

4-25-2010

## DETEKSI CEPAT BAKTERI *Escherichia coli* DALAM SAMPEL AIR DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION MENGUNAKAN PRIMER 16E1 DAN 16E2

Maksum Radji

*Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Farmasi, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia, maksum@farmasi.ui.ac.id*

Anglia Puspaningrum

*Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Farmasi, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia*

Atiek Sumiati

*Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Farmasi, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia*

Follow this and additional works at: <https://scholarhub.ui.ac.id/science>

---

### Recommended Citation

Radji, Maksum; Puspaningrum, Anglia; and Sumiati, Atiek (2010) "DETEKSI CEPAT BAKTERI *Escherichia coli* DALAM SAMPEL AIR DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION MENGGUNAKAN PRIMER 16E1 DAN 16E2," *Makara Journal of Science*: Vol. 14: Iss. 1, Article 27.

Available at: <https://scholarhub.ui.ac.id/science/vol14/iss1/27>

This Article is brought to you for free and open access by the Universitas Indonesia at UI Scholars Hub. It has been accepted for inclusion in Makara Journal of Science by an authorized editor of UI Scholars Hub.

## DETEKSI CEPAT BAKTERI *Escherichia coli* DALAM SAMPEL AIR DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* MENGGUNAKAN PRIMER 16E1 DAN 16E2

Maksum Radji<sup>\*)</sup>, Anglia Puspaningrum, dan Atiek Sumiati

Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi,  
Departemen Farmasi, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia

<sup>\*)</sup>E-mail: maksum@farmasi.ui.ac.id

---

### Abstrak

Penelitian ini dilakukan untuk mendeteksi *Escherichia coli* dalam berbagai sampel air dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer 16E1 dan 16E2. DNA genomik *Escherichia coli* diekstraksi menggunakan metode *boiling*, kemudian diamplifikasi menggunakan primer 16E1 dan 16E2. Hasil PCR positif *Escherichia coli* ditunjukkan dengan adanya fragmen DNA pada ukuran sekitar 584 pasang basa, pada gel elektroforesis. Dalam penelitian ini juga dilakukan uji konfirmasi hasil PCR menggunakan metode konvensional dengan kultur. Sebanyak empat dari sepuluh sampel air mengandung *Escherichia coli* baik yang diidentifikasi dengan metode konvensional maupun dengan metode PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode PCR dapat mendeteksi *Escherichia coli* secara spesifik dan lebih cepat daripada metode konvensional.

### Abstract

**Rapid Detection of *Escherichia coli* in Water Samples by Polymerase Chain Reaction Using 16E1 and 16E2 Primers.** The detection of *Escherichia coli* in various water samples by Polymerase Chain Reaction method using 16E1 and 16E2 primers has been carried out. It was found that four out of ten samples were detected *Escherichia coli* and revealed the presence of the amplified product of the size 584 base pairs. Confirmation test of PCR result was also done using the conventional culturing method. The results of this study showed that the PCR assay was specific and faster than the conventional culturing method for detection of *Escherichia coli*.

*Keywords:* 16E1 and 16E2 primers, *Escherichia coli*, PCR, water

---

### 1. Pendahuluan

Menurut organisasi kesehatan dunia (WHO), kurang lebih sepertiga penduduk dunia menderita berbagai penyakit yang ditularkan melalui air minum yang terkontaminasi oleh mikroorganisme. Setiap tahun sekitar 13 juta orang meninggal akibat infeksi yang berasal dari air minum, 2 juta diantaranya adalah bayi dan anak-anak. Mengonsumsi air yang terkontaminasi oleh mikroorganisme patogen, baik air minum atau air yang ditambahkan ke dalam makanan, dapat menimbulkan berbagai penyakit gastrointestinal [1].

*Escherichia coli* merupakan bakteri indikator kualitas air minum karena keberadaannya di dalam air mengindikasikan bahwa air tersebut terkontaminasi oleh

feses, yang kemungkinan juga mengandung mikroorganisme enterik patogen lainnya [2]. Beberapa galur *Escherichia coli* digolongkan sebagai penyebab diare, yaitu *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), *Enteraggagative Escherichia coli* (EAEC), *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC), *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC) dan *Escherichia coli* yang memproduksi *shiga-toxin* (STEC) [3]. Bakteri *Escherichia coli* yang ada di dalam air atau makanan biasanya galur *Escherichia coli* non-patogen walaupun pada beberapa kasus terdapat galur yang patogen seperti enterotoksigenik dan galur *Escherichia coli* yang memproduksi *shiga-toxin* [4].

Uji mikrobiologis yang umum dilakukan untuk mendeteksi bakteri *Escherichia coli* dalam air adalah

secara konvensional, yaitu cara kultur dan uji sifat biokimia [5-7]. Namun demikian metode konvensional ini pada umumnya memerlukan waktu 5-7 hari untuk mendapatkan hasil yang positif. Oleh karena itu, beberapa upaya pengembangan untuk mendeteksi *Escherichia coli* telah dilakukan.

Pendekatan metode molekuler dengan cara mengamplifikasi gen yang spesifik yang terdapat pada genom bakteri *Escherichia coli* menggunakan teknik PCR telah terbukti lebih sensitif dan spesifik serta lebih cepat dalam mendiagnosis infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* [8-10], maupun untuk menilai kualitas air secara mikrobiologis dan untuk mendeteksi keberadaan bakteri patogen dalam air [11].

DNA atau gen penyandi ribosomal RNA (rRNA) *Escherichia coli* dalam sampel air dapat diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer yang dirancang berdasarkan sekuens DNA yang mengkodekan 16S rRNA. Salah satu pasangan primer rRNA telah didesain berdasarkan sekuens daerah V<sub>3</sub> dan V<sub>6</sub> dari gen 16S rRNA telah digunakan untuk mendeteksi *Escherichia coli* [4]. Pasangan primer 16E1 pada daerah V<sub>3</sub> dan 16E2 atau 16E3 pada daerah V<sub>6</sub> merupakan sepasang primer yang telah terbukti dapat mengidentifikasi *Escherichia coli* dan bersifat spesifik spesies terhadap galur *Escherichia coli* dan non-*Escherichia coli* [4].

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi *Escherichia coli* dalam berbagai sampel air dengan metode PCR menggunakan primer 16E1 dan 16E2. Dalam penelitian ini juga dilakukan deteksi *Escherichia coli* dengan metode konvensional untuk mengkonfirmasi hasil PCR.

## 2. Metode Penelitian

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, pada tahun 2008. Kontrol positif dalam penelitian adalah *Escherichia coli* ATCC 25922 dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Kontrol negatif adalah *Salmonella typhi* dari Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi FMIPA-UI.

Bahan kimia yang digunakan adalah lisozim (Sigma), sodium dodesil sulfat/SDS (Sigma), proteinase-K (Usb), natrium klorida (Merck); Aquadest (Brataco), aquabidest (Iwadi), aquabidest bebas DNase dan RNase (ddH<sub>2</sub>O), 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) [4]; Primer 16E2: TTC CCG AAG GCA CAT TCT (Biotech) [4], Agarose

ultrapure (Invitrogen), Loading Buffer, Etidium bromida (Sentra BD); 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen), reagen Ehrlich, merah metil, kalium hidroksida,  $\alpha$ -naftol. Larutan 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 $\times$ .

Peralatan yang digunakan adalah mikrosentrifus berpendingin (Sorvall Fresco), inkubator (Memmert); autoklaf (Hirayama, Japan), laminar air flow cabinet (Esco); pHmeter (Eutech), Kamera digital (HP Photosmart R607), timbangan analitik (Scout dan Acculab), deep freezer -20°C (GEA), Oven (Lab-line Instruments dan WTB Binder); vortex mixer (25  $\mu$ L PCR Master Mix (0,05 U/mL *Taq* DNA polymerase; 0,4 mM masing-masing dNTP; 4 mM MgCl<sub>2</sub>), 2  $\mu$ L Primer 16E1, 2  $\mu$ L Primer 16E2, 1  $\mu$ L *MilliQ*, dan 10  $\mu$ L *template* DNA genomik health), Elektroforesis gel mini (Mupid-ex Advance), UV transluminator (BDA Biometra TI 1), PCR Thermal Cycler (MJ Mini Biorad); 25  $\mu$ L PCR Master Mix (0,05 U/mL *Taq* DNA polymerase; 0,4 mM masing-masing dNTP; 4 mM MgCl<sub>2</sub>), 2  $\mu$ L Primer 16E1, 2  $\mu$ L Primer 16E2, 1  $\mu$ L *MilliQ*, dan 10  $\mu$ L *template* DNA genomik 25  $\mu$ L PCR Master Mix (0,05 U/mL *Taq* DNA polymerase; 0,4 mM masing-masing dNTP; 4 mM MgCl<sub>2</sub>), 2  $\mu$ L Primer 16E1, 2  $\mu$ L Primer 16E2, 1  $\mu$ L *MilliQ*, dan 10  $\mu$ L *template* DNA genomik mikrosentrifuse minispin (Eppendorf), dan alat gelas.

**Penyiapan Template DNA *Escherichia coli*.** Ekstraksi dan isolasi DNA *Escherichia coli* dilakukan dengan modifikasi metode yang umum dilakukan untuk isolasi DNA [12] menggunakan *Cethyltrimethyl ammonium bromide*/CTAB. 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 pada suhu 20°C 3 menit dengan kecepatan 10.000  $\times$  g. Supernatan dibuang, kemudian pelet sel yang diperoleh disuspensikan kembali dalam 557  $\mu$ L dapar STET (sukrosa, basa Tris, EDTA, Triton). Sebanyak 10  $\mu$ L larutan lisozim 10 mg/mL, 30  $\mu$ L SDS 10%, dan 4  $\mu$ L proteinase-K ditambahkan ke dalam suspensi tersebut. Suspensi dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, 60 menit. Sebanyak 65  $\mu$ L NaCl 4M dan 80  $\mu$ L CTAB dan diinkubasi pada suhu 65°C, 30-60 menit. Selanjutnya diekstraksi dengan 650  $\mu$ L kloroform dan 26  $\mu$ L isoamilalkohol (24:1, v/v) dan disentrifus pada suhu 20°C, 20 menit dengan kecepatan 10.000  $\times$  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 setelah itu supernatan ditambahkan 400  $\mu$ l isopropanol dingin. Larutan tersebut disentrifus pada suhu 20°C, 3 menit dengan kecepatan 10.000  $\times$  g. Pelet DNA yang diperoleh ditambahkan etanol 70% dingin sebanyak 1 ml dan dikocok dengan perlahan. Selanjutnya, disentrifus pada suhu 20°C selama 2 menit dengan kecepatan 10.000  $\times$  g. Supernatan dibuang dan pelet DNA dikeringudarkan. Setelah kering, pelet DNA direhidrasi dalam 40  $\mu$ l air *MilliQ* (ddH<sub>2</sub>O) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit sampai melarut sempurna, kemudian disimpan pada suhu 4°C.

**Penyiapan Template DNA dari Sampel Air dengan Metode Boiling.** *Template* DNA disiapkan menurut cara Medici, *et al.* [13]. Sampel air diambil sekitar 200 mL dan ditampung dalam vial 250 mL dan segera disimpan di lemari pendingin. Sebanyak 100 mL sampel disentrifus dengan kecepatan 10.000  $\times$  g selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet disuspensikan dalam 2 mL *Nutrient Broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Sebanyak 1 mL sampel dalam media *Nutrient Broth* dipindahkan ke tabung mikrosentrifus 1,5 mL dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 14.000  $\times$  g. Supernatan dibuang dengan hati-hati. Pelet diresuspensi dengan 300  $\mu$ L *MilliQ* dan disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 14.000  $\times$  g. Pelet diresuspensi dengan 300  $\mu$ L *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, diinkubasi kembali selama 10 menit pada suhu 100°C dan segera dimasukkan ke dalam es. Supernatan disimpan pada suhu -20°C.

**Amplifikasi Template DNA dengan PCR.** Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan PCR Master Mix (Fermentas) sesuai dengan prosedur yang dianjurkan oleh Fermentas [14]. Ke dalam tabung mikrosentrifus 0,5 mL dimasukkan 25  $\mu$ l PCR *mixture* yang terdiri dari 25  $\mu$ l PCR Master Mix (0,05 U/mL *Taq* DNA polymerase; 0,4 mM masing-masing dNTP; 4 mM MgCl<sub>2</sub>), 2  $\mu$ L Primer 16E1, 2  $\mu$ L Primer 16E2, 1  $\mu$ L *MilliQ*, dan 10  $\mu$ L *template* DNA genomik, dimasukkan ke dalam mesin PCR dan diatur tahap-tahap PCR yaitu denaturasi 94°C, 20 detik; *primer annealing* 56°C, 20 detik; *primer extension* 72°C, 30 detik; sebanyak 35 siklus; dan tahap terakhir adalah *Final extension* 72°C selama 10 menit.

**Analisis Hasil PCR dengan Elektroforesis Gel Agarosa.** Sebanyak 5  $\mu$ l hasil amplifikasi DNA dengan 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<sup>-1</sup> Tris-asetat pH 7,6 dan 10 mmol l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA) dan etidium bromida.

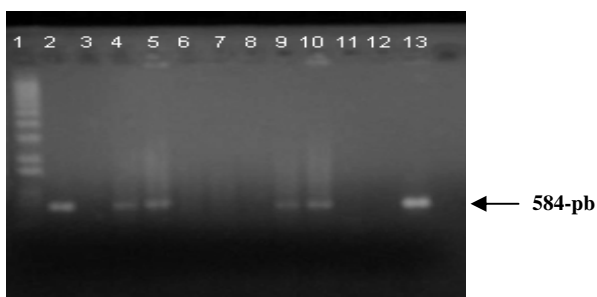
Cuplikan yang berupa sampel, kontrol positif dan DNA penanda dimasukkan dalam sumur-sumur gel dan dialirkan arus listrik 50V hingga warna indikator mencapai 1 cm dari tepi bawah gel. Setelah itu gel diamati pita-pita DNA-nya menggunakan UV transilluminator. Foto gel dilakukan dengan kamera digital dalam suatu cangkup yang dihubungkan ke komputer. Fragmen yang terlihat dibandingkan dengan kontrol positif dan DNA penanda. sampel menunjukkan positif mengandung *Escherichia coli* jika terdapat pita nyata pada ukuran 584 pasang basa pada elektroforesis gel.

**Deteksi *Escherichia coli* secara Konvensional menggunakan Media Perbenihan.** Dipipet 25,0 mL sampel ke dalam labu takar yang telah diisi dengan 225 mL larutan *Buffered Pepton Water*, dikocok 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<sup>-1</sup> 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<sup>-2</sup> dan pengenceran 10<sup>-3</sup> 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. Uji konfirmasi bakteri *Escherichia coli* dilakukan secara biokimia dengan menginokulasikan biakan dalam BGLB yang positif ke dalam media selektif yaitu media *Eosin Methylene Blue* (EMB) dan beberapa uji reaksi fermentasi yaitu uji indol, *methyl red*, *Voges Proskauer* dan uji sitrat [15].

### 3. Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode PCR menggunakan *primer 16E1* dan *16E2* dapat mendeteksi *Escherichia coli* yang ditunjukkan dengan hasil amplifikasi fragmen DNA berukuran sekitar 584 pasang basa. Dari sepuluh sampel air yang diperiksa, terdeteksi *Escherichia coli* sebanyak empat sampel yaitu sampel 2 [lajur 4], 3 [lajur 5], 7 [lajur 9], dan 8 [lajur 10] (Gambar 1).

Pada penelitian ini dilakukan uji konfirmasi terhadap hasil PCR dengan metode konvensional. Sampel yang menunjukkan hasil positif mengandung *Escherichia coli* dengan metode PCR ternyata juga menunjukkan hasil positif bila diidentifikasi dengan metode konvensional (Tabel 1). Pemeriksaan dengan metode konvensional



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 1. Hasil Elektroforesis Beberapa Sampel Air**

yang dimulai dari penanaman sampel dalam media pengkayaan sampai dengan isolasi dan identifikasi untuk memastikan keberadaan bakteri *Escherichia coli* di dalam sampel memerlukan waktu lebih lama dibandingkan dengan metode PCR. Disamping itu, metode konvensional ini mempunyai beberapa kelemahan. Pertama, mikroorganisme yang terdapat di dalam air biasanya dalam jumlah yang sangat sedikit sehingga menyebabkan kesalahan dalam *sampling* ataupun dalam penghitungan jumlah mikroorganisme. Kedua, teknik kultur yang digunakan untuk identifikasi mikroorganisme patogen dalam air selain memerlukan waktu, juga seringkali sukar untuk membiakkan mikroorganisme dalam media-media yang selektif-deferensial. Sedangkan dengan metode PCR identifikasi bakteri patogen dalam sampel air hanya membutuhkan waktu 24-48 jam [11].

Penyiapan template DNA sampel yang digunakan untuk diamplifikasi dengan PCR, ekstraksinya dilakukan dengan cara *boiling method* [13] karena metode ini cukup efisien dan ekonomis dimana *Escherichia coli* termasuk bakteri Gram negatif yang memiliki dinding sel yang tidak terlalu tebal sehingga mudah dilisis dengan pemanasan [16,17]. Pada dasarnya, metode boiling dengan pemanasan 100 °C ini mempercepat lisis dinding sel bakteri sehingga DNA dapat diekstraksi sekaligus mempermudah proses denaturasi rantai DNA ketika dilakukan amplifikasi dengan cara PCR.

Analisis hasil amplifikasi dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa yang berperan sebagai sirkuit elektrik untuk memisahkan fragmen-fragmen DNA berdasarkan jumlah nukleotida penyusunnya. Semakin kecil ukuran pasang basa nukleotidanya, akan semakin mudah bermigrasi dan berada di bagian gel yang dekat dengan anoda. Pita-pita DNA yang terbentuk diamati dengan alat UV transilluminator dan penentuan ukuran fragmen dilakukan dengan cara membandingkan mobilitas fragmen DNA dengan DNA standar yang telah

diketahui ukurannya. Visualisasi DNA pada elektroforesis lebih mudah dilakukan menggunakan pewarna yang dapat berfluoresensi yaitu etidium bromida yang merupakan molekul planar yang dapat menyisip di antara ikatan basa DNA. Etidium bromida yang terkonsentrasi dalam fragmen DNA dan berfluoresensi pada cahaya UV [12]. Sampel yang menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran sekitar 584 pasang basa menandakan bahwa sampel tersebut positif mengandung *Escherichia coli*.

Pada penelitian ini, digunakan primer PCR yang didesain oleh Tsen, *et al.* [4]. Primer PCR didesain dari sekuens daerah V<sub>3</sub> dan V<sub>6</sub> gen penyandi 16S rRNA. Spesifitas amplifikasinya diuji terhadap galur *Escherichia coli* dan non-*Escherichia 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 *Escherichia 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> [4]. Sampel yang tidak memberikan pita DNA pada ukuran 584 pasang basa kemungkinan tidak mengandung *Escherichia coli* atau tidak teramplifikasi. Namun pada pengujian kontrol positif *Escherichia 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 *Escherichia coli*, demikian pula untuk kontrol negatif menggunakan *Salmonella typhi* tidak menghasilkan pita DNA pada elektroforesis gel agarosa.

Berdasarkan penelitian terdahulu, spesifisitas primer 16E1 dan 16E2 sangat baik dimana primer ini dapat mendeteksi seluruh strain *Escherichia coli* baik yang patogen maupun yang non-patogen dan tidak dapat mendeteksi bakteri non-*Escherichia coli*, antara lain *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella*

**Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Bakteri *Escherichia coli* dalam Berbagai Sumber Air dengan Metode PCR dan Metode Konvensional dengan Kultur**

Sampel	Sumber sampel air	Identifikasi bakteri <i>Escherichia coli</i>	
		Metode PCR	Metode kultur
1	Pompa tangan	-	-
2	Jet pump	positif	positif
3	Sumur timba	positif	positif
4	Pompa tangan	-	-
5	Jet pump	-	-
6	Jet pump	-	-
7	Jet pump	positif	positif
8	Jet pump	positif	positif
9	Jet pump	-	-
10	PAM	-	-

*pneumonii, Proteus vulgaris, Pseudomonas cepacia, Salmonella enteridis, Salmonella typhi, Serratia marscescens, Yersinia enterocolitica, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus dan Bacillus cereus* [4].

Identifikasi *Escherichia coli* secara konvensional melalui uji biokimia serangkaian inokulasi dalam berbagai media perbenihan dan uji konfirmasi dengan media selektif dan deferensial serta reaksi biokimia, ternyata selain memerlukan waktu yang cukup lama, uji biokimia dari sampel air cenderung sulit dilakukan. Hal ini disebabkan karena koloni bakteri yang diduga sebagai *Escherichia coli* dalam media selektif dan media deferensial seringkali tidak murni dan tercampur dengan bakteri *Enterobacteriaceae* lainnya. Untuk mendapatkan hasil identifikasi yang tepat, koloni yang akan diidentifikasi harus betul-betul murni sehingga diperlukan waktu beberapa hari untuk mengisolasi dan mengidentifikasinya. Pada penelitian ini, identifikasi *Escherichia coli* dengan metode konvensional memerlukan waktu 6 hari, sedangkan dengan metode PCR hanya memerlukan waktu 48 jam. Hal ini disebabkan karena metode PCR langsung dapat mendeteksi adanya *Escherichia coli* dalam sampel tanpa harus mengisolasi koloni bakteri terlebih dahulu. Dengan demikian, metode PCR yang digunakan dalam penelitian ini lebih cepat bila dibandingkan dengan metode konvensional.

#### 4. Simpulan

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa metode menggunakan primer 16E1 dan 16E2 dapat digunakan untuk mendeteksi *Escherichia coli* dalam berbagai sampel air. Penggunaan metode PCR ini menghasilkan fragmen DNA berukuran 584 pasang basa pada elektroforesis gel agarosa. Metode 25 µl PCR Master Mix (0,05 U/mL *Taq* DNA polymerase; 0,4 mM masing-masing dNTP; 4 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 µl Primer 16E1, 2 µl Primer 16E2, 1 µl *MilliQ*, dan 10 µl *template* DNA genomik PCR dapat mendeteksi bakteri *Escherichia coli* dalam sampel air dengan lebih cepat bila dibandingkan dengan metode konvensional.

#### Daftar Acuan

- [1] World Health Organization (WHO), Guidelines for Drinking-Water Quality: First Addendum to Third Edition, Geneva, vol. 1, 2006.
- [2] G.J. Tortora, B.R. Funke, C.L. Case. Microbiology: An Introduction, 8<sup>th</sup> Ed. The Benjamin Cummings Publishing Co. Inc, USA, 2004, p.717.
- [3] K.R.S. Aranda, U. Fagundes-Neto, I.C.A. Scaletsky, J. Clinical Microbiol. 42 (2004) 5849.
- [4] H.Y. Tsen, C.K. Lin, W.R. Chi, J. Applied Microbiol. 85 (1998) 554.
- [5] C.R. Fricker, Appl. Environ. Microbiol. 43 (2003) 49.
- [6] L. Alexander, B. Wolfgang, M. Harald, Appl. Environ. Microbiol. 71 (2005) 3624.
- [7] H. Leclerc, A. Moreau, FEMS Microbiol. Rev. 26 (2002) 207.
- [8] A.M. Shaban, B.M. Haroun, M.A. Ali, M.A. Elras, J. Appl. Sciences Res. 4 (2008) 1769.
- [9] G. Sabat, P. Rose, W.J. Hickey, J.M. Harkin, Appl. Environmental Microbiol. 66 (2000) 844.
- [10] A.M. Ibekwe, P.M. Watt, C.M. Grieve, V.K. Sharma, S.R. Lyons, Appl. Environment. Microbiol. 69 (2002) 4853.
- [11] A.H. Desouky, Z.H. Kheiralla, S. Zaki, A.A. Rushdy, W. Abd-El-Raheim, J. Environ. Monit. 5 (2003) 865.
- [12] J. Sambrook, D.W. Russel, Molecular Cloning a Laboratory Manual, 3<sup>th</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- [13] D.D. Medici, L. Croci, E. Delibato, S.D. Pasquale, E. Filetici, L. Toti, Appl. and Environmental Microbiol. 69 (2003) 3456.
- [14] Anonim, Molecular Biology Catalog and Product Application Guide 2006-2007, Fermentas, Canada, 2006, p.221.
- [15] M. Radji (Ed.), Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Farmasi, Edisi Kedua, Departemen Farmasi, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok, 2006, hal. 43.
- [16] V.T. Nguyen, P.L. Van, C.L. Huy, K.N. Gia, A. Weintraub, J. Clin. Microbiol. 43 (2004) 755.
- [17] O.A. Ratchtrachenchai, S. Subpassu, H. Hayashi, W. Ba-Thein, J. Medical Microbiol. 53 (2004) 237.