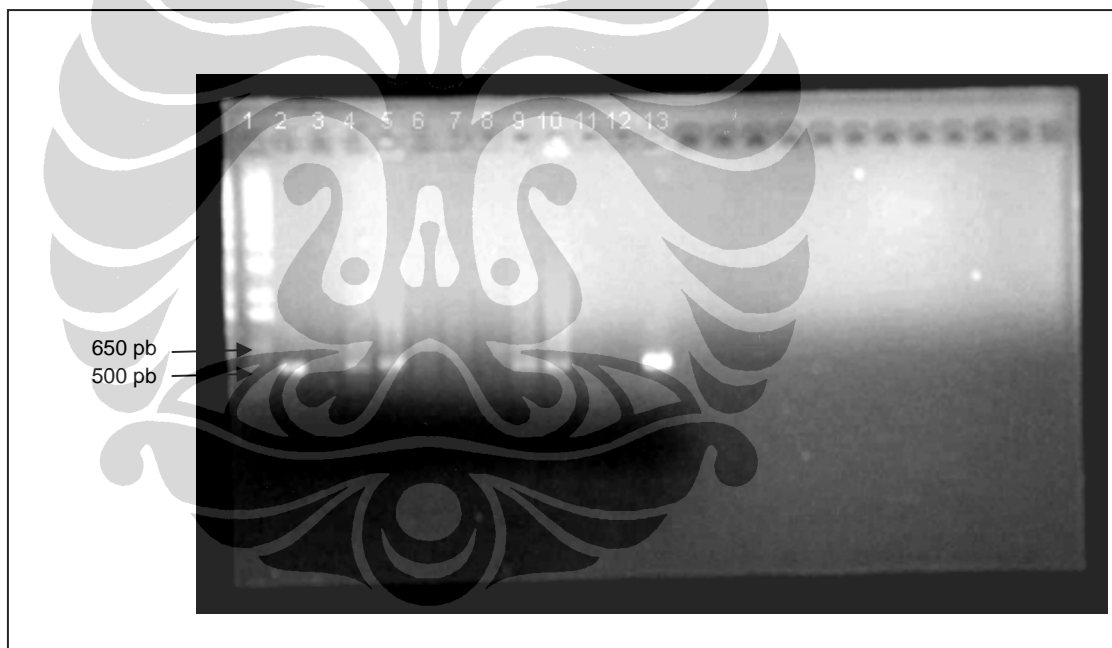
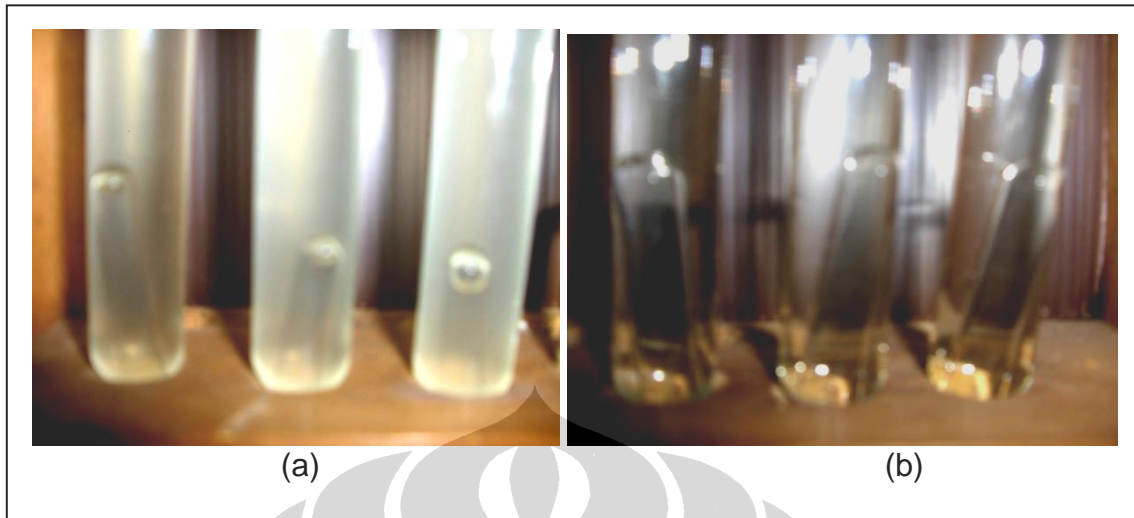


Gambar 1. Hasil elektroforesis *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diisolasi menggunakan CTAB dan diamplifikasi dengan PCR [lajur 1 dan lajur 2].



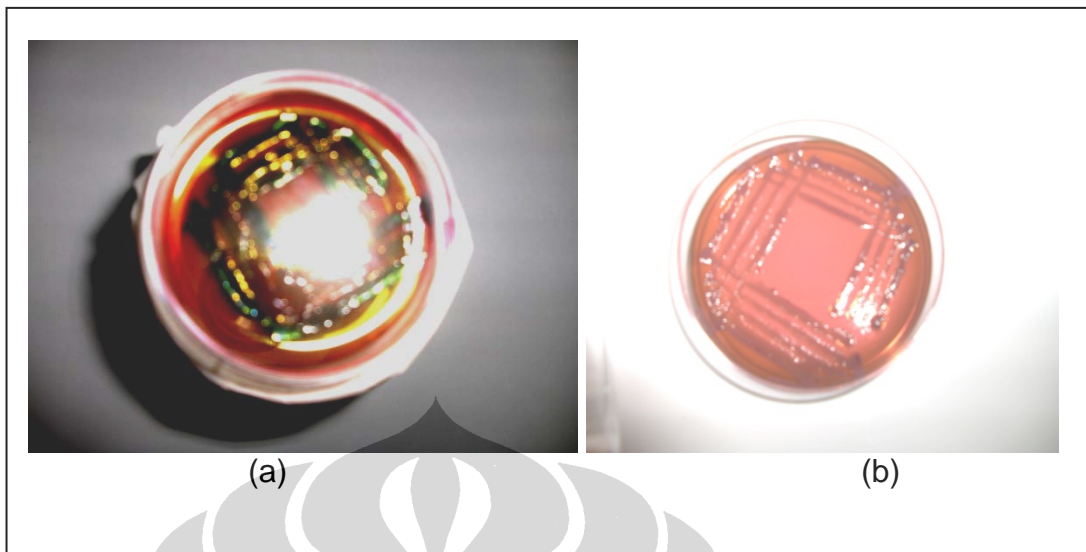
Gambar 2. Hasil elektroforesis sampel dengan tegangan 50 V selama 60 menit. Keterangan: Lajur 1, Penanda DNA 1 Kb; Lajur 2, Kontrol positif *Escherichia coli* ATCC 25922; Lajur 3, Sampel 1; Lajur 4, Sampel 2; Lajur 5, Sampel 3; Lajur 6, Sampel 4; Lajur 7, Sampel 5; Lajur 8, Sampel 6; Lajur 9, Sampel 7; Lajur 10, Sampel 8; Lajur 11, Sampel 9; Lajur 12, Sampel 10; Lajur 13, Kontrol positif *Escherichia coli* ATCC 25922



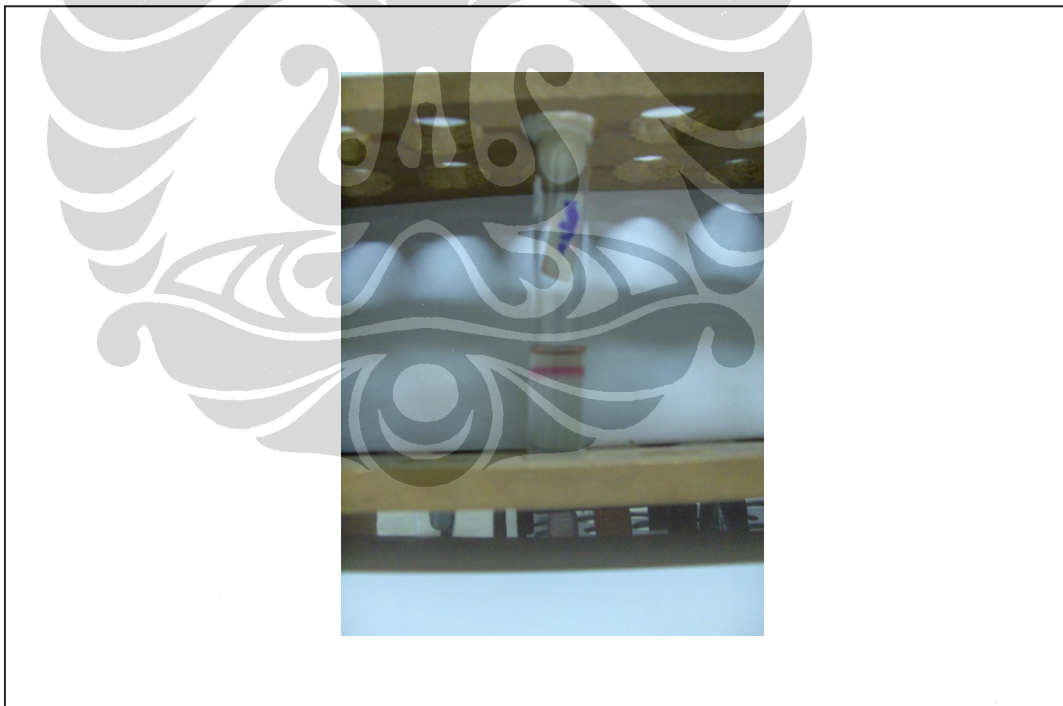
Gambar 3. (a) Lactose Broth positif enterobakter, (b) Lactose Broth negatif enterobakter.



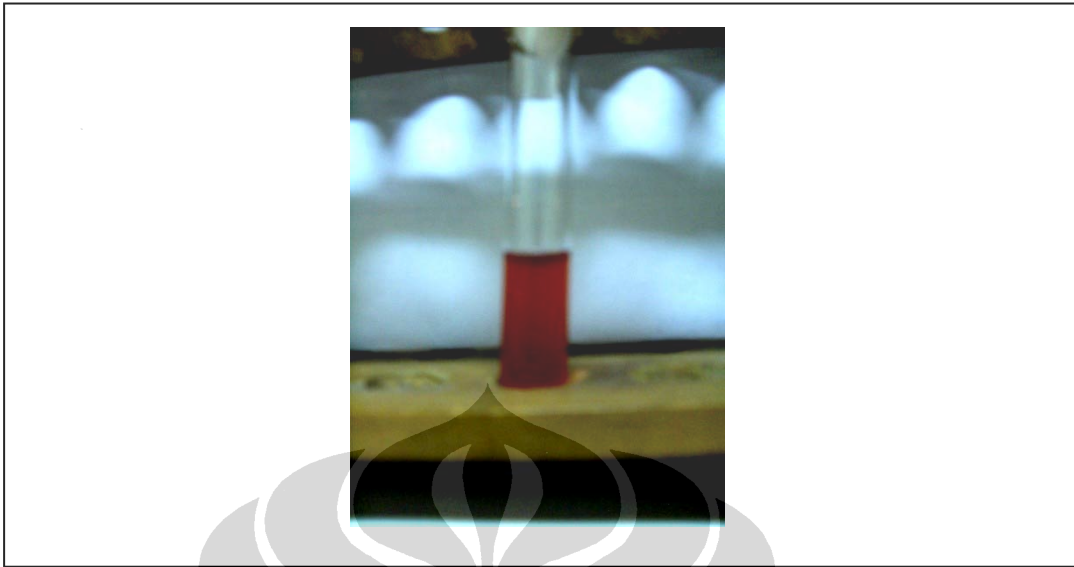
Gambar 4. BGLB positif enterobakter



Gambar 5. (a) EMB positif *E. coli*, (b) EMB negatif *E. coli*.



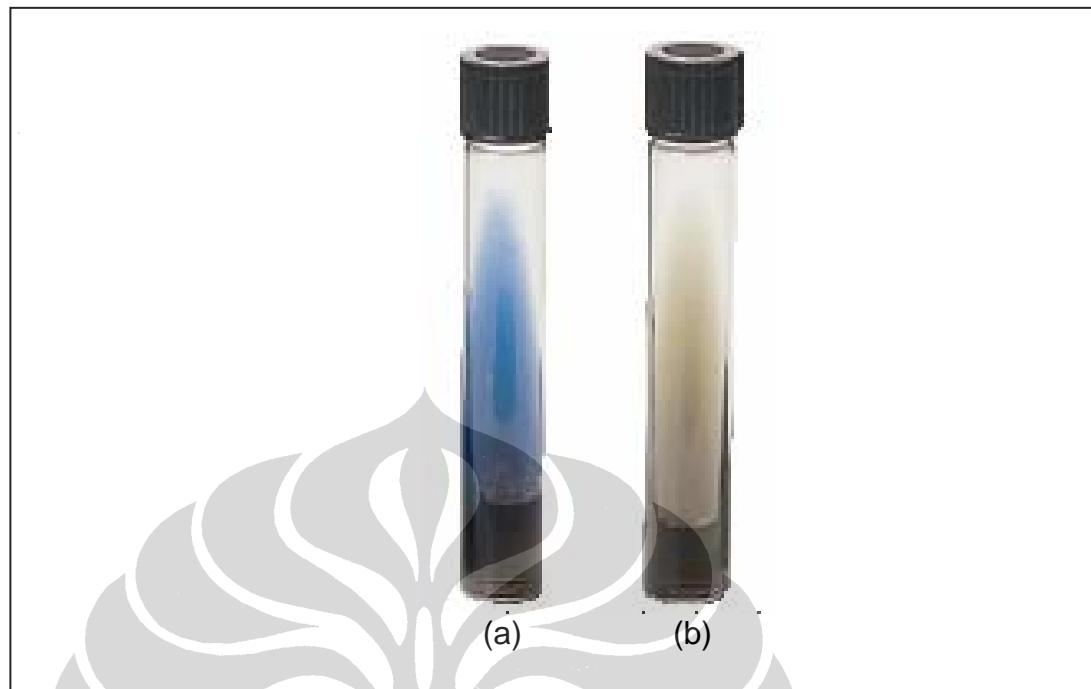
Gambar 6. Uji indol positif *E. coli*



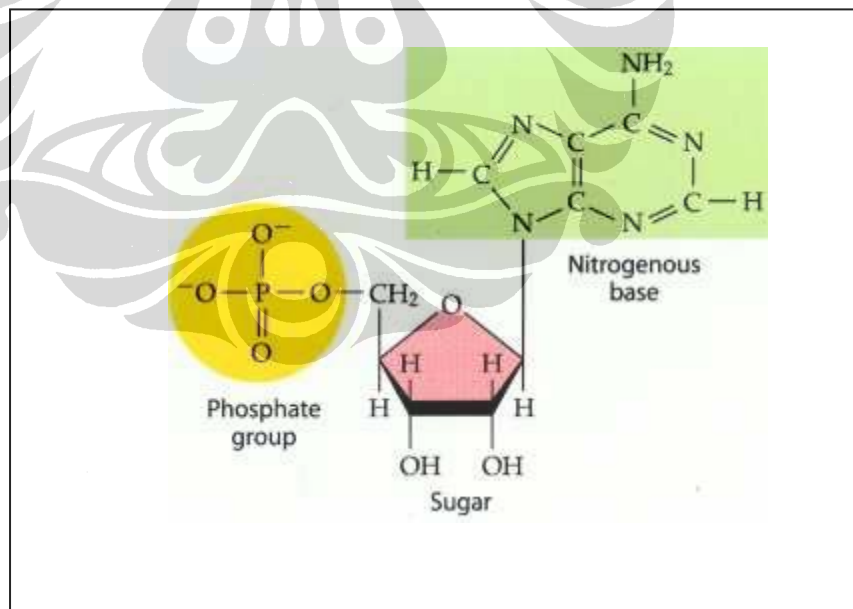
Gambar 7. Uji merah metil positif *E. coli*



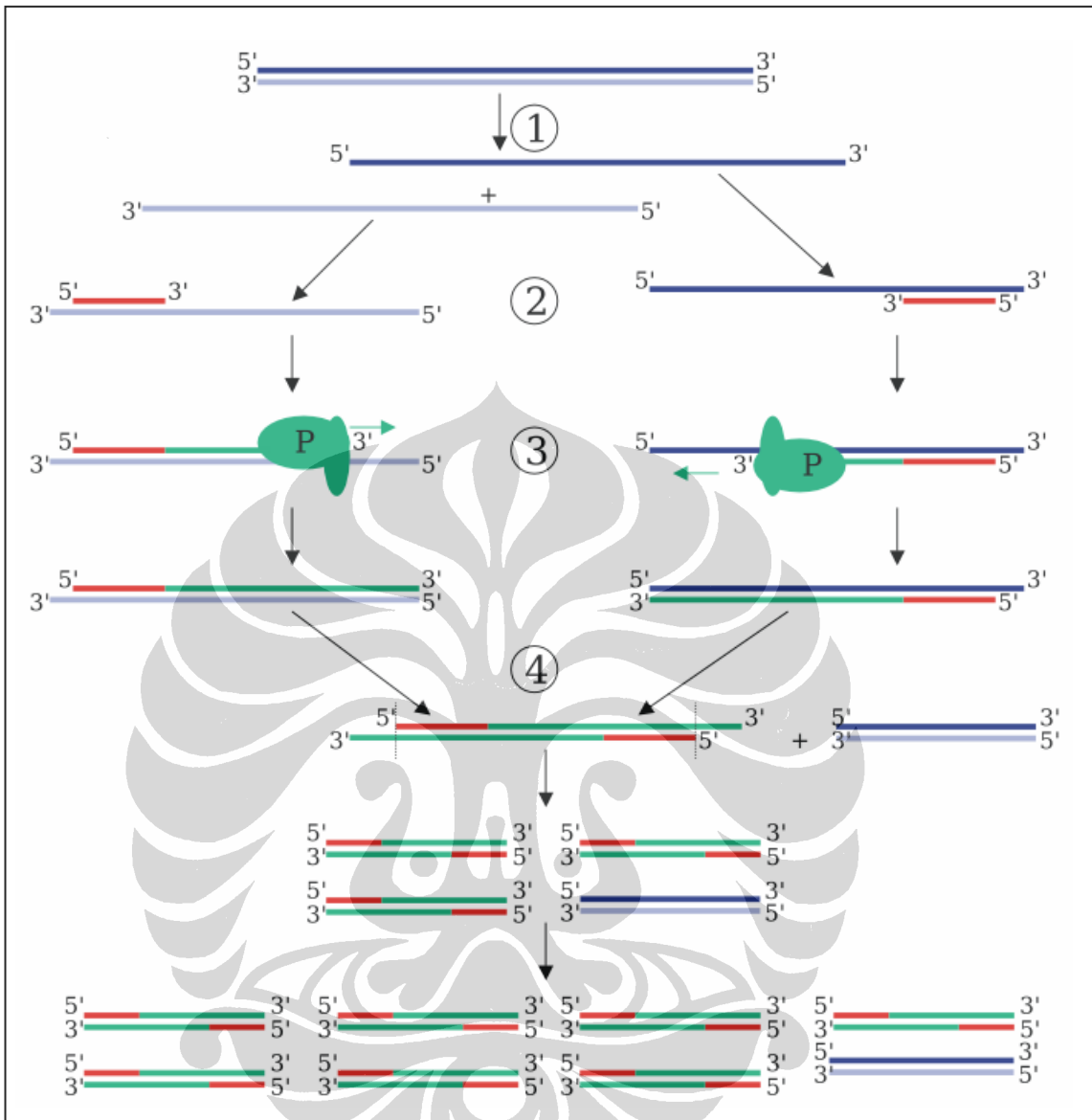
Gambar 8. Uji Voges-Proskauer negatif [positif *E. coli*].



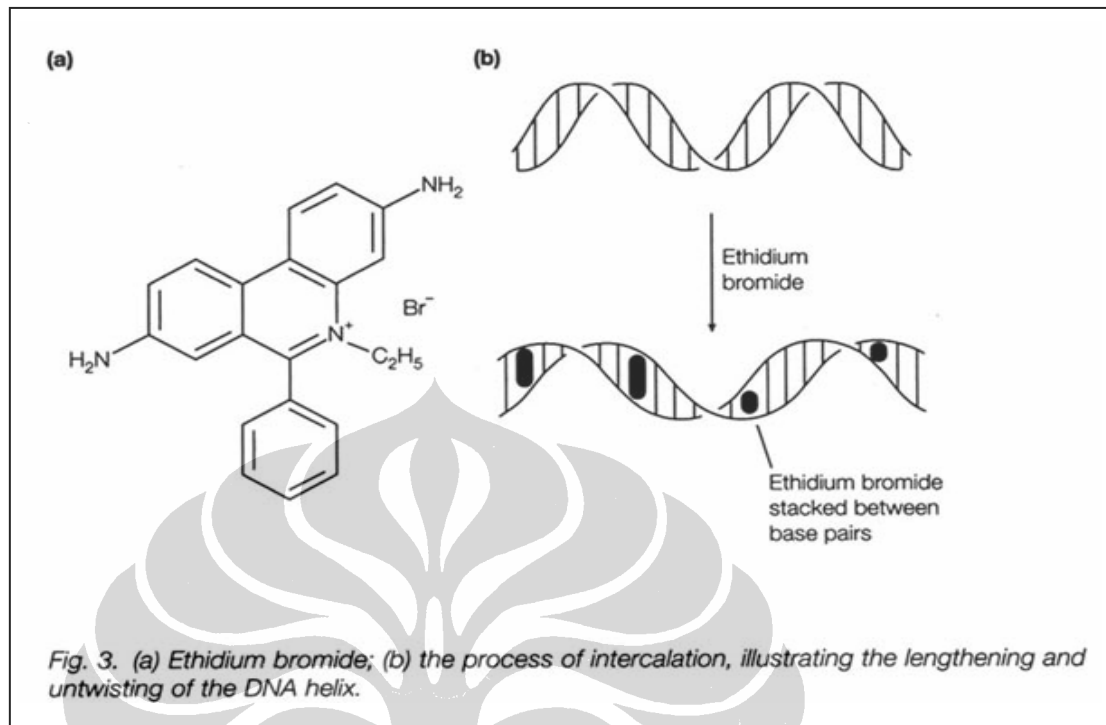
Gambar 9. (a) Uji Sitrat positif [negatif *E. coli*], (b) Uji Sitrat negatif [positif *E. coli*].



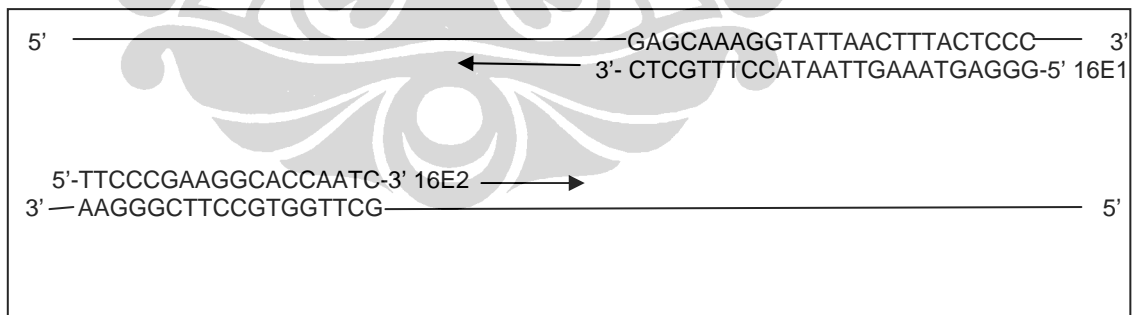
Gambar 10. Nukleotida (34)



Gambar 11. Skema siklus amplifikasi PCR. (1) Denaturasi, (2) *Annealing*, (3) *Extension*, (4) siklus pertama selesai, membentuk utas DNA untuk *template* berikutnya (35).



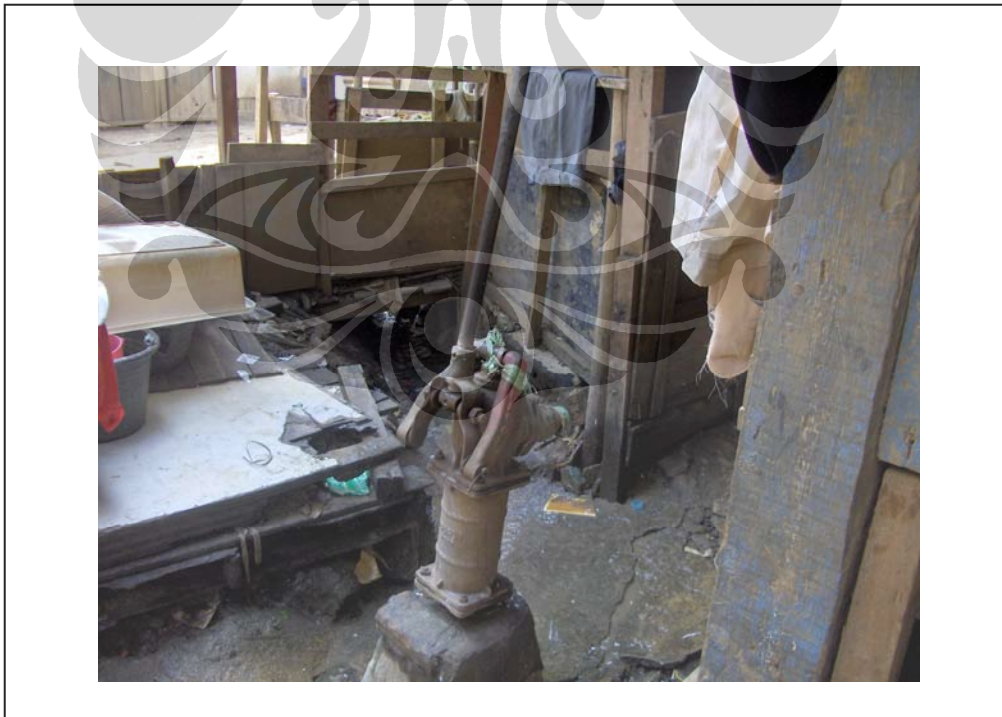
Gambar 12. (a) Rumus bangun Etidium Bromida (3,8-Diamino-10-etil-9-fenil-fenantridinium bromida), (b) Mekanisme kerja etidium bromide (36).



Gambar 13. Lokasi penempelan primer 16E1 dan 16E2 pada sekuens gen penyandi 16S rRNA.



Gambar 14. Lokasi pengambilan sampel di Kali Ciliwung, Kelurahan Bukit Duri, Jakarta Timur.



Gambar 15. Lokasi pengambilan sampel 1



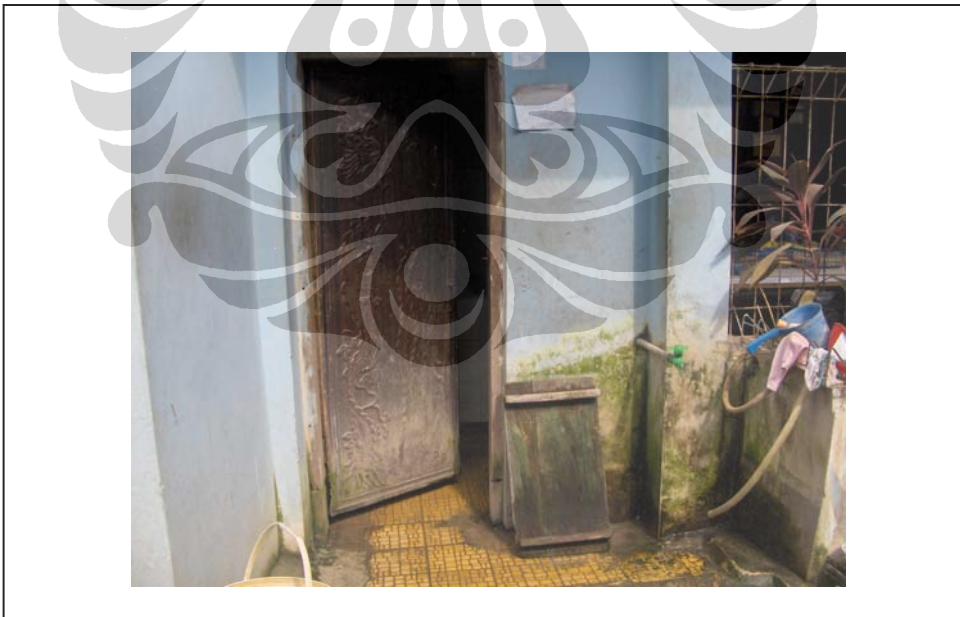
Gambar 16. Lokasi pengambilan Sampel 2



Gambar 17. Lokasi pengambilan Sampel 3



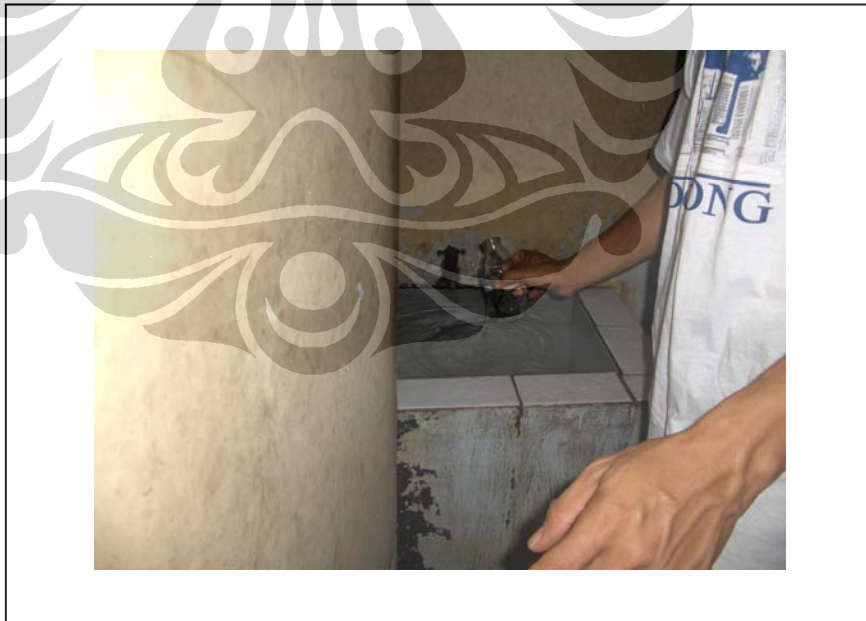
Gambar 18. Lokasi pengambilan sampel 4



Gambar 19. Lokasi pengambilan sampel 5



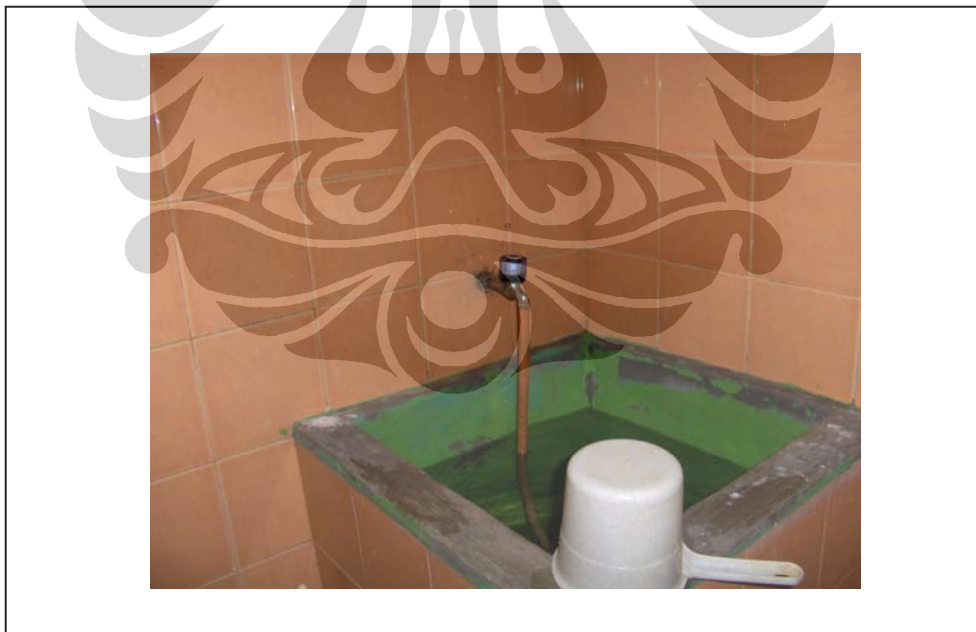
Gambar 20. Lokasi pengambilan Sampel 6



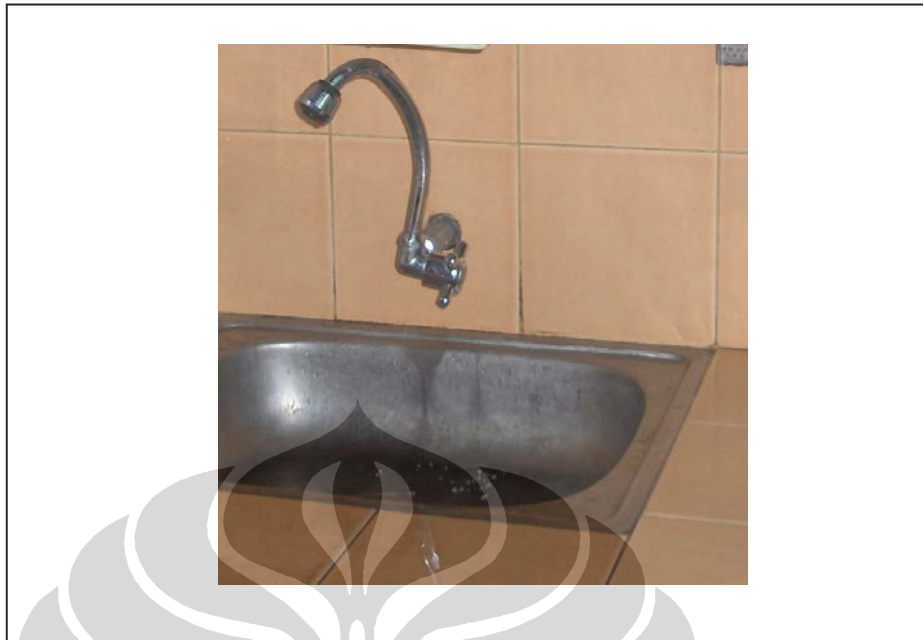
Gambar 21. Lokasi pengambilan sampel 7



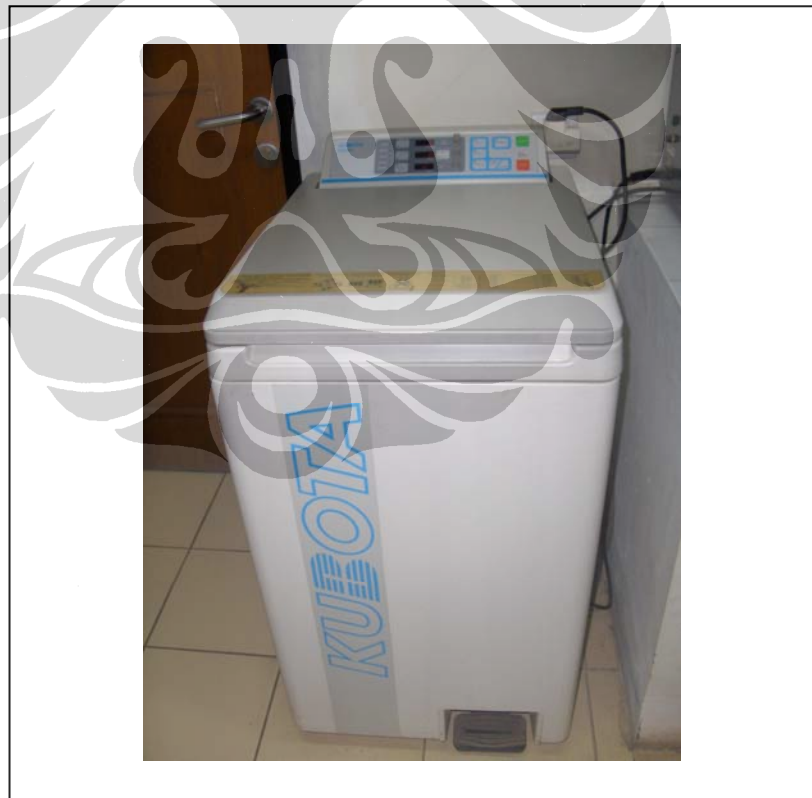
Gambar 22. Lokasi pengambilan sampel 8



Gambar 23. Lokasi pengambilan sampel 9



Gambar 24. Lokasi pengambilan sampel 10 (air PAM)



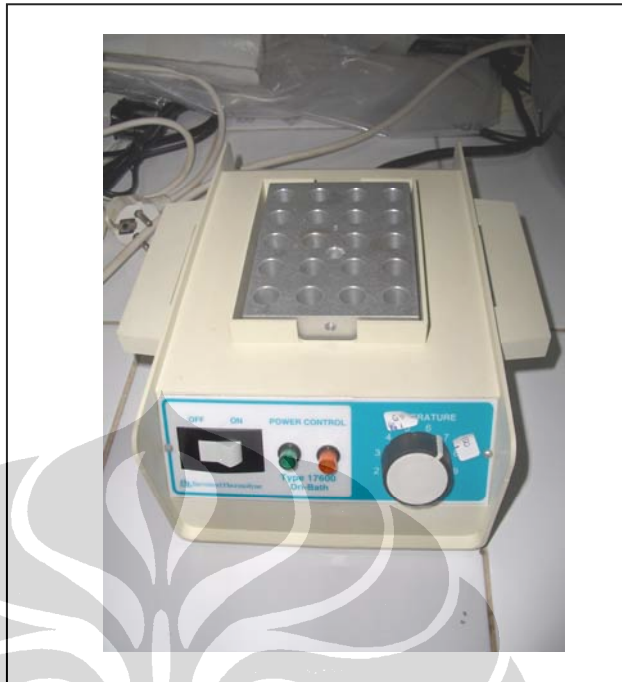
Gambar 25. Sentrifus Kubota Tipe 6800



Gambar 26. Inkubator 37°C



Gambar 27. Mikrosentrifus berpendingin



Gambar 28. Penangas kering



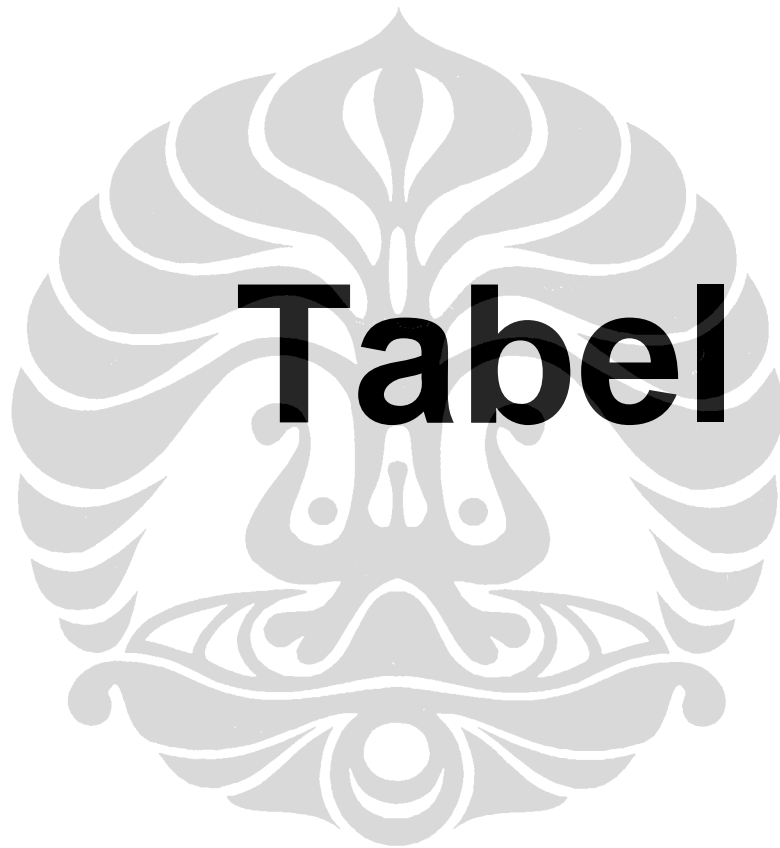
Gambar 29. PCR Thermal Cycler



Gambar 30. Elektroforesis Gel



Gambar 31. UV transilluminator



Tabel 1

Hasil deteksi *Escherichia coli* dalam sampel air dengan metode PCR dan metode konvensional

Sampel	PCR	Lactose Broth			MPN	BGLB	EMB	IMViC			Sumber Sampel	
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³				Indol	MR	VP		Sitrat
1	negatif	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	pompa tangan
2	positif	1	0	0	4	positif	positif	positif	positif	negatif	positif	jet pump
3	positif	3	0	2	64	positif	positif	positif	positif	negatif	positif	sumur timba
4	negatif	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	pompa tangan
5	negatif	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	jet pump
6	negatif	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	jet pump
7	positif	2	2	1	28	positif	positif	positif	positif	negatif	positif	jet pump
8	positif	1	1	0	7	positif	positif	positif	positif	negatif	positif	jet pump
9	negatif	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	jet pump
10	negatif	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	PAM

Tabel 2

Angka paling mungkin (Most Probable Number/MPN) menggunakan tiga tabung

Kombinasi/Jumlah tabung yang positif			MPN per-ml
1:10	1:100	1:1000	
0	0	0	<3
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	>2400



Lampiran 1

Komposisi dan Cara Pembuatan Media, Buffer, dan Pereaksi

1. Media *Nutrient Broth*

Komposisi: Gelatin Peptone 5 gr; *beef extract* 3 gr.

Cara pembuatan:

Sebanyak 8 gr serbuk dilarutkan dalam 1 L *purified water*. pH larutan diukur dengan menggunakan pH meter (pH $6,8 \pm 0,2$). Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2. Media *Lactose Broth*

Komposisi: *Gelatin pancreatic digest* 5 gr; *laktosa monohidrat* 5 gr; *beef extract* 3 gr.

Cara pembuatan:

Sebanyak 8 gr serbuk *Nutrient Broth* dicampur dengan 5 gr *laktosa monohidrat*. Campuran ini kemudian dilarutkan dalam 1 L aquades. pH larutan diukur menggunakan pH meter (pH $6,9 \pm 0,2$). Media dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah dimasukkan tabung Durham di dalamnya. Masing-masing tabung diisi dengan 10 ml media. Tabung-tabung yang telah berisi media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3. Media *Brilliant Green Lactose Bile Broth 2%*

Komposisi: *Ox bile* 20 gr; *gelatin peptone* 10 gr; *laktosa* 10 gr; *brilliant green* 0,0133 gr.

Cara pembuatan:

Sebanyak 40 gr serbuk disuspensikan dalam 1 L aquades. Suspensi dipanaskan sambil dikocok beberapa kali sampai larut. pH larutan diukur dengan menggunakan pH meter (pH $7,2 \pm 0,2$). 10 ml media dimasukkan dalam tabung reaksi yang telah dimasukkan tabung Durham di dalamnya. Tabung yang telah diisi media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

4. Media *Eosin Methylene Blue Agar*

Komposisi: *peptone* 10 gr; *laktosa* 5 gr; *sukrosa* 5 gr; *di-Potassiumhydrogen fosfat* 2 gr; *bacto agar* 13,5 gr; *bacto eosin yellowish* 0,4 gr; *bacto biru metilen* 0,07 gr.

Lampiran 1 (lanjutan)

Cara pembuatan:

Sebanyak 36 gr serbuk disuspensikan dalam 1 liter aquades dengan memanaskannya dalam air mendidih atau dalam aliran uap. Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

5. *Peptone Water*

Komposisi: pepton 10 gr; NaCl 5 gr.

Cara pembuatan:

Sebanyak 10 gr pepton dicampur dengan 5 gr NaCl dalam 1 L aquades. Campuran dipanaskan sambil dikocok dan dididihkan selama 1 menit. pH larutan diukur dengan pH meter (pH 7,6). 2 ml media dimasukkan dalam tabung reaksi. Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

6. *Media Methyl Red-Voges Proskauer*

Komposisi: *peptone from meat* 7 gr; D(+) glukosa 5 gr; dapar fosfat 5 gr.

Cara pembuatan:

Sebanyak 17 gram serbuk dilarutkan dalam 1 L aquades. Jika perlu, media dipanaskan sampai larut. 2 ml media dimasukkan ke dalam tabung reaksi untuk uji merah metil, dan 1 ml untuk uji Voges-Proskauer. Media dalam tabung disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

7. *Media Simmons Citrate Agar*

Komposisi: MgSO₄ 0,2 gr; Ammonium dihidrogen fosfat 1 gr; sodium sitrat 2 gr; NaCl 5 gr; bacto agar 15 gr; bacto bromtimol biru 0,08 gr.

Cara pembuatan:

Sebanyak 24,2 gr serbuk dimasukkan dalam 1 L aquades. Media dididihkan sampai larut sempurna. Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

8. Dapar Tris Asetat EDTA (TAE) 50X

Sebanyak 24,2 gr tris-base; 5,71 ml asam asetat; dan 10 ml EDTA 0,5 M dilarutkan dalam aquades. Lalu pH larutan disesuaikan hingga 8,0 dengan asam asetat 1 N dan tambahkan dengan aquades hingga 100 ml.

Lampiran 1 (lanjutan)

Kemudian larutan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

9. Dapar Tris Asetat EDTA (TAE) 1X

Sebanyak 5 ml dapar TAE 50X dilarutkan dalam aquabides steril hingga tepat 250 ml.

10. Gel Agarose 2%

Sebanyak 600 mg agarose ditimbang, kemudian dituangkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml. Serbuk ditambahkan 30 ml dapar TAE 1X dan dididihkan hingga larut. Setelah agak dingin, kemudian dituang ke dalam cetakan dan ditambahkan Etidium Bromida, aduk perlahan hingga rata. Gelembung udara yang terdapat pada permukaan gel disingkirkan. Tunggu 30 menit hingga gel mengeras. Gel dimasukkan ke dalam alat elektroforesis yang sudah dituangkan dapar TAE 1X. Gel harus terendam di dalam dapar TAE 1X.

11. Dapar STET

Sebanyak 32 g sukrosa; 2,42 gr tris-base; dan 7,4448 gr EDTA dilarutkan dalam sejumlah aquades. Lalu tambahkan 0,4 ml Triton X-100 ke dalam larutan tersebut, kemudian dikocok hingga homogeny. pH larutan disesuaikan hingga 8,0. Kemudian ditambahkan aquades hingga tepat 400 ml dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

12. Lisozim 10 mg/ml

Sebanyak 10 mg lisozim dilarutkan dalam 1 ml tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Larutan kemudian disimpan dalam *freezer*.

13. NaCl 4M

Sebanyak 93,6 gr natrium klorida dilarutkan dalam aquades hingga tepat 400 ml. Larutan kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Lampiran 1 (lanjutan)

14. Sodium Dodesil Sulfat 10%

Sebanyak 10 gr sodium dodesil sulfat dilarutkan dalam aquabides hingga tepat 100 ml.

15. Proteinase K 25 mg/ml

Sebanyak 25 mg Proteinase K dilarutkan dalam 1 ml air *MilliQ* sambil divorteks. Larutan kemudian disimpan dalam *freezer*.

16. *Cetyltrimethylammonium bromide* / CTAB

Sebanyak 2,925 gr Natrium klorida dilarutkan dalam aquades secukupnya. Sebanyak 5 gr CTAB dilarutkan dalam aquades dengan cara memasukkan CTAB sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan pengaduk magnetic dan dipanaskan di atas *hotplate*. Lalu larutan natrium klorida yang telah dibuat sebelumnya dimasukkan dalam larutan CTAB dan ditambahkan aquades hingga tepat 100 ml. Larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

17. Dinatrium edetat 0,5 M

Sebanyak 18,6 gram dinatrium edetat dilarutkan dalam sedikit aquades. Larutan ditambahkan natrium hidroksida hingga larut dan hingga pH 8,0. Kemudian ditambahkan aquades hingga tepat 100 ml. Larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Lampiran 2
Spesifikasi Primer

1. 16E1 [Research Biolabs]

Sekuens: 5'- GGG AGT AAA GTT AAT ACC TTT GCT C-3'

Skala sintesis: 50 nmol

Panjang primer: 25 basa

Tipe: DNA

Komposisi: A C G T
 28% 16% 24% 32%

Berat molekul: 7696

Total OD: 15

Jumlah total (μg): 453

Jumlah total (nmol): 58,86

Purifikasi: Desalted

Tm ($^{\circ}\text{C}$): 49,3

2. 16E2 [Research Biolabs]

Sekuens: 5'-TTC CCG AAG GCA CAT TCT-3'

Skala sintesis: 50 nmol

Panjang primer: 18 basa

Tipe: DNA

Komposisi: A C G T
 22,2% 33,3% 16,7% 27,8%

Berat molekul: 5435

Total OD: 10

Jumlah total (μg): 291

Jumlah total (nmol): 53,54

Purifikasi: Desalted

Tm ($^{\circ}\text{C}$): 42,9

Lampiran 3

Pemakaian Primer dalam Campuran PCR dan Perhitungan Pengenceran Primer

Konsentrasi primer yang dibutuhkan:

$$\begin{aligned}
 1 \mu\text{mol/L dalam } 50 \mu\text{l campuran PCR} &= 10^{-6} \mu\text{mol/L} \times 50 \cdot 10^{-6} \\
 &= 50 \cdot 10^{-12} \text{ mol} \\
 &= 50 \text{ pmol}
 \end{aligned}$$

Untuk 25 μl campuran PCR, maka konsentrasi primer adalah 25 pmol.

Volume primer yang diambil untuk 1X campuran PCR:

$$n = M \times V$$

$$V = \frac{n}{M}$$

$$V = \frac{25 \times 10^{-12} \text{ mol}}{25 \times 10^{-6} \text{ mol/L}}$$

$$V = 1 \times 10^{-6} \text{ L}$$

$$V = 1 \mu\text{l}$$

Pengenceran primer

Primer 16E1:

58,86 nmol primer ditambahkan 589 μl *MilliQ* untuk mendapatkan konsentrasi 100 μM .

Primer 16E2:

53,54 nmol primer ditambahkan 535 μl *MilliQ* untuk mendapatkan konsentrasi 100 μM .

Konsentrasi yang diperlukan untuk 2X PCR *mix* = 50 pmol

Jika dipipet 2 μl untuk 2X PCR *mix*, maka konsentrasi stok kerja dibuat:

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi stok kerja} &= \frac{50 \times 10^{-12} \text{ mol}}{2 \mu\text{l}} \\
 &= \frac{50 \times 10^{-6} \mu\text{mol}}{2 \times 10^{-6} \text{ L}} \\
 &= \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \\
 &= 25
 \end{aligned}$$

Lampiran 3 (lanjutan)

Jika ingin dibuat stok kerja 200 μl , maka volume primer dengan konsentrasi 100 $\mu\text{mol/L}$ yang harus diambil:

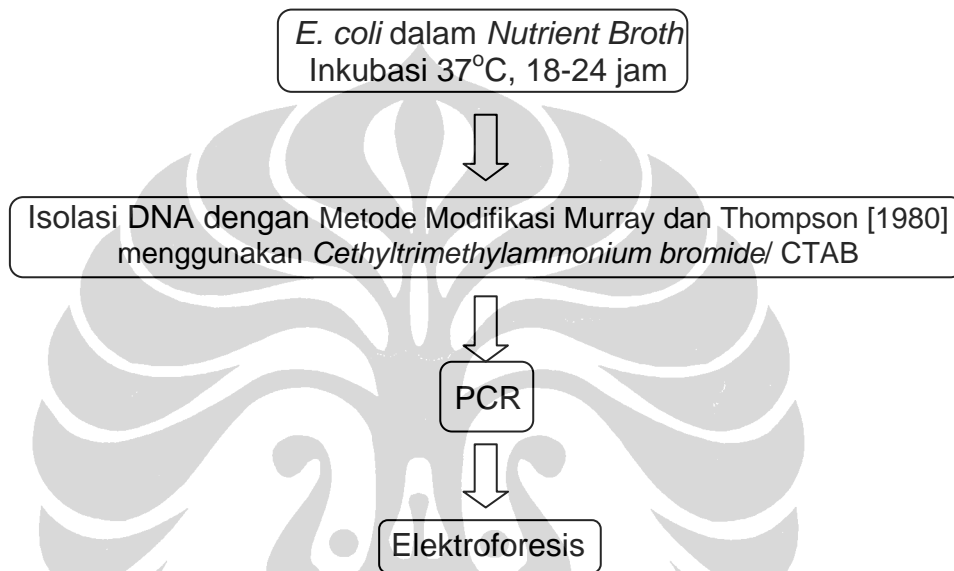
$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$
$$25 \mu\text{mol/L} \times 200 \mu\text{l} = 100 \mu\text{mol/L} \times V_2$$

$$V_2 = \frac{25 \mu\text{mol/L} \times 200 \mu\text{l}}{100 \mu\text{mol/L}}$$

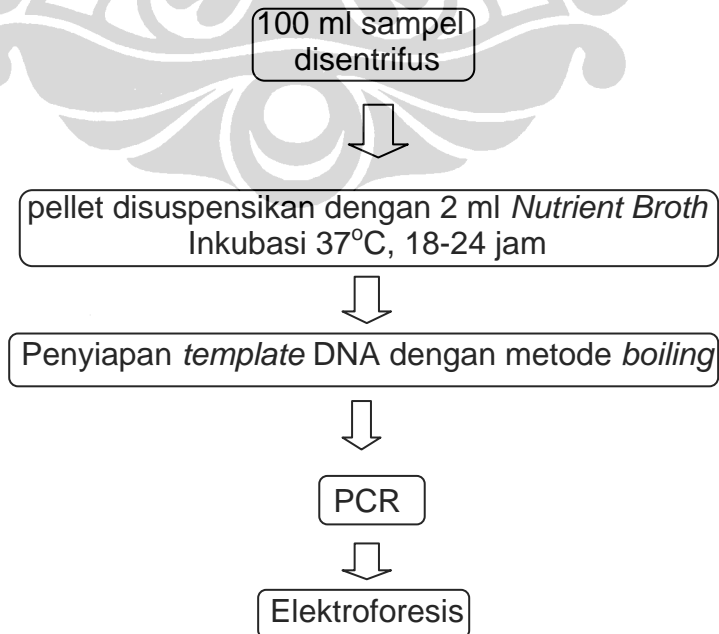
$$V_2 = 50 \mu\text{l}$$

Lampiran 4
Skema Cara Kerja

1. Uji Pendahuluan



2. Metode PCR



Lampiran 4 (lanjutan)

3. Metode konvensional

