

KEBERADAAN *Escherichia coli* RESISTAN ANTIBIOTIK PADA IKAN BALANG (*Pristolepis fasciata*) DI SUNGAI BATANG ARAU

Maharani Hazar, Marniati Salim M.S, Elida Mardiah M.S

Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Andalas
Limau Manis, Padang
Email: rani180889@gmail.com

ABSTRACT

Research on antibiotic resistance of *Escherichia coli* (*E. coli*) and the number of coliform bacteria obtained from Balang fish at Batang Arau River have been done. This study aims to determine the presence of pathogenic *E. coli* which is resistant to antibiotics and the amount of bacteria in Balang fish. The qualitative assay of *Escherichia coli* has done by using MPN method (Most Probable Number). Based on this method the number of coliform bacteria and fecal coliform (*E.coli*) which can be obtained is ≥ 2400 MPN/100 mL. Five cultures from Endo Agar was carried to biochemical assay. The results of biochemical assay is indole test and lactose test are positive, while citrate test is negative. Based on this test the five cultures are positive *Escherichia coli*. Cultures obtained from the isolation of *Escherichia coli* were resistance tested by the diffusion method using antibiotic amoxicilin, ampicilin, tetracycline and chloramphenicol. Largest halozone was shown in amoxicilin. The patterns of antibiotic resistance of *Escherichia coli* in percent is 30% culture resistant, 45% intermediate and 25% susceptible to all four antibiotics. The results shows no amplification of the *stx₁* gene which is indicating no bacteria *Escherichia coli* O157: H7 in these five cultures.

Keywords: *Escherichia coli*, Balang Fish, Batang Arau River, Antibiotic Resistant

PENDAHULUAN

Indonesia sebagai negara berkembang, memiliki sungai yang banyak tercemar dengan aktifitas manusia. Contohnya salah satu sungai yang berada di Padang yaitu sungai batang arau, telah tercemar dengan limbah. Limbah-limbah tersebut berasal dari Limbah pabrik, limbah rumah sakit, dan limbah rumah tangga^{1,2}. Tingkat pencemaran akibat limbah ini menyebabkan tingginya bakteri patogen yang dapat menyerang manusia. Salah satunya adalah bakteri *Escherichia coli*. Walaupun bakteri *Escherichia coli* merupakan flora normal manusia, tapi keberadaannya dilingkungan dapat

menyebabkan diare. Salah satu bakteri patogen yang menjadi perhatian akhir ini adalah *E.coli* O157:H7, penyebab diare berdarah, kram perut, gagal ginjal dan menyebabkan kematian mikroflora pada usus. Bakteri ini juga dapat ditemukan pada feses ayam, kambing, domba, babi, anjing dan kucing. Bakteri *Escherichia coli* menyerang manusia akibat kontaminasi pada makanan yang dikonsumsi manusia tersebut. Contohnya adalah ikan Balang (*Pristolepis fasciata*) yang banyak ditemukan di sungai Batang Arau.^{3,4}

Akhir-akhir ini penelitian mengenai resistansi antibiotik bakteri patogen pada makanan cukup banyak dilakukan karena

resistensi antibiotik yang terjadi sudah pada cukup tinggi. Di India, resistansi antibiotik pada bakteri *Escherichia coli* pada makanan laut sangat tinggi. Didapatkan 116 strain *E.coli* dan diuji resistansinya dengan 14 antibiotik yang berbeda-beda. 7 strain resistan terhadap lebih dari lima antibiotik yang mana salah satunya resistan terhadap 8 antibiotik. Di Indonesia ditemukan penggunaan antibiotik sudah dianggap melebihi ambang batas. Antimikroba menggunakan tekanan selektif pada mikroorganisme dan karena itu penggunaannya dianggap sebagai kunci dalam studi epidemiologi. Ancaman penyakit dari strain bakteri yang patogen yang resisten terhadap antibiotik telah meningkat dalam beberapa tahun terakhir.^{7,8,9}

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: *Magenetic Strirer*, *Incubator*, *Incubator Shaker*, *Autoclave*, Lemari Pendingin, *Laminar Flow*, Pipet Mikro, *Ependorf*, Elektroforesis, PCR, *Gel Documentation* dan tabung Durham. Bahan yang digunakan adalah: *Laktose Broth*, *Brilliant Green lactose Bile Broth* (BGLBB), Endo Agar, *Tryptone Soy Agar* (TSA), Nutrien Agar, Muller Hinton Agar, Luria Bertani Broth, TBE (Tris, *Boric Acid*, EDTA), Agarose 1%. Ikan Balang, *Antibiotic Paper Disc* (BBL) (*ampicilin*, *amoxicilin*, *chloramphenicol*, *tetracyclin*), 1xTE, SDS 10%, Proteinase K, Fenol:Kloroform (1:1), Natrium Asetat, Isopropanol, Etanol 70%, *Ethidium Bromide*, Taq polymerase, Primer *stx₁ F* dan *stx₁ R*, *Brom Phenol Blue* (BPB), dNTP Mix, Taq Buffer, ddH₂O PCR.

Pengambilan Sampel

Ikan Balang diambil dari Sungai Batang Arau di daerah pondok dan diambil sore

hari, diletakan dalam plastik selama 15 menit kemudian disimpan dalam lemari pendingin selama 1 malam.

Uji Kualitatif Koliform (Metoda MPN)

10 g sampel ikan dianalisis menggunakan metoda MPN-3 tabung untuk uji kualitatif koliform. Sampel dihomogenkan dengan menggunakan blender steril dengan penambahan akuadest steril 100 mL dan kemudian diinokulasikan ke medium LBSS dan LBDS. Sampel dengan pengenceran 10⁻¹ (tabung A) menggunakan LBDS, sedangkan sampel dengan pengenceran 10⁻² (tabung B) dan 10⁻³ (tabung C) menggunakan LBSS, masing-masing tabung diisi dengan 9 mL mediumnya. Sampel yang ditambahkan juga berbeda pada seri tabungnya, pada tabung A digunakan 10 mL, tabung B digunakan 1 mL dan pada tabung C digunakan 0.1 mL. Medium yang telah ditambahkan sampel dan berisi tabung durham lalu diinkubasi pada 37°C selama 24-48 jam. Tabung LB akan menunjukkan kekeruhan, perubahan pH menjadi asam dan terbentuknya gas pada tabung durham yang membuktikan positif adanya bakteri koliform.

Uji Kualitatif Fecal Koliform

Dua *loop* dari LB yang positif dinokulasikan ke dalam tabung yang berisi 5 mL BGLBB. BGLBB akan menunjukkan kekeruhan dan produksi gas selama inkubasi yang menunjukkan positif adanya fecal koliform (*Escherichia coli*), inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 44,5°C pada waterbath.

Isolasi *Escherichia coli*

Untuk isolasi *E.coli*, 2 loop dari tabung BGLBB yang positif digoreskan pada Endo Agar. Koloni berwarna metallik sheen menunjukkan bakteri *Escherichia coli* diambil dari medium tersebut.

Pemurnian *Escherichia coli*

Pemurnian *E.coli* dengan TSA dengan konsentrasi 10 g dalam 1 L. TSA dapat juga digunakan untuk deteksi dan enumerasi bakteri *E.coli* dalam air.

Uji Biokimia *Escherichia coli*

Berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacterology* untuk identifikasi bakteri *E.coli* secara biokimia, dilakukan tiga uji, yaitu uji Indol, uji laktosa dan uji sitrat.

Uji Resistansi Terhadap Antibiotik

Pada penelitian ini digunakan Media difusi menggunakan kertas disk yang berisi antibiotik dengan konsentrasi tertentu. Pada metode difusi, media yang dipakai adalah agar Mueller Hinton. Suspensi bakteri diuji sensitifitas dengan meratakan suspensi bakteri tersebut pada permukaan media agar dengan metoda tuang. Disk antibiotik diletakkan di atas media tersebut dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 19-24 jam. Disk antibiotik yang digunakan adalah *Ampicilin*, *Amoxicilin*, *Cloramphenicol* dan *Tetracyclin* dengan konsentrasi tertentu (Tabel 1). Disk antibiotik dengan merek BBL ini memiliki standar yang telah ditentukan.

Tabel 1. Daftar Konsentrasi Antibiotik yang Digunakan

No	Nama	Konsentrasi (µg)
1	<i>Ampicilin</i> (AM)	10
2	<i>Amoxicilin</i> (AML)	25
3	<i>Cloramphenicol</i> (C)	30
4	<i>Tetracyclin</i> (TE)	30

Isolasi DNA dan Karakterisasi strain *Escherichia coli*

Karakterisasi strain *Escherichia coli* dan untuk mengetahui adanya gen virulace menggunakan PCR. Primer yang digunakan adalah *stx₁*. Ekstraksi genom DNA

dilakukan dengan metode *Jeff Newman*. Isolat *Escherichia coli* dibiakan dalam medium Luria Bertani broth selama 16 jam. Kultur media dipindahkan dalam ependorf, kemudian disentrifus 14.000 rpm selama 3 menit. Supernatan dibuang, pellet kemudian tambahkan dengan 500 µl 1xTE, 50 µL SDS 10%, 5 µL proteinase K, selajutnya diinkubasi selama 1 jam dengan suhu 37°C. Setelah diinkubasi, dicuci dua kali dengan fenol : kloroform 1:1 sebanyak 600 µL, disentrifus 14000 rpm selama 5 menit. Lapisan supernatan paling atas dipindahkan kedalam ependorf baru. Supernatan tersebut ditambahkan 1/10 µL Na asetat dari volume total supernatan yang didapat dan 6/10 µL isopropanol dari volume total supernatan yang didapat. Bolak balik ependorf sampai DNA mengendap, kemudian disentrifus 14000 rpm selama 5 menit. Pellet dicuci dengan etanol 70% selama 30 detik kemudian keringkan hingga etanol hilang. Pellet yang merupakan DNA tersebut kemudian dilarutkan dalam 25 µL buffer TE dan siap untuk deteksi gen menggunakan mesin PCR.

Keterangan untuk gen *stx₁*

Primer 1 (EVT-1):

5'-CAACACTGGATGATCTCAG-3'

Primer 2 (EVT-2):

5'-CCCCCTCAACTGCTAATA-3'

Tiap-tiap komponen dimasukkan ke dalam tube PCR yang berisi template DNA, homogenkan dan masukkan ke mesin PCR yang telah dibuat program kerjanya.

Elektroforesis untuk gen *stx₁*

Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel agarose 1%. Gel ditambahkan Etidium Bromida sebelum dicetak. Elektroforesis menggunakan TBE 1x pada tegangan 100 Volt selama 30 menit. Selanjutnya dilihat hasil running di bawah lampu UV dengan menggunakan

Gel Doc. Pada foto yang didapatkan pada Gel Doc dapat dilihat pola pemisahan pita-pita DNA yang ukurannya diketahui melalui perbandingan dengan ukuran pita-pita standar 1Kb DNA *ladder* sebanyak 5µL, dimana ukuran pita-pita DNA *E.coli O157:H7* untuk gen *stx₁* adalah 349 bp.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Kualitatif Koliform (Metoda MPN)

Dari hasil uji koliform dengan metoda MPN, medium laktosa yang telah diinkubasi selama 24 jam hingga 48 jam menunjukkan adanya gas lebih dari 10% pada tabung durham, perubahan pH, dan kekeruhan. Ketiga hal ini harus ada untuk menunjukkan tabung positif bakteri koliform. Bakteri *Escherichia coli* memfermentasi laktosa sehingga terjadi perubahan pH dan gas. Perbedaan pH pada ketiga jenis tabung ini terjadi karena perbedaan jumlah bakteri yang difermentasi pada setiap tabung pengenceran, semakin kecil pengenceran semakin kurang asam hasil fermentasi laktosa ini.

Pada 24 jam pertama, dari seri tabung 3 didapatkan hasil tabung seri positif 3-2-2, total 7 tabung yang telah memenuhi ketiga syarat diatas, 2 tabung yang lain belum memenuhi syarat positif karena jumlah gas yang terdapat pada tabung durham belum mencapai 10% dari tinggi tabung tersebut. Kemudian setelah 48 jam, ke 9 tabung menunjukkan positif adanya bakteri koliform dengan seri tabung positif 3-3-3 seperti yang ditunjukkan pada tabel 4. Seri tabung ini dicocokkan dengan tabel MPN sehingga didapatkan jumlah bakteri koliform ≥ 2400 MPN/100 mL. Berdasarkan SNI, jumlah bakteri koliform yang diperbolehkan dalam ikan yang belum diolah adalah < 3 MPN/100 mL. Tingginya jumlah bakteri ini menyebabkan masyarakat yang akan mengonsumsi ikan ini harus

memperhatikan penanganan ikan ini. Cara penyimpanan dan pemasakan harus diperhatikan. Ikan harus dimasak dengan suhu diatas 70°C.¹⁹

Uji Kualitatif Fecal Koliform

Ke 9 tabung positif pada medium laktosa diinokulasikan sebanyak 2 loop pada medium BGLBB dan telah dinkubasi selama 24 jam dengan suhu 44.5°C menunjukkan adanya kekeruhan. Hal ini menunjukkan bahwa tabung-tabung tersebut positif bakteri fecal koliform. Laktosa yang terkandung dalam medium BGLBB difermentasikan oleh bakteri *E.coli* sehingga larutan menjadi keruh karena adanya gas yang dihasilkan dari proses tersebut.

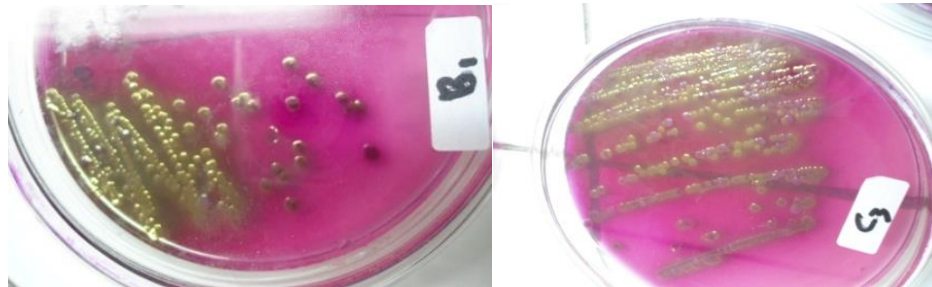
Bile (empedu) dan zat warna hijau yang terdapat pada BGLBB berguna untuk menghambat pertumbuhan organisme gram positif, sehingga hanya bakteri *E.coli* yang merupakan bakteri gram negatif yang tumbuh. Suhu yang digunakan yaitu 44.5°C merupakan suhu usus hewan berdarah panas yang merupakan habitat normal bakteri *E.coli*, sehingga hanya bakteri fecal koliform yang dapat tumbuh.

Isolasi *Escherichia coli*

Dari tabung-tabung positif feecal koliform, diinokulasikan pada medium Endo Agar. Bakteri *E.coli* akan membentuk warna kemilau metalik. Hasil dari tabung A, bakteri *Escherichia coli* yang menunjukkan warna hijau metalik terlihat pada bagian A1 namun tidak membentuk koloni tunggal, sedangkan pada A2 dan A3 tidak terlihat adanya warna hijau kemilau metalik yang menandakan *Escherichia coli* tidak terdapat pada tabung ini. Hasil dari inokulasi tabung B, ketiga petri menunjukkan adanya bakteri *Escherichia coli*, pada B1 dan B2 terdapat koloni tunggal sedangkan pada B3 tidak terdapat

koloni tunggal. Hasil dari inokulasi tabung C, Ketiga petri menunjukkan adanya bakteri *Escherichia coli*, pada C1 dan C3 terdapat koloni tunggal sedangkan pada C2 tidak terdapat koloni tunggal. Koloni tunggal tidak terbentuk disebabkan karena adanya bakteri lain yang menumpuk dan tidak terpisah sempurna. Warna medium sebelum digunakan adalah merah muda.

Pada medium endo agar terdapat Natrium sulfid dan fuchsin berfungsi sebagai penghambat pertumbuhan bakteri Gram positif. Warna koloni merah disebabkan bakteri *E. coli* dan koliform memetabolisme laktosa menjadi aldehyd dan asam sehingga aldehyd bereaksi dengan fuchsin. Koloni kilap logam disebabkan *E.coli* bereaksi dengan fuchsin kristal sehingga fuchsin tersebut diserap.



Gambar 1. *Escherichia coli* pada medium Endo Agar untuk B1 dan C3

Pemurnian *Escherichia coli*

Koloni tunggal yang terdapat pada medium endo agar, dimurnikan dengan medium Tryptic Soy Agar. Lima koloni diambil dari petri yang memiliki koloni tunggal yaitu B1, B2, C1 dan C3. Dua koloni diambil dari satu petri yang sama yaitu B2 (B21 dan B22) sehingga didapatkan 5 kultur bakteri.



Gambar 2. Pemurnian *Escherichia coli* pada medium TSA

Uji Biokimia Bakteri *Escherichia coli*

Uji indol yang telah dilakukan pada ke 5 sampel menunjukkan positif bakteri *Escherichia coli*, dilihat dari terbentuknya cincin merah pada bagian atas medium fermentasi setelah penambahan reagen

Kovac's. Uji Indol menggunakan media Tryptone Broth dan penambahan larutan Kovac's. Dimana larutan Kovac's mengandung amil alkohol sehingga adanya indol akan menyebabkan amil alkohol berubah warnanya menjadi merah. Uji indol menunjukkan bahwa bakteri yang tergolong dalam grup fekal yaitu *E. coli* dapat memecah asam amino triptofan. Adanya enzim triptopanase pada bakteri ini akan memecahkan asam amino triptopan dan amoniak. Dalam metabolismenya bakteri ini menggunakan tryptopan sebagai sumber energi. Indol adalah produk sisa dengan bau fecal.³⁰

Uji laktosa yang merupakan salah satu uji karbohidrat menunjukkan bahwa ke 5 kultur positif bakteri *Escherichia coli*. Medium laktosa yang digunakan berubah warna, dari merah bata menjadi kuning, hal ini menunjukkan adanya proses fermentasi yang dilakukan oleh bakteri *Escherichia coli*. Kemampuan memfermentasikan berbagai karbohidrat dan produk fermentasi yang dihasilkan merupakan ciri yang sangat berguna

dalam identifikasi mikroorganisme. *Escherichia coli* menggunakan laktosa sebagai sumber karbon. Perubahan warna medium mejadi kuning disebabkan karena terdapatnya indikator brom timol blue (BTB) dalam medium. Dimana penambahan indikator BTB ke dalam medium yang mengalami fermentasi karbohidrat jadi asam dalam keadaan aerob, maka pH akan turun dan akhirnya indikator BTB ini akan berubah warna menjadi kuning.³⁰

Ke 5 kultur yang telah diinokulasikan pada medium *Simmon's Citrate Agar*, tidak menunjukkan adanya perubahan warna medium yang bewarna hijau dan tidak tumbuhnya bakteri *E.coli* (negatif uji sitrat). Uji sitrat ini bertujuan untuk mengetahui penggunaan sitrat sebagai sumber karbon. Dari uji yang dilakukan diperoleh hasil yang negatif berarti *E. coli* tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Bakteri *Escherichia coli* dapat menggunakan asetat sebagai sumber karbon, tetapi tidak dapat menggunakan sitrat.³⁰

Berdasarkan uji-uji ini (Tabel 2), dapat dipastikan bahwa kultur ini positif bakteri *Escherichia coli*.

Tabel 2. Uji Biokimia 5 kultur Bakteri *Escherichia coli*

	Uji Laktosa	Uji Indol	Uji Sitrat
B1	+	+	-
B21	+	+	-
B22	+	+	-
C1	+	+	-
C3	+	+	-

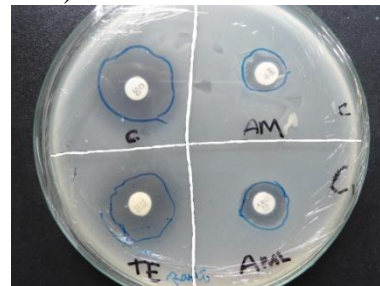
Keterangan : + = uji positif, - = uji negative

Uji resistansi terhadap antibiotik

Setelah dilakukan uji identifikasi, dilakukan uji resistensi bakteri yang ditemukan terhadap beberapa antibakteri

dengan menggunakan metode difusi agar. Bakteri ditanam di media MHA, dengan metoda tuang. Selanjutnya ditaruh keempat disk antibakteri dengan jarak yang sama . Antibakteri akan berdifusi ke media agar sehingga menghambat pertumbuhan bakteri. Zona hambat berupa zona bening yang terbentuk diukur dan dibandingkan dengan standar untuk menentukan sifat resistensi bakteri.

Antibiotik yang digunakan adalah, *amoxicilin*, *ampicilin*, *tetracyclin* dan *chloramphenicol*. Keempat antibiotik ini sangat mudah didapatkan dan banyak ditemukan telah resistan terhadap bakteri patogen. Pada tabel 3, halozone yang terbentuk paling besar terdapat pada petri B22 dengan antibiotik *amoxicillin* dan petri C1 pada antibiotik *chloramphenicol* Resistansi yang paling besar terdapat pada antibiotik ampicilin pada petri C1 (Gambar 3).



Gambar 3. Uji resistansi Bakteri *Escherichia coli* pada C1

Hasil yang didapatkan, *amoxicillin* memiliki 2 kultur resistan, 2 kultur intermediet dan 1 kultur susceptible, *ampicilin* memiliki 2 kultur resistan, 2 kultur intermediet dan 1 kultur susceptible, pada *chloramphenicol* tidak terdapat kultur yang resistant, 2 kultur intermediet dan 3 kultur susceptible; pada *tetracyclin* terdapat 2 kultur yang resistan, 3 kultur intermediet, tidak ada kultur susceptible. Berdasarkan persentasi, 30% kultur resistant, 45% intermediet dan 25 % susceptible terhadap keempat antibiotik (Tabel 4).

Tabel 3. Hasil halozone dalam millimeter (mm)

Antibiotik /No. Petri	<i>Amoxicilin</i> (AML)	<i>Ampicilin</i> (AM)	<i>Cloramphenicol</i> (C)	<i>Tetracyclin</i> (TE)
B1	13.5	14	13	14
B21	16	14.5	18.75	13.25
B22	20.5	18.5	19	17.5
C1	12.75	11	20.25	18.25
C3	9.75	9	16.75	15.25

Tabel 4. Total kultur berdasarkan jenis antibiotik dan kategori

No	Nama Antibiotik	Resistant	Intermediet	Susceptible
1	<i>Amoxicilin</i>	2	2	1
2	<i>Ampicilin</i>	2	2	1
3	<i>Cloramphenicol</i>	-	2	3
4	<i>Tetracyclin</i>	2	3	-
	Total	6 (30%)	9 (45%)	5 (25%)

Berdasarkan tabel 8, kategori sensitifitas tertinggi pada kategori intermediet, hal ini menunjukkan bahwa antibiotik yang biasa digunakan untuk diare ini sudah mengalami penurunan efektifitas. Dalam kategori ini antibiotik tidak dapat dipastikan dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang dituju. Kategori resistant yang walaupun tidak terlalu tinggi perlu diwaspadai, karena bila penggunaan antibiotik masih tidak memenuhi standar yang ditetapkan, persen kategori ini dapat menjadi lebih tinggi. Kelemahan *penicillin* (*amoxicillin* dan *ampicillin*) adalah sifatnya yang berspektrum sempit dan peka terhadap penisilinase (β -laktamase), yaitu enzim yang diproduksi oleh bakteri terutama *Staphylococcus* yang dapat mematahkan cincin β -laktam pada molekul penisilin. Pada bakteri *Escherichia coli*, β -laktamase

dihasilkan dalam konsentrasi rendah dan terikat pada membrane luar. Enzim ini mencegah antibiotik β -laktam untuk mencapai target pada membran sitoplasma dengan cara merusaknya saat antibiotik tersebut melewati membrane luar dan lapisan periplasma. Gen yang mengkode β -laktamase terdapat pada kromosom bakteri, pada beberapa strain bakteri juga terdapat pada plasmid dan transposon. Sebagian besar bakteri resisten penisilin juga memiliki gen β -laktamase pada plasmid, terutama plasmid R dan transposon.²⁴

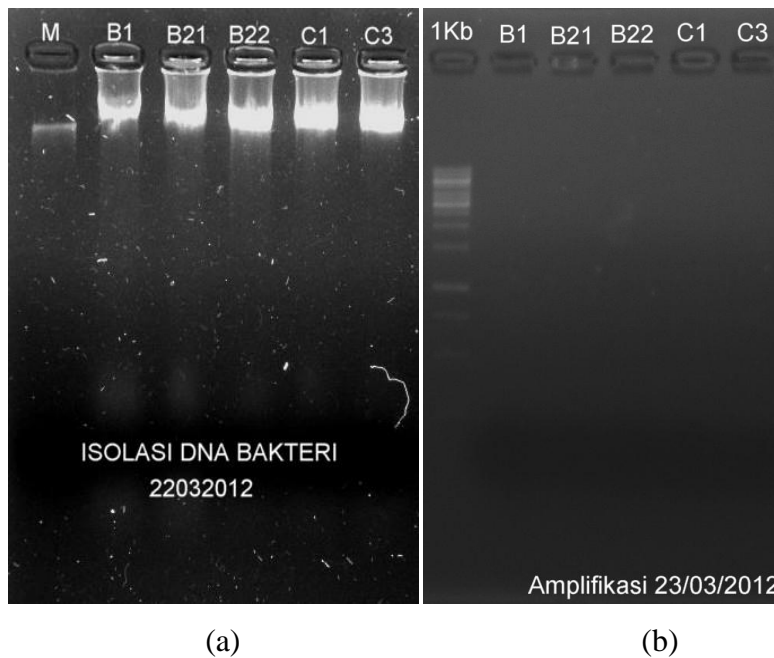
Resistansi yang terjadi pada *tetracycline* muncul bila dihasilkan membrane sitoplasma (bentuk perubahan) dan mencegah pengikatan *tetracycline* pada subunit 30S ribosom, sehingga sintesis protein dapat terus berlangsung. Mekanisme resistansi *tetracycline* lainnya

adalah resistansi pompa eflux, didasarkan atas transport *tetracycline* keluar sel secara cepat, sehingga mencegah akumulasi *tetracycline* pada dosis toksik, sehingga sintesis protein bakteri tidak terhambat. Hal ini terjadi akibat adanya mutasi pada gen yang menyebabkan dihasilkan protein eflux *tetracycline*.²⁴ Resistansi yang menjadi perhatian dunia saat ini, diakibatkan karena penggunaan antibiotik yang tidak rasional, Dr. Sharad Adhikary dari WHO menyatakan bahwa kekebalan kuman membuat kita bisa kembali ke era sebelum antibiotik ditemukan. Antibiotik hanya menyembuhkan penyakit akibat infeksi bakteri. Bakteri mampu bermutasi sehingga tahan antibiotik. Andhikary

mencontohkan kemunculan “Super Bug” (bakteri yang tak dapat dilemahkan) oleh antibiotik mutakhir. Pengobatan infeksi oleh bakteri yang kebal antibiotik menjadi amat mahal karena membutuhkan antibiotik lebih mutakhir dengan efek samping lebih besar serta pengobatan lebih panjang.³¹

Isolasi DNA dan Karakterisasi Strain *Escherichia coli*

Untuk mendeteksi gen *stx₁* yang merupakan salah satu gen pendeteksi bakteri *Escherichia coli* O157:H7 yang terdapat pada kelima kultur dilakukan dengan metoda amplifikasi. Perlakuan awal dilakukan dengan mengisolasi DNA dengan metoda *Jeff Newman*.



Gambar 4. (a) Hasil elektroforesis isolasi DNA *Escherichia coli*, M = lamda
(b) Hasil Amplifikasi lima kultur *Escherichia coli*, M= 1 Kb

Hasil elektroforesis menunjukkan konsentrasi DNA hasil isolasi (gambar 4a). Intensitas dari kelima sampel dibandingkan dengan intensitas marker atau lamda. Konsentrasi DNA hasil isolasi

dihubungkan dengan intensitas marker yang digunakan, konsentrasi lamda yang digunakan adalah 100 ng/μL. Untuk B1 dan B21, diperkirakan intensitas yang didapatkan adalah 15 kali lamda sehingga

didapatkan konsentrasi DNA hasil isolasi diperkirakan sebesar 1500 ng/μL, sedangkan ke tiga kultur DNA lainnya memiliki intensitas 20 kali lamda sehingga didapatkan konsentrasi DNA 2000 ng/μL. DNA ini kemudian diencerkan untuk digunakan sebagai templete pada PCR untuk amplifikasi. Berdasarkan hasil elektroforesis yang sebelumnya telah diamplifikasi dengan primer *stx₁* (Gambar 7b), tidak ditemukan pita-pita DNA amplicon yang menunjukkan ukuran dari DNA tersebut. Ukuran DNA yang diharapkan adalah 349 bp. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat gen *stx₁* pada bakteri *Escherichia coli* hasil isolasi dari ikan balang, yang menandai adanya bakteri *Escherichia coli* O157:H7.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan, didapatkan jumlah bakteri koliform dan feacal koliform (*Escherichia coli*) berdasarkan metoda MPN adalah ≥ 2400 MPN/100mL (Standar SNI <3 MPN/100 mL). Uji biokimia yang telah dilakukan menunjukkan 5 kultur merupakan bakteri *Escherichia coli*. Hasil uji biokimia didapatkan uji laktosa dan uji indol positif sedangkan uji sitrat negatif. Pola resistansi antibiotik terhadap *Escherichia coli* dalam persen adalah 30% kultur resistant, 45% intermediet dan 25 % susceptible terhadap keempat antibiotik (*ampicilin, amoxicilin, tetracyclin dan chloramphenicol*). Hasil deteksi gen *stx₁* pada 5 kultur Bakteri *Escherichia coli* patogen yaitu *Escherichia coli* O157:H7, tidak ditemukan berdasarkan hasil amplifikasi.

DAFTAR PUSTAKA

1. I. Chahaya. Ikan sebagai Alat Monitor Pencemaran. Bagian Kesehatan Lingkungan Fakultas Kesehatan

- Masyarakat Universitas Sumatera Utara. *USU digital library*.(2003)
2. A.E Putri. *Kondisi Jantung dan Nilai Darah Ikan Nila (Oreochromis niloticus L.) yang Terdapat di Batang Arau Kota Padang*. Skripsi Sarjana Biologi Padang : Universitas Andalas (2010).
 3. L. Novotny, L Dvorska, A.Lorencova, V. Beran and I. Pavlik. Fish: a Potential Source of Bacterial Pathogens for Human Being. *Rewiew Article Vet. Med. – Czech*,49(9).2004. pp. 343–358.
 4. L. Beutin, S. Zimmerman and K. Gleier. Human Infections with Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. *Emerging Infectious Diseases*. 4, 4.1998. pp. 635-639.
 5. A. Pruss, E.Giroult. 2005. *Pengelolaan Aman Limbah Layanan Kesehatan*. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 2005.
 6. Z. Zaini. *Efektifitas Pengolahan Limbah Rumah Sakit Umum Pusat Dr.M.Djamil Padang*. Tesis Pasca Sarjana. Universitas Andalas (2002).
 7. H.S Kumar, A. Parvathi, I. Karunasagar and I.Karunasagar. Prevalence and Antibiotik Resistance of *Escherichia Coli* in Tropical Seafood. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Springer (2005).
 8. Refdanita, Maksum, Nurgani, Endang. Pola Kepekaan Kuman Terhadap Antibiotika di Ruang rawat Intensif Rumah Sakit Fatmawati. *Makara, Kesehatan* Vol. 8 No. 2. 2001. hal 41-48.
 9. Dwiprasto, Iwan, Erna Kristin. Improvin The Use of Antibiotik in Primary Health Centers Through a Problem Based Pharmacotherapy Training Approach. *Berkala Ilmu*

- Kedokteran* Vol.35, No.3. (2003)
Gajah Mada University
10. Fadil, Muhammad Syukri. *Kajian Beberapa Aspek Parameter Fisika Kimia Air Dan Aspek Fisiologis Ikan Yang Ditemukan Pada Aliran Buangan Pabrik Karet Di Sungai Batang Arau*. Tesis Pasca Sarjana. Universitas Andalas (2011).
 11. Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia www.kkp.go.id
 12. Jawetz, Melnick, Adelberg. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran (Edisi 1)*. Penerjemah: Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Jakarta. 2001. hal 224-230.
 13. N.T Perna, G.P. Ill, V. Burland, B. Mau, J.D Glasner, D.J Rose, G.F Mayhew, P.S Evans, J. Gregor, H.A Kirkpatrick. Genome Sequence of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409:529-31.(2001).
 14. C. Su, L.J Brandt. *Escherichia coli* O157: H7 infection in humans. *Annals Internal Med* 123(9). 1995.pp.698-707.
 15. G.L Armstrong, J. Hollingsworth, G.J Morris. Emerging Foodborne Pathogens : *Escherichia coli* O157:H7 as a Model of Entry of a New Pathogen Into the Food Supply of the Developed World. *Epidemiologic Reviews*. 16, 1,1996. pp.29-46.
 16. C.K Audrey, Kristin, F. B. Breidt Jr, H. Hassan . Effects of pH Dissolved Oxygen and Ionic Strength on The Survival of *Escherichia coli* O157:H7 In Organic Acid Solutions. *Journal Of Food Protection*. 71, 12. 2008. pp. 2404–2409.
 17. N.H Dini. *Deteksi Gen eae, stx₁, stx₂ dari Bakteri Escherichia coli O157:H7 pada Ikan Lele Dumbo (Clarias garlepinus) dengan menggunakan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction)*. Skripsi Fakultas Farmasi. Universitas Andalas. (2010)
 18. H. Nirwati, S.Iravati, M. Aria, A.I Putu, M. Restu, R. Rendy. The use of bacteriophage therapy for curing the *Escherichia coli* O157 infection in mice. *Berkala Ilmu Kedokteran*. 40.2008. pp. 119-124.
 19. A.A Djamal, Marlina, Yuherman. *Karakterisasi Gen Penghasil Toksin Pada Bakteri Patogen Escherichia coli O157 Dalam Rangka Penanggulangan Penyakit Diare Berdarah pada Masyarakat*. Skripsi Fakultas Farmasi. Universitas Andalas. (2009)
 20. S. Wahyudi. *Deteksi Gen Patogenik Bakteri Escherichia coli O157:H7 Dan Vibrio Parahaemolyticus dari Sampel Lokan (Batissa violacea) Dengan Metoda PCR (Polymerase Chain Reaction)*, Skripsi Fakultas Farmasi. Universitas Andalas. (2009)
 21. R.F. Sari. *Isolasi dan Deteksi Gen stx1 dan stx2 dari bakteri Escherichia coli O157:H7 pada sampel Langkitang (faunus ater) dan Pensi (Corbicula moltkiana Prime) dengan metoda Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Skripsi. Universitas Andalas. (2009)
 22. A.W Paton, J.C Paton. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 11, 3, p450-471. (1998)
 23. S.G Ganiswara. *Farmakologi dan Terapi*. (4th Ed). Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 2005. hal.575-593
 24. S.T Pratiwi. *Mikrobiologi Farmasi*. Penerbit Erlangga. Jakarta. 2008. hal 154-167
 25. H.S. Kumar. Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in Fresh Seafood and Meat marketed in Mangalore, India by PCR. *Letters in*

- Applied Microbiology*, 33.2001. pp. 334-338
26. J. Sambrook, D.W. Russel D.W. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Volume 1. Third Edition. CSHL Press. New York. 2001
 27. P.A.Kumar. Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents and Microbiological Quality among *Escherichia coli* Isolated from Dry Fishes in Southeast Coast of India. *Roumanian Biotechnological Letters* Vol. 13 No. 6. 2008. pp. 3984-3989.
 28. M.A. Akond, S.M.R. Hassan, S. Alam & M.Shirin. Antibiotic Resistance of *Escherichia Coli* Isolated From Poultry and Poultry Environment of Bangladesh. *American Journal of Environmental Sciences* 5 (1). 2009 . pp. 47-52.
 29. Jamsari. *Bioteknologi Pemula, Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler*. Unri press. Riau. 2007. Hal 59-75
 30. Fatchiyah. *Polimerase Chain Reaction (Dasar Teknik Amplikasi DNA dan Aplikasinya)*. Unibraw. Malang. 2006.
 31. A. Agusta. *Biologi dan Kimia Jamur Endofit*. Penerbit ITB. Bandung. 2009. Hal 11-17
 32. D.H Bergey. *Bergey's Manual of Determinative Bacterology*. The Williams & Wilkins Company. USA. 1957
 33. L.K Anna. *Penggunaan Antibiotik Makin Mengkhawatirkan*. *Koran Kompas edisi 28 Maret 2011*