

**DETEKSI BAKTERI *Escherichia coli* O157:H7
PADA SAMPEL AIR DI LINGKUNGAN
UIN SUNAN AMPEL SURABAYA
MENGUNAKAN 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

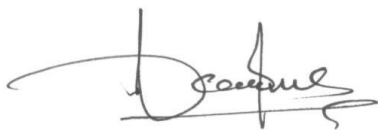
Program Studi : Biologi

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.

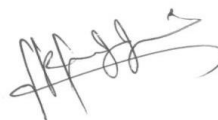
Surabaya, 6 Juli 2018

Pembimbing I

Pembimbing II



Yuanita Rachmawati, M. Sc.
NUP. 201603302



Saiku Rokhim, M. KKK.
NIP. 198612212014031001

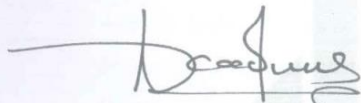
**DETEKSI BAKTERI *Escherichia Coli* O157:H7 PADA SAMPEL AIR DI
LINGKUNGAN UIN SUNAN AMPEL SURABAYA MENGGUNAKAN
METODE MULTIPLEX PCR**

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)

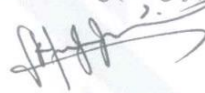
Susunan Dewan Penguji

Surabaya, 31 Juli 2018
Pembimbing (Penguji) I



Yuanita Rachmawati, M. Sc.
NUP. 201603302

Surabaya, 25 Juli 2018
Pembimbing (Penguji) II



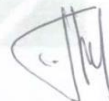
Saiku Rokhim, M. KKK.
NIP. 198612212014031001

Surabaya, 25 Juli 2018
Penguji III



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

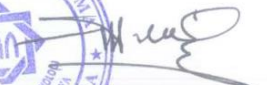
Surabaya, 25 Juli 2018
Penguji IV



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

Mengetahui
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Sunan Ampel Surabaya




Dr. Fatmawati, M. Ag.
NIP. 196512211990022001



**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 : khairun.nihayati15@gmail.com

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

☒ Skripsi ☐ 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

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya 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 SAMPL	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</i> (PCR)	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. Peosedur 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 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

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,

[illegible]

[illegible]

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

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي 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).”

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 menghimbau masyarakat agar waspada terhadap penyakit yang disebabkan bakteri *E. coli*. Sebab, menurut 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

أَوَلَمْ يَرَ الَّذِينَ كَفَرُوا أَنَّ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضَ كَانَتَا رَتْقًا فَفَتَقْنَاهُمَا^ط وَجَعَلْنَا مِنَ الْمَاءِ كُلَّ شَيْءٍ حَيٍّ^ط أَفَلَا يُؤْمِنُونَ

“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)

[illegible]

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

Batasan Penelitian

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

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).

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*.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

tu hemolysin dikode oleh gen *hlyE* dan dikode oleh gen *rfbE* dan (1997).

Escherichia coli O157:H7

biologi

mikrobiologi biasa disebut dengan metode dengan menginokulasi, mengkultur dan menggunakan untuk deteksi bakteri *Escherichia coli* O157:H7 dia Sorbitol Mac Conkey agar (SMAC) yang n empedu, sumber karbohidrat, sorbitol dan suatu ondisi yang normal, *Escherichia coli* O157:H7 tidak pitol, jika terdapat bakteri *Escherichia coli* O157:H7

bakteri *Escherichia coli* O157:H7 (March dan Ratnam, 1986). Akibatnya, kelemahan deteksi secara mikrobiologi yaitu waktu yang dibutuhkan relatif lama dalam proses pengujian.

2. Molekular

Biologi molekular yaitu pengujian yang dilakukan untuk mempelajari aktivitas biologi pada level molekular, termasuk di antaranya perbedaan tipe DNA, RNA, protein, dan biosintesisnya (W., 2015). Berikut ini langkah-langkah dilakukan pada pengujian molekular:

a. Isolasi DNA

Isolasi DNA adalah serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen sel lainnya. Umumnya DNA (*Deoxyribonucleic acid*)

bakteri *Escherichia coli* O157:H7 (March dan Ratnam, 1986). Akibatnya, kelemahan deteksi secara mikrobiologi yaitu waktu yang dibutuhkan relatif lama dalam proses pengujian.

2. Molekular

Biologi molekular yaitu pengujian yang dilakukan untuk mempelajari aktivitas biologi pada level molekular, termasuk di antaranya perbedaan tipe DNA, RNA, protein, dan biosintesisnya (W., 2015). Berikut ini langkah-langkah dilakukan pada pengujian molekular:

a. Isolasi DNA

Isolasi DNA adalah serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen sel lainnya. Umumnya DNA (*Deoxyribonucleic acid*)

bakteri *Escherichia coli* O157:H7 (March dan Ratnam, 1986). Akibatnya, kelemahan deteksi secara mikrobiologi yaitu waktu yang dibutuhkan relatif lama dalam proses pengujian.

2. Molekular

Biologi molekular yaitu pengujian yang dilakukan untuk mempelajari aktivitas biologi pada level molekular, termasuk di antaranya perbedaan tipe DNA, RNA, protein, dan biosintesisnya (W., 2015). Berikut ini langkah-langkah dilakukan pada pengujian molekular:

a. Isolasi DNA

Isolasi DNA adalah serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen sel lainnya. Umumnya DNA (*Deoxyribonucleic acid*)

bakteri *Escherichia coli* O157:H7 (March dan Ratnam, 1986). Akibatnya, kelemahan deteksi secara mikrobiologi yaitu waktu yang dibutuhkan relatif lama dalam proses pengujian.

2. Molekular

Biologi molekular yaitu pengujian yang dilakukan untuk mempelajari aktivitas biologi pada level molekular, termasuk di antaranya perbedaan tipe DNA, RNA, protein, dan biosintesisnya (W., 2015). Berikut ini langkah-langkah dilakukan pada pengujian molekular:

a. Isolasi DNA

Isolasi DNA adalah serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen sel lainnya. Umumnya DNA (*Deoxyribonucleic acid*)

bakteri *Escherichia coli* O157:H7 (March dan Ratnam, 1986). Akibatnya, kelemahan deteksi secara mikrobiologi yaitu waktu yang dibutuhkan relatif lama dalam proses pengujian.

2. Molekular

Biologi molekular yaitu pengujian yang dilakukan untuk mempelajari aktivitas biologi pada level molekular, termasuk diantaranya perbedaan tipe DNA, RNA, protein, dan biosintesisnya (W., 2015). Berikut ini langkah-langkah dilakukan pada pengujian molekular:

a. Isolasi DNA

Isolasi DNA adalah serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen sel lainnya. Umumnya DNA (*Deoxyribonucleic acid*)

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 komplemen 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 ilmuwan bernama

1) **Komponen PCR**

a) DNA Template

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*

b) Primer

primer *reverse*. Susunan primer menentukan ke arah proses PCR. Pasangan primer terdiri dari 2 oligonukleotida yang mengandung 18-28 oligonukleotida dan mempunyai 60% GC *content* yang digunakan untuk mengawakan DNA (Yusuf, 2010). Sequen primer yang lebih panjang dapat memicu amplifikasi produk PCR non spesifik. Oleh karena itu primer penting dalam menentukan spesifitas dan

Spesifitas PCR sangat tergantung pada suhu *melting* (T_m) primer, yaitu suhu dimana separuh jumlah primer *annealing* pada *template*. T_m kedua primer serupa (dalam $2-4^{\circ}\text{C}$) dan diatas 60°C . Konsentrasi primer biasanya optimal pada $0.1-0.5\ \mu\text{M}$. Konsentrasi primer yang terlalu tinggi akan menyebabkan *mispriming* (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).

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

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

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)

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

annealing primer. Konsentrasi dNTP yang rendah dapat meminimalkan mispriming pada daerah yang memiliki pasangan basa yang tidak sesuai, sehingga menurunkan kemungkinan perantaraan nukleotida. Oleh karena itu spesifitas dan ketepatan PCR akan meningkat dengan konsentrasi dNTP yang lebih rendah (Sulistiyanto, 2017).

e) Larutan Buffer

Larutan buffer yang biasa digunakan untuk PCR umumnya mengandung 10-50 mM Tris-HCl (pH 8.0, 20°C); 50 mM KCl; 0.1% gelatin atau BSA (Sulistiyanto, 2017).

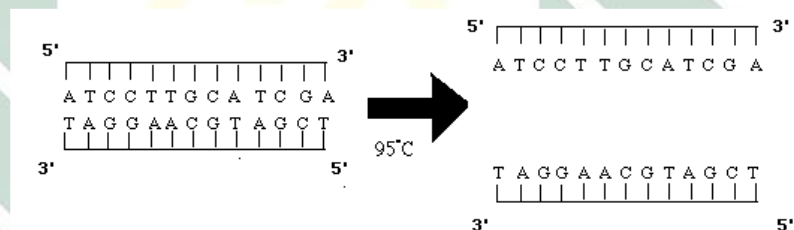
umumnya mengandung 10-50 mM Tris-HCl (pH 8.0-9.0; 20°C); 50 mM KCl; 0.1% gelatin atau BSA (*Bovine Serum Albumin*); Tween 20 sebanyak 0.01% atau Triton X-100 dengan Triton X-100 sebanyak 0.1%; di samping itu, ditambahkan 1.5 mM MgCl₂ (Yusuf, 2019). Konsentrasi ion ini mempengaruhi beberapa aspek PCR, seperti *annealing* primer, suhu pemisahan untai template, efisiensi PCR, spesifitas produk, pembentukan primer dimers, aktivitas dan ketepatan enzim *Taq Polymerase*.

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

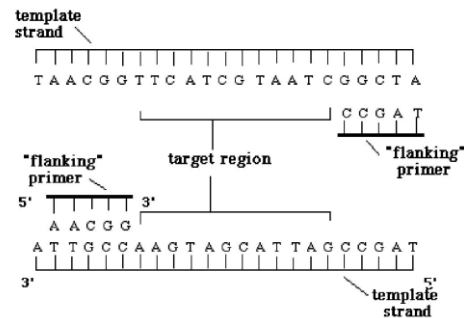
Pada tahap ini untai ganda DNA dipisahkan menjadi untai tunggal, melalui proses pemanasan pada suhu kurang lebih 94°C Untai DNA tunggal yang sudah terpisah akan menjadi cetakan bagi untai DNA baru yang akan dibuat.



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

b) Penempelan (*Annealing*)

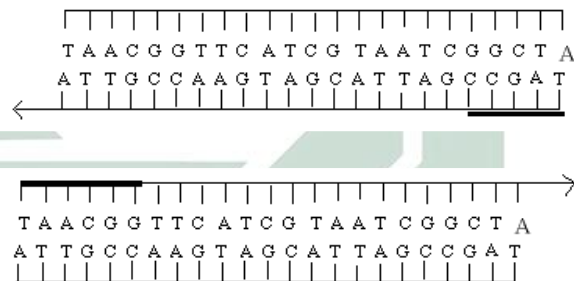
Annealing merupakan proses penempelan primer pada DNA template. Proses penempelan primer tersebut dibantu oleh enzim DNA *Taq polymerase*. Umumnya, proses *annealing* atau penempelan primer terjadi pada suhu kurang lebih 55°C selama 30-60 detik.



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 sekuens 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

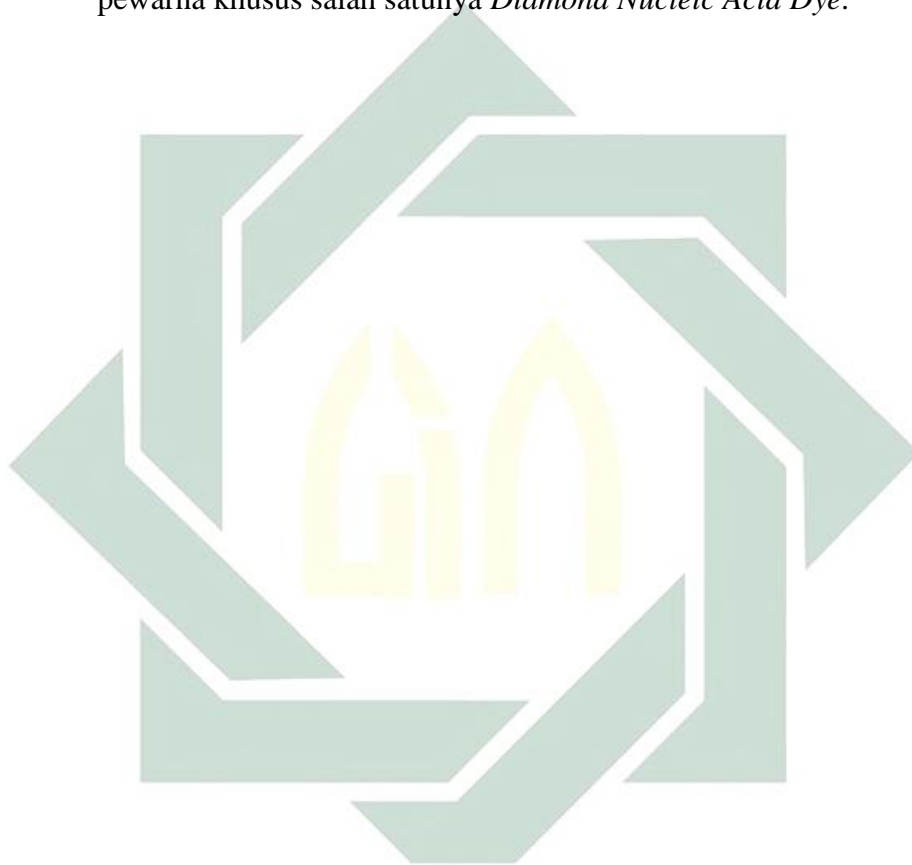
Elektroforesis gel agarosa adalah metode yang umum digunakan untuk pemisahan, identifikasi, dan purifikasi fragmen DNA (Sudjadi, 2008). Salah satu faktor yang berpengaruh dalam laju migrasi DNA untuk memisahkan molekul DNA berdasarkan berat molekulnya yaitu konsentrasi gel agarosa yang digunakan dalam 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 diperoleh 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*.



B. Hipotesis Penelitian

terjadi infeksi oleh bakteri *Escherichia coli* O157:H7 yang disebabkan oleh konsumsi air yang terkontaminasi. Berdasarkan hal tersebut ditemukan bakteri *Escherichia coli* O157:H7 pada sampel air di lingkungan UIN Sunan Ampel Surabaya atau bakteri *Escherichia coli* O157:H7 berpotensi mencemari air di lingkungan sekitar UIN Sunan Ampel Surabaya.

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)

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	Sarimehme toglu <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	TGTAACCTGGAAAGGTGGAGTATACA	<i>stx1</i>	210	Sarimehme toglu <i>et al.</i> , 2009
SLT1-R	GCTATTCTGAGTCAACGAAAAATAAC			
SLT1 1-F	GTTTTTCTTCGGTATCCTATTCC	<i>stx2</i>	484	Sarimehme toglu <i>et al.</i> , 2009
SLT1 1-R	GATGCATCTCTGGTCATTGTATTAC			
AE22	ATTACCATCCACACAGACGGT	<i>eaeA</i>	397	Sarimehme toglu <i>et al.</i> , 2009
AE20-2	ACAGCGTGGTTGGATCAACCT			
MFS1-F	ACGATGTGGTTTATTCTGGA	<i>hly</i>	166	Sarimehme toglu <i>et al.</i> , 2009
MFS1-R	CTTCACGTCACCATACATAT			

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

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

Tabel 4.3 Komposisi Perekasi Multiplex PCR

Pereaksi	Volume (µl)
Larutan <i>Mastermix</i> PCR	15 µl
DNA <i>Template</i>	9 µl
Forward dan reverse Primer @0.5 µl x 12 pasang primer	6 µl
<i>Nuclease Free Water</i>	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.

kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dibagi nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm ($\text{Å}260/\text{Å}280$), 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

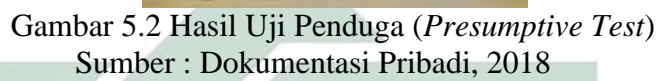
No	Sampel	Label	Karakteristik
1	Bak mandi SAC	S1	Warna bening Tidak berbau
2	Selokan depan Auditorium	S2	Warna bening Terdapat sedikit kotoran berwarna hitam Bau pesing

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

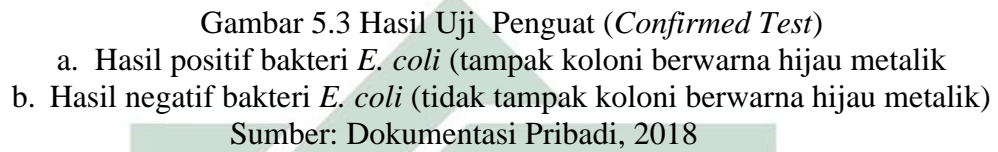
Pengambilan sampel dilakukan sesuai dengan standar baku yang telah diakui secara internasional maupun nasional. Pengambilan sampel yang diambil dari air sungai mengalir dilakukan dengan mencelupkan botol dengan posisi miring dan mulut botol melawan arus air. Jika pengambilan sampel air dilakukan pada 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 Ristiati, 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.



Tahap kedua yaitu, dilakukan uji penguat (*Confirmed Test*), hasil positif bakteri *coliform* pada media LB diinokulasikan kedalam media *Eosyn Methylene 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).



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

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).

A top-down view of a petri dish containing a confluent monolayer of cells. A small white label with the text "S19" is placed in the center of the dish.

Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2018

No	Sampel	Uji Penduga (Coliform)	Uji Penguat (<i>Escherichia coli</i>)
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 *boilling cell*. Metode *boilling 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 ($A_{260}/280$) (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)	A _{260/280}
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 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan konsentrasi DNA tertinggi diperoleh pada sampel nomor 4 (S4) dengan nilai konsentrasi 6.720 $\mu\text{g/ml}$. 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).

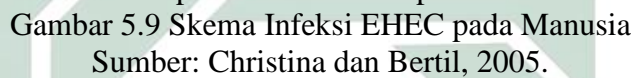
Sedangkan nilai kemurnian DNA yang di peroleh dilihat dari serapan panjang gelombang $\text{\AA}260/280$, nilai kemurnian terendah terdapat pada sampel nomor 15 (S15) yaitu sebesar 1.361, sedangkan nilai absorbansi $\text{\AA}260/280$ tertinggi diperoleh sampel nomor 8 (S8) yaitu sebesar 2.130. Isolat 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 menghambat proses pengujian secara molekular. Umumnya kontaminan yang terdapat pada isolat DNA yaitu berupa enzim, protein, dan lipid (Padhye *et al.*, 1997).

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>rfbE</i>
8	S25	<i>fliCh7</i> dan <i>eaeA</i>
9	S26	<i>fliC 7</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 lisisnya 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):



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

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 pengoprasiaannya 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

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 يَسْتَحْيِي 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 menerimanya 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

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 pengoprasiaannya untuk dapat menentukan jalur masuknya

B., Fatimawali & Novel S. K. 2014. Analisis C dan Identifikasi *Escherichia coli* pada Air Isi Ula nado. *Jurnal Ilmiah Farmasi Pharmacon*. 3: 325-3.

de Angelis, D. A., & Azevedo, J. L. 2004. Direct F ria without conventional DNA extraction. *Braz Ar* 380.

015. Resensi Biologi Molekular Adalah Ilmu yang lah. *Jurnal Teknoains*. 4: 101-198.

., R. Bent, R. E. Kingston, J. G. Sediman, J.A. Sm *urrent Protocols in Molecular Biology*. John Wile

Marlina, & Yuherman. 2009. Karakterisasi Gen F Bakteri Patogen *Escherichia Coli* O157 ulangan Penyakit Diare Berdarah pada Mas tas Andalas, Sumatera Barat.

- B., Fatimawali & Novel S. K. 2014. Analisis C... dan Identifikasi *Escherichia coli* pada Air Isi Ula... nado. *Jurnal Ilmiah Farmasi Pharmacon*. 3: 325-3...
- de Angelis, D. A., & Azevedo, J. L. 2004. Direct F... ria without conventional DNA extraction. *Braz Ar*... 380.
2015. Resensi Biologi Molekular Adalah Ilmu yang... lah. *Jurnal Teknoains*. 4: 101-198.
- ., R. Bent, R. E. Kingston, J. G. Sediman, J.A. Sm... *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wile...
- Marlina, & Yuherman. 2009. Karakterisasi Gen F... Bakteri Patogen *Escherichia Coli* O157... ulangan Penyakit Diare Berdarah pada Mas... tas Andalas, Sumatera Barat.

- 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. & Swamnathan, 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 Methodes 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., Keskimäki, M., Rantala, L., Hyvönen, 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.

