

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Depok, Indonesia. Penelitian dilakukan sejak tanggal 11 Februari 2008 hingga 17 Mei 2008.

B. BAHAN

1. Sampel

Sampel dikumpulkan dari sepuluh sumur di daerah pemukiman padat penduduk di bantaran Kali Ciliwung di kawasan Bukit Duri, Jakarta. Sampel tersebut diambil dari dua sumur pompa tangan, enam sumur *jet pump*, satu sumur timba, dan satu air PAM. Sampel diambil dalam rentang waktu antara 28 April 2008 sampai 12 Mei 2008.

2. Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian adalah *American Type Culture Collection* (ATCC) 25922 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

3. Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian adalah *Salmonella typhosa* yang merupakan koleksi dari Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

4. Bahan Kimia

Lisozim [Sigma]; Sodium dodesil sulfat/SDS [Sigma]; Proteinase-K [Usb]; Natrium klorida [Merck]; Aquadest [Brataco]; Aquabidest [Iwadi]; Aquabidest bebas DNase dan RNase (ddH₂O); Tris base [Merck]; *Etylene Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA) [Sigma]; kloroform [Mallinckrodt]; Isoamil Alkohol [Sigma]; PCR Master Mix [Fermentas]; Primer 16E1: GGG AGT AAA GTT AAT ACC TTT GCT C [Biotech] (9); Primer 16E2: TTC CCG AAG GCA CAT TCT [Biotech] (9); Agarose ultrapure [Invitrogen]; *Loading Buffer*; Etidium bromida [Sentra BD]; 1 kb plus DNA ladder [Invitrogen]; Reagen Ehrlich [Laboratorium Mikrobiologi FKUI]; Merah metil [Laboratorium Mikrobiologi FKUI]; Kalium hidroksida [Laboratorium Mikrobiologi FKUI]; α -naftol [Laboratorium Mikrobiologi FKUI].

5. Larutan, Medium, dan Dapar

Media *Nutrient Broth*/NB [Pronadisa] pH $6,8 \pm 0,2$; Media *Nutrient Agar*/NA [Difco] pH $6,8 \pm 0,2$; Laktosa Monohidrat [Merck]; Media *Brilliant Green Lactose Bile Broth*/BGLB 2% [Pronadisa] pH $7,2 \pm 0,2$; Media *Eosin Methylene Blue*/EMB Agar [Merck] pH 7,3; Pepton [Difco]; Media Methyl Red Voges-Proskauer/MRVP [Merck]; Media Simmons Citrate [Difco]; Dapar Tris Asetat EDTA/TAE 1 \times .

C. PERALATAN

Peralatan yang digunakan adalah Mikrosentrifus berpendingin [Sorvall Fresco]; Penangas kering [Barnstead Thermolyne]; Inkubator [Mettler]; Autoklaf [Hirayama, Japan]; Laminar Air Flow Cabinet [Esco]; pHmeter [Eutech]; Kamera digital [HP Photosmart R607]; Timbangan analitik [Scout dan Acculab]; Lemari pendingin [Toshiba]; *Deep freezer* -20°C [GEA]; Oven [Lab-line Instruments dan WTB Binder]; Vortex mixer [Health]; Penangas air [Lab-line]; Elektroforesis gel mini [Mupid-ex Advance]; UV transluminator [BDA Biometra TI 1]; PCR *Thermal Cycler* [MJ Mini Biorad]; Mikrosentrifuse Minispin [Eppendorf]; Pemanas dengan magnetik stirrer [Torrey Pines Scientific]; Tabung Sentrifus 50 mL [Corning]; Pipet volume 25 mL [Pyrex]; Mikropipet 20,100, 200, 1000 [Gilson, Pipetman]; Sentrifus [Kubota]; Labu takar 10 dan 250 mL [Pyrex]; Tabung Durham; Labu bulat 500 dan 1000 mL

[Pyrex]; Erlenmeyer 100 dan 250 mL [Pyrex]; Cawan petri; Beaker Glass 600 dan 1000 mL [Pyrex]; Pipet ukur 1, 5, dan 10 mL [Pyrex]; Gelas ukur 50 dan 250 mL [Assistant]; Kertas Film [Parafilm "M"].

D. CARA KERJA

1. Ekstraksi dan Isolasi DNA *Escherichia coli* dengan Metode Modifikasi Murray dan Thompson [1980] menggunakan *Cethyltrimethylammonium bromide*/ CTAB (23)

Isolat bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang telah dikultur dalam medium *Nutrient Broth* selama 18-24 jam pada suhu 37°C dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 mL steril dan disentrifus dengan mikrosentrifus pada suhu 20°C selama 3 menit, dengan kecepatan 10.000×g. Supernatan dibuang, kemudian pelet sel yang diperoleh disuspensikan kembali dalam 557 µL dapar STET (sukrosa, basa Tris, EDTA, Triton). Sebanyak 10 µL larutan lisozim 10 mg/ml, 30 µL SDS 10%, dan 4 µL proteinase-K ditambahkan ke dalam suspensi tersebut. Suspensi dihomogenkan dengan cara membalikkan tabung mikrosentrifus selama beberapa kali dengan seksama, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Sebanyak 65 µL NaCl 4M dan 80 µL CTAB ditambahkan ke dalam suspensi, kemudian divortex, dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 30-60 menit. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan kloroform dan isoamilalkohol

(24:1, v/v) dengan menambahkan sebanyak 650 μL (624 μL kloroform dan 26 μL isoamilalkohol) ke dalam suspensi campuran. Campuran tersebut divortex dan disentrifus pada suhu 20°C selama 20 menit dengan kecepatan $10.000\times\text{g}$. Bagian supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 mL yang baru dan steril. Ekstraksi dengan kloroform dan isoamilalkohol dilakukan sebanyak dua kali sebagai modifikasi untuk menghindari penggunaan fenol yang toksik. Setelah itu supernatan ditambahkan dengan isopropanol dingin sebanyak 400 μL dan larutan dibolak-balikkan secara perlahan sampai terlihat benang-benang putih halus (benang DNA). Larutan tersebut kemudian disentrifus pada suhu 20°C selama 3 menit dengan kecepatan $10.000 \times \text{g}$. Pelet DNA yang diperoleh ditambahkan etanol 70% dingin sebanyak 1 mL dan dibolak-balikkan beberapa kali secara perlahan. Larutan tersebut selanjutnya disentrifus pada suhu 20°C selama 2 menit dengan kecepatan $10.000 \times \text{g}$. Supernatan dibuang dan pelet DNA dikeringudarkan. Setelah kering, pelet DNA direhidrasi dalam 40 μL air *MilliQ* (ddH_2O) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit agar melarut sempurna, kemudian disimpan pada suhu 4°C .

2. Persiapan Sampel

Sampel air diambil sebanyak sekitar 200 mL dan ditampung dalam vial 250 mL. Sampel segera disimpan di lemari pendingin. Sebanyak 100 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan disentrifus dengan

kecepatan $10.000 \times g$ selama 10 menit pada suhu 4°C (9). Supernatan dibuang kemudian pelet disuspensikan dalam 2 mL *Nutrient Broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

3. Penyiapan *template* DNA dari Sampel Air dengan Metode *Boiling* (24)

Sebanyak 1 mL sampel dalam media *Nutrient Broth* yang telah diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dipindahkan ke tabung mikrosentrifus 1,5 mL kemudian disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan $14.000 \times g$. Supernatan dibuang dengan hati-hati. Pelet diresuspensi dengan 300 μL *MilliQ* dan disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan $14.000 \times g$. Pelet diresuspensi dengan 300 μL *MilliQ* kemudian diinkubasi selama 15 menit pada suhu 100°C dan segera dimasukkan ke es. Setelah itu tabung disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan $14.000 \times g$ pada suhu 4°C . Supernatan dipindahkan secara hati-hati ke tabung mikrosentrifus yang baru dan diinkubasi kembali selama 10 menit pada suhu 100°C kemudian segera dimasukkan ke es. Supernatan disimpan pada suhu -20°C .

4. Amplifikasi DNA 16S rRNA dengan PCR

Ke dalam tabung mikrosentrifus 0,5 mL dimasukkan 25 μL PCR *mixture*. 2 \times PCR mix (50 μL) mengandung 25 μL 2 \times PCR Master Mix (0,05 U/mL *Taq* DNA polymerase; 0,4 mM masing-masing dNTP; 4 mM MgCl_2), 2

μL Primer 16E1, 2 μL Primer 16E2, 1 μL *MilliQ*, dan 10 μL *template* DNA genomik (untuk 1 \times PCR mix). Tabung ditempatkan dalam PCR dan diatur tahap-tahap PCR sebagai berikut: denaturasi awal 95°C 1 menit, 35 siklus dari Denaturasi 94°C 20 detik, dan Primer *annealing* 56°C 20 detik, Primer *extension* 72°C 30 detik. Tahap terakhir adalah *Final extension* 72°C selama 2 menit. Untuk mengakhiri reaksi dan menjaga sampel tetap dalam kondisi baik, alat diatur pada suhu 8°C selama 10 menit.

5. Analisis Hasil PCR dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Sebanyak 5 μL hasil amplifikasi DNA dari PCR dicampur dengan *gel loading solution* dengan perbandingan 1:1 dan dianalisis dengan gel elektroforesis yang mengandung 2% agarose dalam 1 \times TAE *buffer* (10 \times TAE; 40 mmol l⁻¹ Tris-asetat pH 7,6 dan 10 mmol l⁻¹ Na₂EDTA) dan etidium bromida. Cuplikan yang berupa sampel, kontrol positif, dan DNA penanda dimasukkan dalam sumur-sumur gel dan dialirkan arus listrik 50 V hingga warna indikator mencapai 1 cm dari tepi bawah gel. Setelah itu gel diamati pita-pita DNA-nya menggunakan UV transilluminator. Foto gel dilakukan dengan kamera digital dalam suatu cungkup yang dihubungkan ke komputer. Fragmen yang terlihat dibandingkan dengan kontrol positif dan DNA penanda, hasil sampel menunjukkan positif mengandung *Escherichia coli* jika terdapat pita nyata pada ukuran 584 pasang basa pada elektroforesis gel.

6. Deteksi *Escherichia coli* Secara Konvensional (25)

Sejumlah 25,0 mL sampel dipipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur yang telah diisi dengan dengan 225 ml larutan pengencer, kemudian dikocok dengan baik dan dihomogenkan sehingga didapat pengenceran 1 : 10. Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat sehingga didapat seri pengenceran 1 : 100 dan 1 : 1000.

Sebanyak 1,0 ml larutan dari pengenceran 10^{-1} dipipet dan dimasukkan dalam masing-masing tiga tabung yang berisi *Lactose Broth* yang di dalamnya terdapat tabung Durham terbalik. Cara yang sama juga dilakukan terhadap pengenceran 10^{-2} dan pengenceran 10^{-3} kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah 24 jam, pembentukan gas dalam tabung Durham diamati. Bila belum terbentuk gas, maka diinkubasikan lagi selama 24 jam.

Sebanyak satu sengkeli (ose) dari tiap tabung yang membentuk gas pada media *Lactose Broth* dipindahkan ke dalam tabung yang berisi 10 ml *Brilliant Green Lactose Bile Broth 2%* (BGLB) yang di dalamnya terdapat tabung Durham terbalik kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C . *Escherichia coli* dianggap positif jika di dalam tabung terdapat gas. Hasil pengamatan dicatat dan dicocokkan dengan tabel Angka Paling Mungkin (*Most Probable Number/MPN*), hasilnya dilaporkan sebagai jumlah *Escherichia coli* per ml bahan sediaan.

Sebanyak satu sengkeli dari biakan BGLB diinokulasikan ke media Eosin Methylene Blue (EMB) Agar dalam cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Koloni yang berwarna kilap logam dipilih untuk dilakukan uji biokimia.

Sebanyak satu sengkeli koloni yang berwarna kilap logam pada media EMB diinokulasikan ke dalam *Peptone Water*, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Sebanyak 0,2-0,3 ml reagen Ehrlich ditambahkan ke dalam tabung. Terbentuknya cincin merah menunjukkan reaksi indol positif. Warna jingga menunjukkan reaksi indol negatif.

Sebanyak satu sengkeli dari biakan EMB yang berwarna kilap logam diinokulasikan ke dalam 2 ml medium *Methyl Red Voges Proskauer* (MR-VP), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah itu ditambahkan lima tetes merah metil kemudian dikocok. Warna merah menunjukkan hasil uji merah metil positif.

Sebanyak satu sengkeli dari biakan EMB yang berwarna kilap logam diinokulasikan ke dalam 1 ml medium *Methyl Red Voges Proskauer* (MR-VP), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah itu ditambahkan 0,6 ml α -naftol dan 0,2 ml KOH, dan didiamkan selama 2-4 jam. Warna merah menunjukkan hasil uji Voges-Proskauer positif.

Sebanyak satu sengkeli dari biakan EMB yang berwarna kilap logam diinokulasikan ke dalam perbenihan Simmons Citrate dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48-96 jam. Warna biru menunjukkan hasil uji sitrat positif, warna hijau menunjukkan hasil uji sitrat negatif.