-7.

Imam Abul Husain Muslim bin Al-Hajjaj Al-Naisaburi. TT. *Shahih Muslim*.
Darul Fikri, Beirut.

- Innis, M. A *et al.* 1990. PCR Protocol a Guide to Methods and Applications. Academic Press, California.

Jeshveen, S. S., Chai, L. C., Pui, C. F. & Son, R. 2012. Optimization of multiplex PCR conditions for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 virulence genes. *International Food Research Journal* 19(2): 461-466.

Karmali, M. A., Steele, B.T., Petric, M. & Lim, C. 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*. 1: 619-620.

Komalasari, K. 2009. Pengaruh Perbandingan Volume Darah dan Lisis Buffer Serta Kecepatan Sentrifugasi Terhadap Kualitas Produk DNA pada Sapi *Friesian holstein* (Fh). Institut Pertanian Bogor. Skripsi. Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Krauss, H., A. Weber, M. Appel, B. Enders, H.D. Isenberg, H.G. Schiefer, W. Slenczka, A.V. Graevenitz, & H. Zahner. 2003. *Zoonoses. Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans*. 3rd ed. ASM Press, USA.

Lakswendra, A. 2013. *Eco Campus* (Studi Deskriptif Tentang Perilaku Mahasiswa ITS Terhadap Program *Eco Campus*). Jurnal. Fakultas Ilmu Sosial dan Ilmu Politik, Universitas Airlangga, Surabaya.

Lahtia, E., Keskimaeki, M., Rantala, L., Hyvoenen, P., Siitonen, A. & Honkanen-Buzalski, T. 2001. Occurrence of *Escherichia coli* O157 in Finnish cattle. *Vet Microbiol*. 79:239–251.

Law, D. 2000. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli*. *Journal of Applied Microbiology* 88: 729-745.

Louise, C. B. & Obrig, T. G. 1995. Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *Journal of Infectious Diseases* 172(5): 1397-140.

Lung, E. 2003. *Acute Diarrheal Disease In: Friedman SL, McQuaid KR, Grendell JH. Current Diagnosis and Treatment in Gastroenterology 2nd edition*. Lange Medical Books, New York.

Madigan, M. T., Martinko, S. M., Brook, T.D. 2009. *Biology of Microorganism*. Person Practice Hall, New Jersey.

March, S.B. & Ratnam, S. 1986. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 23: 869-872.

- Marks Dawn B., Marks Allan D., & Smith Colleen M. 2000. *Biokimia kedokteran dasar : Sebuah pendekatan klinis*, Edisi 1. EGC, Jakarta.
- Martin, R., 1996. *Gel Electrophoresis: Nucleid Acid*. Bios Scientific Publisher, Oxford.
- Merante, F., Raha, S., & Ling, M., 1998. *Molecular Biomethodes Handbook*. Humana Press Inc, New Jersey.
- Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A. & Yanagawa, H. 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai city, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *American Journal of Epidemiology* 150: 787-796.
- Muladno. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetika*. Edisi Ke-2. Penerbit IPB Press, Bogor.
- Nataro, J. P. & Kaper, J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Review* 11: 142-201.
- Padhye, V. V., York, C., & Burkiewicz, A. 1997. *Nucleic Acid Purification On Silica Gel and Glass Mixtures*. US Patent 5658548 CI.
- Pelczar, Michael, J., E.C.S Chan. 1988. *Dasar – Dasar Mikrobiologi*. UI Press, Jakarta.
- Paton, A.W. & Paton, J.C. 1998. Detection and characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by using Multiplex PCR Assays for stx1, stx2, eaeA, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J Clin Microbiol.* 36: 598–602.
- Perna, N. T., Ill, G. P., Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J., & Kirkpatrick, H. A. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*. 409:529-31.
- Purwanto, A. E. & R. D. Sulistyastuti. 2007. *Metode Penelitian Kuantitatif untuk Administrasi Publik dan Masalah-masalah Sosial*. Gava Media, Yogyakarta.
- Queipo-Ortuño, M. L., Colmenero, J. D. D., Macias, M., Bravo, M. J., & Morata, P. 2008. Preparation of Bacterial DNA Template by Boiling and Effect of Immunoglobulin G as an Inhibitor in Real-Time PCR for Serum Samples from Patients with Brucellosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 15(2), 293-296.

- Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P.M. & Swerdlow, D. L. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases* 11: 603-609.
- Reischl, U., Linde, H. J., Metz, M., Leppmeier, B., & Lehn, N. 2000. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2429-2433.
- Rekam Medis RSI Jemursari. 2014-2017. Rekap Jumlah Penderita Penyakit Diare. RSI Jemursari, Surabaya.
- Rey, J., Sa'nchez, S., Blanco, J. E., Hermoso de Mendoza, J., Hermoso de Mendoza, M., Garcı'a, A., Gil, C., & Tejero, N. 2006. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *Int J Food Microbiol.* 107: 212-217.
- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., Mc Gee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A. & Cohen, M. L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*. 308: 681-685.
- Rompre', A., Pierre, S., Julia, B., Marie'-Renee de-Roubin, & P. Laurent. 2002. Detection and Enumeration of Coliforms in Drinking Water: Current Methodes and Emerging Approaches. *Journal of Microbiological Methodes*. 49: 31-45.
- Rowe, P. C., Orrbine, E., Lior, H., Wells, G. A., Yetisir, E., Clulow, M., & McLaine, P. N. 1998.. Risk of haemolytic uraemic syndrome after sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: results of a Canadian collaborative study. *Investigators of the Canadian Pediatric Kidney Disease Research Center. J Pediatr.* 132:777.
- Salyers, A. A., Whitt, D. D. 1994. *Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach*. ASM Press, USA.
- Sambrook, J. & David W. Rusell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, Joseph. 2007. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sayutri, I., Zulfarina, & Bambang, S. 2011. *Kualitas Air Minum pada Depot Air Minum Isi Ulang yang Berada di Kawasan Universitas Riau Pekanbaru*. Perpustakaan Universitas Riau, Riau.

- Sengupta, C. & Rita Saha. 2013. Review Article: Understanding Coliforms-A Short Review. *International Journal of Advance Research*. 1: 16-25.

Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir al-Misbah; Pesan, Kesan, dan Keserasian Alquran Vol. 5*. Lentera Hati, Jakarta.

Siegler, R. L. 1995. Hemolytic uremic syndrome in children. *Current Opinion in Pediatrics*. 7: 159-163.

Slutsker, L., Ries, A. A., Greene, K. D., Wells, J. G., Hutwagner, L., & Griffin, P. M. 1997. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: Clinical and Epidemiologic Features. *Ann Intern Med*. 126(7): 505-13.

Suardana, I. W., Swacita, I. B. N., Ratnawati, N. L. K. A., Sumiarto, B., & Lukman, D. W. 2005. Identifikasi *Escherichia coli* O157:H7 dan *Shiga Toxin Escherichia coli* (STEC) pada Daging, Feces Hewan dan Feces Manusia di Kabupaten Badung Propinsi Bali. Laporan Penelitian Hibah Pekerti Tahap I.

Sudjadi. 2008. *Bioteknologi Kesehatan*. Kanisius, Yogyakarta.

Sujaya, I. N., N.P. Desy Aryantini., N.W. Nursini., S.G. Purnama., N.M.U. Dwipayanti., I G. Artawan., & I M. Sutarga. 2010. Identifikasi Penyebab Diare di Kabupaten Karangasem, Bali. *Jurnal Kesehatan Masyarakat Nasional*. 4(4): 186-192.

Sulandari, S. & Arifin, M.S. 2003. Panduan Praktis Laboratorium DNA. 77.

Sulistyaningsih, E. 2007. Polymerase Chain Reaction (PCR): Era Baru Diagnosis dan Managemen Penyakit Infeksi. *Biomedis*. 1(2) : -.

Switzer, R. L., Liam F. & Garrity. 1999. *Experimental Biochemistry. Theory and Exercises in Fundamental Methods, third edition*. Blackwell Scientific Publisher, Oxford.

Tim Asisten Praktikum Mikrobiologi Lingkungan. 2014. *Modul Praktikum Mikrobiologi Lingkungan*. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya, Malang.

Tim Penyusun. 2011. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2009*. Kementrian Kesehatan RI. Jakarta.

Tim Penyusun. 2014. *Profil Dinas Kesehatan Kota Surabaya Tahun 2014*. Dinas Kesehatan Pemerintah Kota Surabaya. Surabaya.

Tim Penyusun. 2015. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2014*. Kementerian Kesehatan RI. Jakarta.

Tim Penyusun. 2015. *Profil Dinas Kesehatan Kota Surabaya Tahun 2015*. Dinas Kesehatan Pemerintah Kota Surabaya. Surabaya.

Tim Penyusun. 2016. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2015*. Kementerian Kesehatan RI. Jakarta.

Tutenel, A., Pierard, D., Jan, V.H., & L. D Zutteri. 2003. Molecular Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 Contamination routes in a Cattle Slaughterhouse. *Journal of Food Protection*. 66(9): 1564-1569.

WHO. 2010. The World Health Report 2010. Diakses pada 20 Mei 2017. <<http://www.who.int/whr/2010/en/index.html>>.

Widiyanti, M. & Ristiani. 2004. Analisis Kualitatif Bakteri Koliform pada Depo Air Minum Isi Ulang di Kota Singaraja Bali. *Jurnal Ekologi Kesehatan*. 3(1): 64 – 73.

Yusuf, Zuhriana. 2010. PCR. *Makalah*. FIKK, Universitas Negeri Gorontalo, Gorontalo.

Zakki, G. H. 2015. Pengetahuan dan Perilaku Preventif Terhadap Bakteri *E. coli* pada Masyarakat Kecamatan Gondomanan di Kota Yogyakarta. *Skripsi*. Fakultas Ilmu Pendidikan, Universitas Negeri Semarang, Semarang.