

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. HASIL PENELITIAN

Pada uji pendahuluan dilakukan isolasi DNA menggunakan CTAB. Isolasi DNA dari kultur murni *Escherichia coli* ATCC 25922 menggunakan CTAB memastikan bahwa primer 16E1 dan 16E2 dapat digunakan untuk mendeteksi *Escherichia coli* (Gambar 1). Hal ini ditunjukkan dengan terlihatnya pita DNA dengan ukuran sekitar 584 pasang basa.

Dari penelitian yang telah dilakukan, dengan metode PCR menggunakan primer 16E1 dan 16E2 yang merupakan primer spesifik gen penyandi 16S rRNA *Escherichia coli* didapat hasil pita DNA dengan ukuran sekitar 584 pasang basa. Hal ini menunjukkan bahwa sampel terbukti mengandung *E. coli*. Dapat diketahui bahwa dari sepuluh sampel air yang diperiksa, terdeteksi *E. coli* sebanyak empat sampel yaitu sampel 2 [lajur 4], 3 [lajur 5], 7 [lajur 9], dan 8 [lajur 10] (Gambar 2).

Dalam penelitian ini dilakukan uji konfirmasi hasil PCR dengan metode konvensional. Dalam media *Lactose Broth*, terbentuknya gas dalam tabung Durham menunjukkan hasil positif *Coliform*. Dari hasil dalam media *Lactose Broth* ini dapat diketahui jumlah *Coliform* per ml berdasarkan Tabel Angka Paling Mungkin atau *Most Probable Number* (MPN) menggunakan tiga tabung. Maka didapatkan hasil sampel 2 mengandung 4 *coliform/ml*, sampel

3 mengandung 64 *coliform/ml*, sampel 7 mengandung 28 *coliform/ml*, sampel 8 mengandung 7 *coliform/ml* (Tabel 1).

Sampel yang menunjukkan hasil positif mengandung *E. coli* dengan metode PCR ternyata juga menunjukkan hasil positif dengan metode konvensional. Hasil ini dikonfirmasi dengan uji biokimia yang menunjukkan hasil positif *Escherichia coli*.

## **B. PEMBAHASAN**

Penelitian diawali dengan melakukan uji pendahuluan yaitu ekstraksi dan isolasi DNA *Escherichia coli* dengan Metode Modifikasi Murray dan Thompson [1980] menggunakan *Cetyltrimethylammonium bromide/CTAB*. Metode ini dilakukan untuk memastikan bahwa primer 16E1 dan 16E2 dapat digunakan untuk mendeteksi *Escherichia coli*.

Dalam melakukan ekstraksi DNA menggunakan CTAB ini, *Escherichia coli* ATCC 25922 yang telah ditumbuhkan dalam *Nutrient Broth* selama 18-24 jam pada suhu 37°C disentrifus terlebih dahulu. Pelet sel yang didapat kemudian disuspensikan dengan dapar STET untuk membersihkan pelet sel dari sisa-sisa medium. Dapar STET dapat menghambat DNase dan mengganggu membran bagian luar amplop Gram negatif dengan memindahkan  $Mg^{2+}$  dari lapisan lipopolisakarida. Setelah disuspensikan dengan dapar STET, kemudian ditambahkan lisozim, SDS, dan proteinase-K. Lisozim adalah suatu enzim yang dapat mendegradasi peptidoglikan (26).

Setelah degradasi peptidoglikan, ditambahkan detergen Sodium Dodesil Sulfat (SDS) untuk proses lisis lebih lanjut. SDS berfungsi membantu disosiasi kompleks DNA-protein sehingga DNA dapat terlepas dari protein (27). Proteinase-K merupakan enzim proteolitik yang digunakan untuk menghilangkan protein lebih lanjut dengan cara mendegradasi protein. Proteinase-K tidak dapat terdenaturasi oleh SDS, bahkan bekerja efektif dengan adanya SDS (26).

Selanjutnya, debris sel termasuk protein dan polisakarida dihilangkan dengan penambahan 5% *cethyl trimethylammonium bromide*/CTAB. CTAB atau *hexadecyltrimethylammonium bromide* adalah surfaktan kationik yang membentuk kompleks yang tidak larut dengan asam nukleat pada konsentrasi NaCl di bawah 0,5 M. Kebanyakan karbohidrat dan protein akan tetap dapat larut pada kondisi tersebut dan dapat dipisahkan dari DNA yang diendapkan dengan cara disentrifugasi. CTAB digunakan untuk membersihkan asam nukleat dari deterjen. Setelah meningkatkan konsentrasi garam untuk melarutkan CTAB/kompleks asam nukleat yang mengendap, asam nukleat diendapkan dengan penambahan etanol. Deterjen yang lebih mudah larut dalam etanol daripada dalam air, tetap berada dalam supernatan setelah disentrifugasi. Interaksi CTAB dengan asam nukleat bersifat ionik, melalui kelompok fosfat dalam asam nukleat yang bermuatan negatif dengan deterjen yang bermuatan positif. (28).

Untuk memisahkan DNA dari debris sel dilakukan ekstraksi dengan menambahkan 624  $\mu$ l kloroform dan 26  $\mu$ l isoamilakohol (24:1 v/v) kemudian

disentrifus. Supernatan yang mengandung DNA dipipet secara seksama dan dipindahkan ke *microtube* baru dan steril. Selanjutnya ditambahkan isopropanol dingin untuk mengendapkan benang-benang putih DNA dengan sentrifugasi. Pelet DNA dicuci dengan etanol 70% dingin. Pelet DNA dikeringkan dari sisa etanol dan dilarutkan dalam *MilliQ*.

DNA yang didapat ini kemudian digunakan sebanyak 5  $\mu$ l sebagai *template* DNA untuk proses PCR. Produk amplifikasi PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis. Setelah elektroforesis, dengan UV transilluminator terlihat adanya pita DNA. Hasil ini memastikan bahwa primer 16E1 dan 16E2 serta proses PCR dapat digunakan untuk mendeteksi *E. coli*.

Setelah melakukan uji pendahuluan, dilakukan penelitian terhadap sampel air. Sampel diambil dari beberapa sumur yang digunakan warga di daerah padat penduduk di bantaran Kali Ciliwung di kawasan Bukit Duri, Jakarta Timur. Sampel diambil dari kawasan ini karena daerah ini merupakan daerah kumuh sehingga sangat berpotensi tercemar *E. coli*. Sampel diambil dari sumur, bukan dari air sungai karena warga tidak mengonsumsi air sungai. Identifikasi *E. coli* penting dilakukan untuk mengetahui kualitas sanitasi dan mengetahui adanya pencemaran air.

Sampel ditampung dalam botol vial 250 ml yang telah disterilkan dengan autoklaf. Botol ini harus disterilkan terlebih dahulu untuk memastikan bahwa tidak ada kontaminasi mikroorganisme dari botol. Sampel yang diambil segera dimasukkan ke lemari pendingin dan segera diuji, biasanya sehari sesudah pengambilan sampel. Jika sampel sudah disimpan terlalu

lama sebelum diuji, dikuatirkan adanya pertumbuhan lumut dan jumlah bakteri akan berkurang.

Sampel sebanyak 100 ml disentrifus dengan kecepatan  $10.000\times g$  selama 10 menit. Sentrifugasi dilakukan menggunakan empat tabung sentrifus 50 ml yang masing-masing diisi 25 ml sampel. Supernatan dibuang dengan hati-hati tetapi disisakan sedikit kemudian digabungkan dalam satu tabung sentrifus dan disentrifus kembali. Supernatan dibuang secara hati-hati dan disisakan sedikit, dipindahkan ke *microtube* 1,5 ml untuk disentrifus kembali menggunakan *microcentrifuge*. Supernatan dibuang secara seksama menggunakan mikropipet kemudian pelet disuspensikan dalam 2 ml *Nutrient Broth* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Inkubasi dalam *Nutrient Broth* ini bertujuan untuk memperbanyak jumlah bakteri yang akan diidentifikasi dengan metode PCR.

Kultur dalam *Nutrient Broth* yang telah diinkubasi diambil 1 ml dan dipindahkan ke *microtube* 1,5 ml untuk disentrifus dengan kecepatan  $14.000\times g$  selama 10 menit. Supernatan dibuang secara seksama kemudian ditambahkan 1 ml sisa kultur *Nutrient Broth* dan disentrifus kembali. Supernatan dibuang dan pelet ditambahkan air bebas nuklease. Air bebas nuklease digunakan untuk mencuci pelet dari media yang dapat mengganggu proses PCR. Air bebas nuklease juga berfungsi untuk media ekstraksi sel karena air bersifat hipotonik terhadap sel bakteri, maka air akan masuk ke dalam sel dalam jumlah besar sehingga menyebabkan lisis. Kemudian sampel dipanaskan pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit dan segera

ditempatkan di es. Sampel disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Supernatan yang mengandung DNA dipisahkan dari debris sel secara seksama dengan mikropipet dan dipindahkan ke *microtube* baru. Sampel kemudian dipanaskan lagi pada suhu 100°C selama 10 menit dan segera ditempatkan di es (24).

Saat pemanasan 100°C, dinding sel bakteri akan lisis, DNA keluar dari sel dan akan terbuka rantainya, maka harus segera diletakkan dalam es supaya rantai tetap dalam keadaan terbuka. Hal ini dapat mempermudah proses pendenaturasian rantai DNA selama PCR. Proses ekstraksi yang dilakukan menggunakan *boiling method* karena metode ini dianggap paling efisien dan ekonomis karena *E. coli* termasuk bakteri Gram negatif yang memiliki dinding sel tipis sehingga mudah lisis dengan pemanasan (29,30).

Proses PCR dalam penelitian ini menggunakan 2×PCR *Master Mix* yang mengandung *Taq* DNA polymerase, PCR *buffer*, MgCl<sub>2</sub>, dan dNTP. 2×PCR *Master Mix* adalah larutan dengan dua kali konsentrasi dari semua komponen yang dibutuhkan dalam PCR, kecuali primer dan *template* DNA. Keuntungan dari penggunaan PCR *Master Mix* ini adalah dapat menghemat waktu karena dapat langsung digunakan dan mengurangi kontaminasi karena berkurangnya langkah pipetasi yang harus dilakukan (31).

Selama penyiapan campuran PCR, semua reagen harus berada dalam es (suhu 4°C) supaya reagen tidak rusak. Sebelum digunakan, PCR *Master Mix* dan primer dibiarkan mencair di atas es, kemudian dihomogenkan dan *dispindown* selama 10 detik. Jumlah PCR *Master Mix*, primer, dan *MilliQ*

yang dibutuhkan untuk proses PCR dihitung terlebih dahulu kemudian dimasukkan dalam satu *microtube* 0,5 ml menggunakan mikropipet; dihomegenkan dan *dispindown* selama 10 detik. Campuran dibagi dalam masing-masing tabung kemudian dimasukkan *template* DNA.

Amplikon dianalisa dengan elektroforesis gel agarosa. Gel agarosa berperan sebagai sirkuit elektrik yang dapat memisahkan fragmen DNA. DNA *ladder*, kontrol positif, dan sampel masing-masing dicampur dengan *loading buffer* kemudian dimasukkan dalam sumur-sumur gel agarosa 2% yang telah diberi Etidium Bromida (EtBr) dan direndam dalam dapar TAE 1× di dalam alat elektroforesis. Pada permukaan gel tidak boleh ada gelembung udara karena dapat mengganggu proses pemisahan DNA. Gel sebaiknya ditunggu hingga agak dingin kemudian dituang dalam cetakan supaya cetakan tidak melengkung karena panas (27). EtBr yang digunakan sebagai pewarna DNA harus dimasukkan pada saat gel sudah agak dingin karena jika masih panas, uap gel akan bercampur dengan EtBr. Jika uap ini terhirup, dapat berbahaya karena EtBr bersifat mutagenik.

*Loading buffer* mengandung *xylene cyanol*, *ficoll*, dan Brom fenol biru. Zat warna Brom fenol biru dan *xylene cyanol* berfungsi sebagai penanda batas selesainya *loading*. Ficoll berfungsi meningkatkan densitas sehingga campuran DNA menjadi lebih berat dan mudah dimasukkan ke sumur (27).

Sebagai media penghantaran listrik, digunakan dapar TAE 1× karena dapar mengandung elektrolit yang baik sebagai penghantar listrik (27). Jumlah DNA yang dimasukkan dalam sumur harus sesuai dengan besar

sumur gel yang digunakan. Jika jumlah DNA berlebih, fragmen akan terlihat berekor. Sebaliknya, jika terlalu sedikit maka pita akan terlihat tipis. Selanjutnya, gel dialirkan arus listrik 50 V hingga warna indikator mencapai 1 cm tepi bawah gel. Oleh adanya arus listrik, DNA yang bermuatan negatif akan bermigrasi ke kutub positif sesuai ukuran pasang basa penyusunnya. Semakin kecil ukuran pasang basanya maka akan semakin mudah terbawa arus listrik dan berada di bagian gel yang dekat dengan anoda.

Lamanya proses pemisahan tergantung dari besar arus listrik dan konsentrasi gel. Semakin besar arus maka sampel akan bermigrasi menuju kutub positif lebih cepat. Konsentrasi gel yang semakin besar menyebabkan sampel akan berjalan menuju kutub positif lebih lambat karena hambatan yang ada semakin besar. Kecepatan berjalannya sampel menuju kutub positif harus optimal karena jika terlalu cepat pemisahannya tidak sempurna dan jika terlalu lambat maka sampel akan berdifusi ke dalam gel.

Pita-pita DNA diamati dalam UV trasilluminator dan penentuan ukuran fragmen dilakukan dengan cara membandingkan mobilitas fragmen dengan DNA standar yang telah diketahui ukurannya. Visualisasi DNA pada elektroforesis lebih mudah dilakukan menggunakan pewarna yang dapat berfluoresensi yaitu etidium bromida (26,32). Etidium Bromida adalah sebuah molekul planar yang dapat menyisip di antara ikatan basa DNA. Maka EtBr dapat terkonsentrasi dalam fragmen DNA dan berfluoresensi pada cahaya UV (26).

Siklus PCR dan primer yang digunakan sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh H.Y.Tsen, dkk., 1998, dengan sedikit penyesuaian. Pada hasil foto gel terlihat bahwa dengan primer 16E1 (5'- GGG AGT AAA GTT AAT ACC TTT GCT C-3') dan 16E2 (5'- TTC CCG AAG GCA CAT TCT-3') dengan kondisi PCR sebagai berikut: denaturasi awal 95°C 1 menit; 35 siklus dari denaturasi 94°C 20 detik, *annealing* 56°C 20 detik, *extension* 72°C 30 detik dan *final extension* 72°C 2 menit, sampel menghasilkan fragmen pada ukuran sekitar 584 pasang basa, menandakan bahwa sampel positif mengandung *E. coli*.

Pada penelitian ini, digunakan primer PCR yang didesain oleh H.Y.Tsen, dkk, 1998. Primer PCR didesain dari sekuens daerah V<sub>3</sub> dan V<sub>6</sub> gen penyandi 16S rRNA. Spesifitas amplifikasinya diuji terhadap galur *E. coli* dan non-*E. coli*. 16E1 pada daerah V<sub>3</sub> dan 16E2 atau 16E3 pada daerah V<sub>6</sub> didesain sebagai primer PCR untuk deteksi spesifik *E. coli*. 16E1 merupakan nukleotida ke 452-476 dari daerah V<sub>3</sub>, sedangkan 16E2 merupakan nukleotida ke 1018-1035 dari daerah V<sub>6</sub> (9). Konsentrasi primer yang digunakan untuk 25 µl campuran PCR adalah 25 pmol, sesuai dengan jumlah primer yang ideal menurut literatur, yaitu 5-25 pmol (22).

Sampel yang tidak memberikan pita DNA pada ukuran 584 pasang basa kemungkinan tidak mengandung *E. coli* atau tidak teramplifikasi. Namun pada pengujian kontrol positif *E. coli* dengan proses yang sama ternyata dihasilkan pita pada ukuran sekitar 584 pasang basa sehingga sampel yang

tidak menunjukkan pita DNA pada ukuran tersebut berarti tidak mengandung *E. coli*.

Untuk mengkonfirmasi hasil deteksi *E. coli* dengan metode PCR, maka dilakukan juga metode deteksi secara konvensional. Langkah yang dilakukan adalah pengenceran bertingkat untuk uji MPN, *presumptive test* untuk coliform dalam *Lactose Broth*, konfirmasi *presumptive test* untuk coliform dalam BGLB, penumbuhan bakteri dalam EMB sebagai media selektif dan diferensial untuk *E. coli*, dan uji biokimia untuk konfirmasi *E. coli*.

Deteksi *E. coli* secara konvensional dimulai dengan melakukan pengenceran bertingkat pada sampel dalam NaCl fisiologis sehingga didapat pengenceran 10x, 100x, dan 1000x. Pengenceran bertingkat dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi mikroba dalam sampel dengan suatu perkiraan yang disebut *Most Probable Number* (MPN). MPN secara khusus berguna untuk konsentrasi organisme yang rendah, misalnya dalam air. Hal yang utama dalam metode MPN adalah mengencerkan sampel sampai derajat tertentu sehingga inokula dalam tabung tidak selalu mengandung organisme. Hasilnya adalah jumlah tabung yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada setiap tingkat pengenceran, akan mewakili perkiraan dari konsentrasi asli sampel yang tidak diencerkan (33).

*Lactose Broth* digunakan untuk mendeteksi adanya organisme *coliform*, dan secara umum digunakan untuk menguji bakteri yang memfermentasikan laktosa. *Lactose Broth* digunakan untuk *Total Coliform Multiple-Tube* (MPN) *Test* untuk analisis air. Pepton dan *beef extract*

menyediakan nutrisi yang penting untuk metabolisme bakteri. Laktosa sebagai sumber karbohidrat yang dapat difermentasi. Setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, adanya pertumbuhan yang ditandai dengan kekeruhan, dengan pembentukan gas dalam tabung Durham menunjukkan hasil positif untuk *coliform*.

Sampel yang menunjukkan hasil positif dalam medium *Lactose Broth* diambil sebanyak satu ose dan ditumbuhkan dalam 10 ml medium *Brilliant Green Bile Broth 2% (Brilliant Green Lactose Bile Broth)* dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. BGLB digunakan untuk deteksi organisme *coliform* dalam makanan, produk susu, air, dan air limbah. BGLB mengandung dua inhibitor untuk organisme Gram positif dan beberapa organisme Gram negatif. Inhibitor tersebut adalah *ox-gall* dan *brilliant green dye*. *Coliform* yang resisten terhadap kerja inhibitor tersebut dan memfermentasikan laktosa, dapat tumbuh dalam medium ini. Fermentasi dideteksi dengan produksi gas dalam tabung Durham.

Satu ose dari sampel yang menunjukkan hasil positif dalam BGLB dipindahkan ke media *Eosin Methylene Blue (EMB) Agar* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. EMB adalah media selektif dan diferensial untuk isolasi dan diferensiasi basil enterik gram negatif. EMB mengandung pewarna eosin Y dan biru metilen yang menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif. Pewarna ini juga berperan sebagai indikator diferensial sebagai respons terhadap fermentasi laktosa dan atau

sukrosa oleh mikroorganisme. Koloni *E. coli* menunjukkan kilap logam berwarna hijau yang khas disebabkan oleh fermentasi laktosa yang cepat.

Koloni yang membentuk kilap logam pada media EMB digunakan untuk uji biokimia. Uji biokimia yang dilakukan yaitu uji indol, merah metil, Voges-Proskauer, dan uji sitrat (6,12,14).

Pada uji indol, satu ose koloni yang membentuk kilap logam ditumbuhkan dalam 2 ml *peptone water* selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi ditambahkan 5 tetes pereaksi Ehrlich secara hati-hati melalui dinding tabung. *Peptone water* memiliki kandungan *tryptophan* yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi indol dan fermentasi karbohidrat (6,12,14). Dengan reagen Ehrlich yang mengandung 1% *p*-dimetilaminobenzaldehida dalam HCl, *E. coli* yang menghasilkan indol dalam *peptone water* akan membentuk cincin merah (25).

Untuk uji merah metil dan Voges-Proskauer, masing-masing satu ose dari koloni yang membentuk kilap logam pada media EMB ditumbuhkan dalam medium *Methyl Red-Voges Proskauer* (MR-VP) yang juga disebut *Buffered Peptone-Glucose Broth*. Medium MR-VP digunakan untuk diferensiasi bakteri berdasarkan reaksi merah metil dan Voges-Proskauer. Medium MR-VP dibuat untuk memungkinkan uji merah metil dan Voges-Proskauer dilakukan dalam medium yang sama, walaupun dalam tabung yang berbeda. Setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, ditambahkan 5 tetes reagen merah metil. Sedangkan pada tabung yang lain

ditambahkan  $\alpha$ -naftol dan KOH (3:1) dan dikocok secara hati-hati untuk uji Voges-Proskauer.

Pada uji merah metil, sampel yang mengandung *E. coli* menghasilkan warna merah setelah penambahan indikator pH merah metil. Hal ini disebabkan karena *E. coli* menghasilkan tingkat keasaman yang tinggi selama fermentasi dekstrosa, melampaui sistem *buffer* fosfat.

Pada uji Voges-Proskauer, reagen A (5% [w/v]  $\alpha$ -naftol dalam alkohol absolut) mengandung katalis yang memicu pembentukan produk metabolik spesifik yang membentuk kompleks warna merah pada penambahan reagen B (40% [w/v] kalium hidroksida dalam aquadest). Reaksi Voges-Proskauer positif disebabkan karena kemampuan mikroba tertentu untuk memproduksi produk akhir yang netral, *acetoin* (*acetylmethylcarbinol*), dari fermentasi dekstrosa. *Acetoin* teroksidasi oleh adanya oksigen dan basa, menghasilkan warna merah. *E. coli* menghasilkan reaksi negatif dalam uji Voges-Proskauer yang ditandai dengan tidak terbentuknya warna merah setelah penambahan  $\alpha$ -naftol dan KOH.

Pada uji sitrat, satu ose koloni yang membentuk kilap logam dalam EMB ditumbuhkan dalam medium *Simmons Citrate Agar* selama 48-96 jam pada suhu 37°C. *Simmons Citrate Agar* digunakan untuk diferensiasi bakteri Gram negatif berdasarkan penggunaan sitrat. Organisme yang mampu menggunakan ammonium dihidrogen fosfat dan natrium sitrat sebagai sumber tunggal dari nitrogen dan karbon, akan tumbuh dalam medium ini dan

menghasilkan reaksi basa yang terlihat dari perubahan warna indikator bromtimol biru dari hijau (netral) menjadi biru (basa) (6,12,14).

Berdasarkan penelitian, uji biokimia dari sampel air cenderung sulit dilakukan untuk mendapatkan hasil yang positif untuk *E. coli*. Sulit untuk mendapatkan hasil indol positif, merah metil positif, Voges-Proskauer negatif, dan sitrat negatif. Dari sampel yang membentuk koloni berwarna kilap logam di media EMB, hasil uji sitrat yang didapat selalu positif. Hal ini disebabkan karena koloni dalam EMB yang tidak murni. Masih ada koloni enterobakter dan bakteri-bakteri lain pada media EMB yang bercampur dengan koloni yang berwarna kilap logam sehingga hasil uji biokimia tidak sesuai dengan hasil yang seharusnya menunjukkan adanya *E. coli*.

Jika diinginkan hasil uji biokimia yang tepat untuk *E. coli*, maka koloni pada media EMB harus diisolasi sampai didapatkan koloni yang murni dari *E. coli* kemudian dilakukan uji biokimia. Maka, bila dibandingkan dengan PCR, metode konvensional memerlukan waktu yang lebih lama yaitu lebih dari 6 hari untuk memastikan adanya *E. coli* dalam sampel. Sedangkan PCR dapat langsung mendeteksi adanya *E. coli* tanpa harus mengisolasi koloni bakteri.