



**DETEKSI MOLEKULER BAKTERI *Escherichiacoli* SEBAGAI PENYEBAB
PENYAKIT DIARE DENGAN MENGGUNAKAN TEHNIK PCR**

**MOLECULAR DETECTION OF *Escherichia coli* BACTERIA AS A CAUSE OF
DIARRHIC DISEASE USING TECHNIQUES OF PCR**

Ismaun^{1*}, Muzuni², Nur Hikmah¹

¹ Program Studi Pendidikan IPA, Fakultas Tarbiyah dan Ilmu Keguruan, Institut Agama Islam Negeri (IAIN) Kendari. Indonesia.
Jl. Sultan Qaimuddin No. 17 Baruga Kendari Telp. (0401) 3192081 Fax. (0401) 3193710

² Program Studi Bioteknologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Halu Oleo, Indonesia.
Kampus Hijau Bumi Tridarma Jl. H.E.A. Mokodompit Kec. Kambu Kendari 93232

* Corresponding author : ismaun_maun@yahoo.co.id

Abstrak

Penelitian ini dilakukan untuk mendeteksi secara molekuler bakteri *Escherichia coli* sebagai penyebab penyakit diare dengan menggunakan tehnik PCR. DNA genomik *Escherichia coli* diekstraksi menggunakan metode *boiling*, kemudian diamplifikasi menggunakan *primer 16E1* dan *16E2*. Hasil PCR positif *Escherichia coli* ditunjukkan dengan adanya pita fragmen DNA pada ukuran sekitar 584 pasang basa pada gel elektroforesis. Dalam penelitian ini sampel yang digunakan adalah sebanyak delapan titik dengan distribusi empat titik dari sampel air sumur bor dan empat dari air sumur galian. Dari delapan titik sampel, ada satu sampel yang terdeteksi secara molekuler yaitu mengandung *Escherichia coli* yaitu dengan kode sampel ASB 3 yang dibuktikan dengan adanya pita DNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode PCR dapat mendeteksi *Escherichia coli* secara spesifik dan lebih cepat.

Kata Kunci : Air, Bakteri *Escherichia coli*, Isolasi DNA, Tehnik PCR.

Abstract

This research was conducted to detect molecularly *Escherichia coli* bacteria as a cause of diarrheal disease by using PCR technique. *Escherichia coli* genomic DNA was extracted using the boiling method, then amplified using primers 16E1 and 16E2. The positive PCR results of *Escherichia coli* are demonstrated by the presence of DNA fragment bands at a size of about 584 base pairs on the electrophoresis gel. In this study the samples used were eight points with a distribution of four points from borehole water samples and four from dug well water. From eight sample points, there is one sample that is detected molecularly, which contains *Escherichia coli*, namely the ASB 3 sample code, which is proven by the presence of DNA bands. The results showed that the PCR method could detect *Escherichia coli* specifically and more quickly.

Keywords: Water, *Escherichia coli* bacteria, DNA Isolation, PCR technique

Pendahuluan

Kesehatan lingkungan merupakan suatu kondisi atau keadaan lingkungan yang optimal sehingga berpengaruh positif terhadap terwujudnya status kesehatan yang optimal pula (Notoatmodjo, 2007). Banyak aspek kesejahteraan manusia dipengaruhi oleh lingkungan, diantaranya adalah penyakit yang terjadi di masyarakat dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan (Mulia, 2005). Masalah kesehatan yang banyak terjadi di dunia adalah penyakit dan kematian dini yang disebabkan oleh faktor-faktor biologi di lingkungan manusia seperti di air, makanan, udara, dan tanah. Penyebab-penyebab tersebut dapat mengakibatkan kematian dini atas jutaan orang khususnya pada bayi dan anak-anak (WHO, 2001).

Menurut Organisasi kesehatan dunia WHO data pemenuhan kebutuhan air tiap orang adalah 60 sampai 120 Liter per hari untuk dinegara-negara maju, sedangkan untuk dinegara-negaraberkembang, salah satunya adalah Indonesia tiap orang memerlukan air antara 30 sampai 60 Liter perhari. Air minum merupakan sesuatu yang sangat berpengaruh terhadap kesehatan, sebagai contoh banyaknya apenyakit lingkungan yang menyerang masyarakat disebabkan oleh kurang bersihnya air minum yang dikonsumsi atau pun kebiasaan yang buruk yang mencemari lingkungan (Notoatmodjo, 2007).

Diare atau penyakit diare diartikan sebagai buang air encer lebih dari empat kali sehari, baik disertai lender dan darah maupun tidak (Widjaja, 2000). Menurut WHO, penyakit diare merupakan salah satu penyebab utama kematian balita di Negara berkembang. Angka kejadian diare pada anak tiap tahun diperkirakan 2,5 milyar, dan lebih dari setengahnya terdapat di Afrika dan Asia Selatan dan akibat dari penyakit ini lebih berat serta mematikan. Secara global setiap tahun penyakit ini menyebabkan kematian balita sebesar 1,6 juta (Hannif, dkk., 2011). Di negara Indonesia, diare merupakan masalah kesehatan masyarakat karena morbiditas dan mortalitasnya yang masih tinggi. Survei morbiditas yang dilakukan oleh Subdit Diare Departemen Kesehatan dari tahun 2000 s/d 2010 terlihat kecenderungan insidens naik. Pada tahun 2000 penyakit Diare 301/1000 penduduk, tahun 2003 naik menjadi 374/1000 penduduk, tahun 2006 naik menjadi 423/1000 penduduk dan tahun 2010 menjadi 411/1000 penduduk (Kementrian Kesehatan RI, 2011).

Data Dinas Kesehatan Provinsi Sulawesi Tenggara menunjukkan bahwa pada tahun 2013 prevalensi penyakit diare di Sulawesi Tenggara sebesar 50.517 per 1.000.000 penduduk, pada tahun 2014 prevalensi penyakit diare sebesar 51.628 per 1.000.000 penduduk dan pada tahun 2015 prevalensi diare sebesar 52.830 per 1.000.000 penduduk. Penyakit diare masih menjadi masalah kesehatan masyarakat Sulawesi Tenggara, walaupun secara umum angka kesakitan dan kematian diare yang dilaporkan oleh sarana pelayanan kesehatan di Kota Kendari mengalami penurunan, namun demikian diare sering menimbulkan KLB dan berujung pada kematian (Dinkes Provinsi Sulawesi Tenggara, 2015).

Berdasarkan laporan dari Seksi Bina P2PL Dinkes Kota Kendari, pada tahun 2013 tercatat jumlah kasus diare di Kota Kendari sebanyak 5.400 kasus, pada tahun 2014 sebanyak 5.398 kasus dan pada tahun 2015 sebanyak 5.038 kasus diare di Kota kendari sehingga penyakit diare masih menjadi masalah kesehatan masyarakat (Dinkes Kota Kendari, 2016).

Penyakit diare adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri, virus atau infestasi parasit, malabsorpsi, alergi, keracunan, imunodefisiensi dan sebab-sebab lainnya. Penyakit diare bias muncul sepanjang tahun dan bias menyerang seluruh kelompok umur. Namun, kelompok usia anak-anak adalah kelompok usia yang sering menderita penyakit diare karena daya tahan tubuhnya yang masih lemah. Penyakit ini berkaitan dengan kondisi lingkungan (Widoyono, 2010). Penggunaan air

yang tercemar dapat menurunkan derajat kesehatan masyarakat karena timbulnya penyakit bawaan air (*water borne diseases*) salah satunya adalah penyakit diare. Penyakit diare termasuk sepuluh besar penyakit yang sering terjadi di Indonesia yang disebabkan oleh bakteri yang terkandung dalam air. Diare dapat disebabkan oleh bakteri/virus seperti : Rotavirus, *Escherichia coli Enterotoksigenik* (ETEC), *Shigella*, *Compylobacter Jejuni*, *Cryptospondium* (Yuliasri, R., dan Indra, R., 2010).

Adanya mikroorganisme di dalam air menjadi suatu indikator pencemaran penyakit. Wilayah perairan mudah tercemar oleh mikroorganisme patogen yang datang dari berbagai sumber seperti pertanian, pemukiman dan peternakan. Mikroorganisme yang banyak dikategorikan sebagai sumber tercemarnya suatu air adalah bakteri *Escherichia coli*, yang termasuk dalam salah satu bakteri coliform dan dapat hidup normal di dalam tinja manusia dan hewan. Adanya bakteri ini dapat digunakan sebagai indikator dalam sanitasi yang tidak baik karena bakteri ini dapat menyebar dengan melalui tangan yang masuk ke mulut atau mengkontaminasi mulut atau dengan pemindahan secara pasif melalui air, makanan susu dan produk-produk lainnya (Falamy dkk., 2013).

Menurut Widianti, bakteri coliform adalah suatu kelompok bakteri yang menjadi indikator adanya polusi kotoran dan menandakan kondisi yang tidak baik pada air dan makanan. Bakteri coliform yang berada dalam makanan atau minuman menunjukkan adanya mikroba yang bersifat enteropatogenik dan toksigenik yang berbahaya bagi kesehatan. Salah satu bakteri coliform yang mempunyai banyak spesies adalah *Escherichia coli*. *Escherichia coli* menjadi sesuatu yang dapat memberikan petunjuk sanitasi keberadaan *Escherichia coli* dalam pangan seperti air atau makanan tersebut sudah tercemar oleh feses manusia (Widianti P., dan Ristianti N. 2005).

Bakteri coliform dalam air dibedakan menjadi 3 kelompok yaitu fecal coliform, coliform total dan *Escherichia coli*. *Escherichia coli* dan fecal coliform sebagai indikasi kuat diakibatkan kontaminasi tinja dari manusia dan hewan (Tururaja T., dan Moge R., 2010). Fecal coliform dan *Escherichia coli* sama-sama memiliki risiko besar menjadi mikroba yang menimbulkan penyakit di dalam air. Bakteri fecal coliform atau *Escherichia coli* yang telah mencemari air memiliki akibat yang langsung dapat dirasakan oleh konsumen. Keadaan ini yang mengharuskan pemerintah bertindak melalui penyuluhan atau promosi kesehatan, investigasi, dan memberikan cara untuk mencegah penyebaran penyakit yang dapat ditularkan melalui air (Hartini, 2009).

Selama ini telah banyak dilakukan penelitian terhadap kualitas penggunaan air dengan tujuan untuk mengurangi kejadian penyakit diare khususnya pada pengendalian bakteri *E. coli* yang merupakan penyebab umum penyakit diare, yaitu dengan pembuatan ekstraktalum (tawas), kapur, Fero Fosfat (FeSO_4), Polialuminium klorida (PAC), Biji Kelor, dan lain-lain. Namun masyarakat dan para pelaku industry belum menyadari hal tersebut mengingat penggunaan dan penelitian di Indonesia belum cukup berkembang (Erfandi, 2015).

Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah salah satu teknik deteksi molekuler yang digunakan untuk mengidentifikasi penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Escherichia coli*. Metode ini memiliki banyak kelebihan yaitu dapat menghasilkan amplifikasi produk yang akurat, cepat, spesifik, membutuhkan jumlah sampel yang sedikit dan metode ini dapat digunakan untuk mengatasi kelemahan diagnostic konvensional (kultur). Berdasarkan uraian di atas, penting untuk dilakukan penelitian terhadap deteksi kandungan air yang digunakan oleh sivitas akademik IAIN Kendari apakah mengandung bakteri *Escherichia coli* sebagai penyebab penyakit diare secara molekuler dengan teknik PCR

Metodologi Penelitian

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah micropipette, tip, sentrifugator, *vortex*, set elektroforesis, mesin PCR, tabung ependorff, *photoforesis*, Erlenmeyer, *hotplate*, *spectrophotometer*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah air sumur galian dan air sumur bor yang diambil dari sumur yang tersebar di wilayah Kampus IAIN Kendari Kota Kendari enam titik lokasi dan kabupaten Konawe Selatan dua titik lokasi, *primer*, *master mix*, agarose, PCI (*Phenol-Chloroform-isoamil Alcohol*), *etidium bromide*, TAE (*Tris-acetil EDTA*) 1X, etanol 70%, etanol absolute, aquades, dan *loading dye*.

Prosedur Kerja

Penyiapan Template DNA

Sampel air (1 mL) dikultur pada media LB (5 mL), diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C, kultur bakteri kemudian dipindahkan pada tabung *eppendorf* 1,5 ml, kemudian tabung disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 5.000 rpm pada suhu 8 °C. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung *eppendorf* baru yang steril ukuran 1,5 ml, kemudian tabung ditambahkan larutan I 100 µl dan disuspensi, kemudian disimpan di kulkas selama 5 menit, ditambahkan larutan II sebanyak 200 µl dan divortex kembali, ditambahkan larutan III sebanyak 150 µl dan divortex kembali.

Tabung kemudian disentrifugasi kembali selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 8 °C. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung *eppendorf* baru yang steril ukuran 1,5 ml, lalu ditambahkan 1 x Phenol Cloroform, dibolak balik 5-10 kali. Tabung kemudian disentrifugasi kembali selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 °C. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung *eppendorf* baru yang steril ukuran 1,5 ml, lalu ditambahkan 0,1x volume sodium asetat (NaOAc) 3 M pH 5,2 dan ditambah dengan 1x volume etanol absolut dingin. Tabung dibolak-balik perlahan dan diinkubasi pada suhu -20 °C selama 30 menit. Tabung kemudian disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C.

Pelet yang terbentuk dicuci dengan 0,5 ml etanol 70%, dibolak balik 5-10 kali dan tabung yang berisi pelet (mengandung DNA genom). Tabung kemudian disentrifugasi selama 4 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C. Pelet diambil dan dikeringkan selama 30-45 menit. Setelah kering, tabung berisi pelet kemudian ditambahkan dH₂O 40 µl. Untuk memastikan apakah DNA yang digunakan pada proses PCR berkualitas baik, dapat diuji dengan elektroforesis dan spektrofotometer. Pada penelitian ini dilakukan uji dengan elektroforesis.

Pengujian kualitas DNA menggunakan elektroforesis

Sebanyak 3 µl DNA sampel dihomogenkan dengan *loading dye* 1 µl dan H₂O sebanyak 6 µl. Selanjutnya larutan DNA dimasukkan ke dalam sumur agarosa konsentrasi 1% lalu kemudian dielektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 100 volt 80 A. DNA yang berkualitas baik akan terlihat berpendar dan tidak *smear* ketika diamati menggunakan *ultra violet transilluminator*.

Polymerase chain reaction (PCR) dan elektroforesis

Reaksi PCR menggunakan *PCR kit Go Taq Green Master Mix 2x*. Komposisi reaksi PCR adalah DNA *template* 1 µl, *primer forward* 0,5 µl [0,5 µM], *primer reverse* 0,5 µl [0,5 µM], *Taq Green Master Mix 2x* 5 µl dan dH₂O 3 µl. Reagen PCR tersebut

kemudian disatukan ke dalam tabung *ependorf* steril ukuran 0,5 ml kemudian divortex dan *dispindown*, lalu dimasukkan ke dalam mesin PCR.

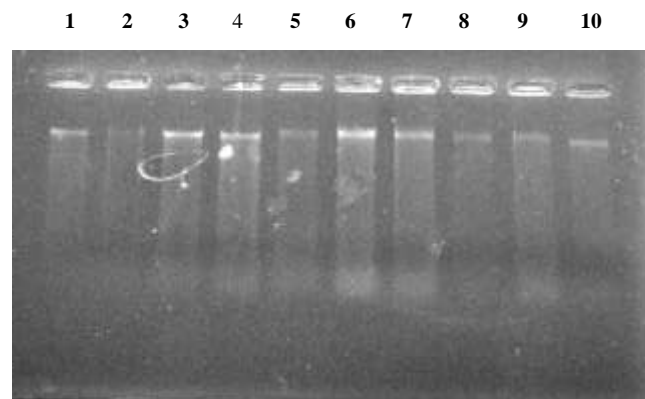
Reaksi PCR dilakukan sebanyak 35 siklus dengan kondisi *Pre- PCR*, selama 5 menit pada suhu 94 °C, *Denaturasi*, selama 1 menit pada suhu 94 °C, *Annealing*, selama 45 detik pada suhu 51°C, *Extension*, selama 1,5 menit pada suhu 72 °C, dan *Post- PCR*, selama 5 menit pada suhu 72 °C.

Hasil amplifikasi selanjutnya dielektroforesis dengan agarose 1% (0,3 g agarosa dan 30 ml TAE 1x dan juga ditambahkan 7,5 µl EtBr) pada voltase konstan 100 volt dan 80 A selama 30 menit lalu divisualisasikan di atas *ultra violettransilluminator* kemudian dilakukan pemotretan dengan *photoforesis*.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi DNA Air

Proses isolasi DNA pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode *boilling cell*. Metode *boilling cell* merupakan metode yang menggunakan suhu panas untuk melisis sel, metode ini tergolong cepat, sederhana, dan merupakan metode yang efektif digunakan untuk isolasi DNA bakteri (Reischl *et al.*, 2000; Queipo-Ortuño *et al.*, 2008). Proses tersebut membutuhkan tiga kali sentrifugasi untuk mendapatkan sel, membuang debris sel setelah proses perebusan dari jumlah total endapan DNA (Araújo *et al.*, 2004; Deak *et al.*, 2000). Untuk mengetahui hasil isolasi DNA selanjutnya dilakukan pengukuran kuantitas DNA yang diperoleh. Pada tahap ini sampel yang digunakan terdiri empat sumur bor dan empat sumur galian. Setelah diisolasi DNA kemudian dielektroforesis untuk mengetahui apakah isolasi berhasil atau tidak. Keberhasilan proses isolasi dilihat berdasarkan ada atau tidaknya pita DNA hasil isolasi utuh atau terdegradasi. Kemurnian DNA dapat pula diketahui melalui elektroforesis agarosa sampel DNA genom, visualisasi agarosa 1% (b/v) memperlihatkan pola pita tunggal yang jelas, tebal dan tidak *smear* (Gambar 1).



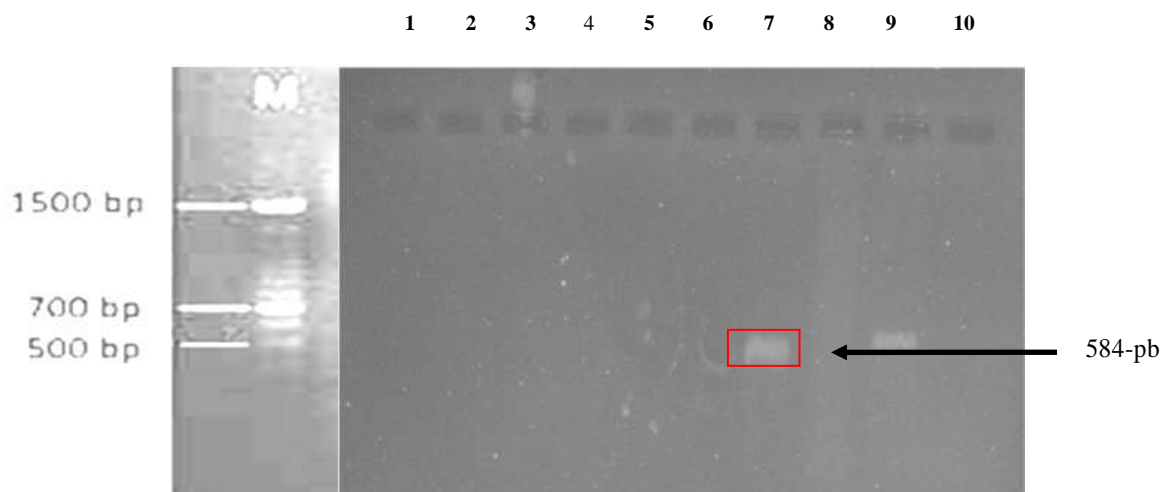
Gambar 1. Hasil Elektroforesis DNA Genom Beberapa Sampel Air

Uji kuantitas DNA dilakukan dengan menggunakan alat *Bio-Drop*. DNA yang mengandung basa-basa purin dan pirimidin dapat menyerap cahaya UV. Untai ganda DNA dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan seperti protein dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm, sehingga kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi pada 260 nm dibagi nilai absorbansi pada 280 nm (A_{260}/A_{280}) (Fatchiyah, *et al.*, 2011). Data kemurnian dan konsentrasi hasil isolat DNA sangat dibutuhkan untuk mengetahui derajat kontaminasi suatu sampel dan untuk mengetahui apakah suatu sampel DNA layak untuk diuji pada tahap selanjutnya (Amanda dan Certaely, 2015)

Penyiapan template DNA sampel yang digunakan untuk diamplifikasi dengan PCR, ekstraksinya dilakukan dengan cara boiling method, karena metode ini cukup efisien dan ekonomis dimana *Escherichia coli* termasuk bakteri Gram negatif yang memiliki dinding sel yang tidak terlalu tebal sehingga mudah dilisiskan dengan pemanasan. 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. Sampel yang menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran sekitar 584 pasang basa menandakan bahwa sampel tersebut positif mengandung *Escherichia coli*.

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 delapan sampel air yang diperiksa, yaitu empat dari sumur bor dan empat dari sumur galian menunjukkan bahwa yang terdeteksi *Escherichia coli* hanya satu sampel yaitu sampel dengan kode ASB 3 (Gambar 2).



Keterangan: Lajur1, ASG1;Lajur2,ASG2;Lajur3,ASG3;Lajur4,ASG4; Lajur5,ASB1;Lajur6,ASB2;Lajur7,ASB3;Lajur8,ASB4;Lajur 9,Kontrol positif E.coli;Lajur10,Kontrol negatif.

Gambar 2. HasilElektroforesisBeberapaSampelAir

Sumber dNTP dan Mg^{2+} dalam reaksi PCR pada penelitian ini menggunakan *Dream taq Green PCR Master Mix (2x)*. Jumlah yang dipakai dalam satu kali reaksi sebanyak 5 μ l dalam 10 μ l volume total. Jumlah tersebut merupakan protokol dari produk *Thermo Scientific. Dream taq Green PCR Master Mix (2x)* adalah solusi yang

siap digunakan dengan mengandung *Dream taq DNA polimerase*, *Dream taq Green buffer*, $MgCl_2$, dan dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP).

Konsentrasi masing-masing *primer* yang digunakan dalam PCR pada penelitian ini yaitu 0,5 μM . Volume yang dipakai dalam satu kali reaksi adalah 0,5 μl dengan konsentrasi *primer* 10 μM yang dicampurkan ke dalam larutan PCR dengan volume total 10 μl sehingga konsentrasi *primer* menjadi 0,5 μM . Komposisi reaksi PCR dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Komponen PCR

No	Komposisi	Jumlah (μl)
1.	DNA cetakan	1
2.	<i>Primerreverse</i>	0.5
3.	<i>Primerforward</i>	0.5
4.	<i>Master Mix (2x)</i>	5
5.	dH ₂ O	3
Volume total		10

Proses amplifikasi dilakukan pada kondisi pre-denaturasi 94°C dilanjutkan 35 siklus denaturasi pada suhu 94°C selama 20 detik, *annealing* 63°C selama 1 menit, dan elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit, kemudian diakhiri dengan post-elongasi pada suhu 72°C selama 10 menit. Uji kualitas DNA dilakukan dengan menguji 8 sampel yang diduga positif terhadap bakteri *Escherichia coli* yang sudah diamplifikasi menggunakan metode PCR. Pengujian dilakukan dengan teknik elektroforesis menggunakan gel agarosa 1% dan buffer TAE 1x. Proses elektroforesis bertujuan untuk untuk pemisahan, identifikasi, dan purifikasi fragmen DNA (Sudjadi, 2008).

Suhu *annealing* yang digunakan pada penelitian ini yaitu 55 °C. Pemilihan suhu *annealing* berdasarkan dari nilai T_m (*melting temperature*) *primer*. T_m adalah suhu pada saat setengah dari molekul DNA mengalami denaturasi. Pemilihan suhu *annealing* diatas nilai T_m menyebabkan *primer* tidak dapat menempel dengan gen target, penempelan *primer* terjadi apabila suhu *annealing* berada pada beberapa °C dibawah nilai T_m . Suhu ekstensi *primer* yang dipakai pada penelitian ini adalah 72 °C. Jumlah siklus PCR juga dapat menentukan spesifisitas produk PCR. Jumlah siklus yang dipakai dalam penelitian ini yaitu 30 siklus. Jumlah tersebut masih dalam kisaran yang optimal. Berdasarkan Fairbanks and Andersen (1999) jumlah siklus yang optimal untuk PCR yaitu 25-45 siklus. Jumlah siklus yang terlalu banyak dapat mengurangi aktivitas *primer*, dNTP, dan *Taq DNA polimerase* sehingga produk PCR tidak spesifik.

Faktor pendukung lain dalam keberhasilan suatu teknik PCR adalah pemilihan waktu denaturasi DNA cetakan, *annealing* dan ekstensi *primer* dalam satu siklus. Pada penelitian ini denaturasi DNA cetakan dilakukan selama 90 detik, waktu *annealing* yang digunakan pada penelitian ini yaitu 30 detik dan waktu ekstensi *primer* yaitu 90 detik, waktu tersebut sesuai untuk sintesis DNA target, pemilihan waktu ekstensi *primer* tergantung pada panjang fragmen DNA yang diamplifikasi. Dalam kondisi tersebut PCR dimulai dengan tahap pendahuluan (*pre-PCR*) dan diakhiri dengan tambahan suhu inkubasi pemanjangan *primer* (*post-PCR*). *Pre-PCR* adalah tahap awal dalam PCR dengan meratakan denaturasi DNA dan penggunaan suhu dalam *pre-PCR* pada penelitian ini adalah 94 °C selama 5 menit dan *post-PCR* dengan suhu 72 °C selama 5 menit. Kondisi PCR dalam penelitian ini diringkas seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Kondisi PCR dalam 35 siklus

No	Tahapan PCR	Suhu (°C)	Waktu
1.	<i>Pre-PCR</i>	94	5 menit
2.	Denaturasi	94	90 detik
3.	<i>Annealing</i>	55	30 detik
4.	Ekstensi <i>primer</i>	72	90 detik
5.	<i>Post-PCR</i>	72	5 menit

Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dalam penelitian ini adalah metode deteksi *Escherichia coli* sebagai penyebab penyakit diare pada sampel air yang tersebar di wilayah kampus IAIN Kendari dengan menggunakan tehnik PCR menghasilkan fragmen DNA berukuran 584 pasang basa dengan kode sampel ASB 3.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini di danai oleh DIPA IAIN Kendari tahun Anggaran 2020, olehnya itu tim peneliti mengucapkan terima kasih yang tak terhingga atas kesempatan yang telah diberikan. Dukungan dari semua pihak Institut Agama Islam (IAIN) Kendari, khususnya ketua LPPM atas segala bantuan dan kepercayaan yang diberikan.

Daftra Pustaka

- Amanda, U. D., & Cartealy, I. C. 2015. Isolasi RNA total dari mesokarp buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera). *Proceeding Semin. Nas. Masy. Biodivers. Indones.* 1: 171–176.
- Araújo, W. L., de Angelis, D. A., & Azevedo, J. L. 2004. Direct RAPD evaluation of bacteria without conventional DNA extraction. *Braz Arch Biol Technol.* 47: 375-380.
- Deak, T., Chen, J., & Beuchat, L. R. 2000. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Appl Environ Microbiol.* 66 (10): 4340- 4344. Fatchiyah., Estri Laras A., Sri Widyarti, & Sri Rahayu. 2011. *Biologi Molekular: Prinsip Dasar Analisis.* Erlangga, Jakarta
- Dinkes Kota Kendari. 2016. Laporan Jumlah Kasus Penderita Diare 2016. Kendari.
- Dinkes Provinsi Sulawesi Tenggara. 2015. Profil Kesehatan Sulawesi Tenggara Tahun 2015. Kendari.
- Erfandi,A., 2015. Efektifitas Biji Kelor (Moringa Oleifera Lamk.) Dalam Menurunkan Jumlah Bakteri Escherichia Coli Dalam Air Sebagai Upaya Pencegahan Penyakit DiareTahun 2015. Skripsi. Universitas Halu Oleo. Kendari.
- Fairbanks, D. J., and W. R. Andersen, 1999. *Genetics: the continuity of life* (pp. 322-326). Brooks/Cole Pub.
- Falamy R., Warganegara E., Apriliana E. 2013. Deteksi Bakteri Coliformpada Jajanan Pasar Cincau Hitam di Pasar Tradisional dan Swalayan Kota Bandar Lampung.Jurnal of Majority, pp.1–9.
- Hannif, SriMulyani dan Kuschitawaty, 2011. Faktor Risiko Diare Akut Pada Balita. Jurnal Berita Kedokteran Masyarakat,Vol27,hal10-17.

- Hartini S. 2009. Faktor -faktor Yang Berhubungan Dengan Kontaminasi Deterjen Pada Air Minum Isi Ulang di Depot Air Minum Isi Ulang di Kabupaten Kendal[skripsi]. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2011. Buku Pedoman Pengendalian Penyakit Diare. Direktorat Jenderal Pengendalian dan Penyehatan Lingkungan. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Mulia, R 2005, Kesehatan Lingkungan, Graha Ilmu, Yogyakarta.
- Notoatmodjo, S 2007, Kesehatan Masyarakat Ilmu dan Seni, Rineka Cipta, Jakarta.
- Queipo-Ortuño, M. L., Colmenero, J. D. D., Macias, M., Bravo, M. J., & Morata, P. 2008. Preparation of Bacterial DNA Template by Boiling and Effect of Immunoglobulin G as an Inhibitor in Real-Time PCR for Serum Samples from Patients with Brucellosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 15(2), 293-296.
- Reischl, U., Linde, H. J., Metz, M., Leppmeier, B., & Lehn, N. 2000. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2429-2433.
- Sudjadi. 2008. *Bioteknologi Kesehatan*. Kanisius, Yogyakarta.
- Tururaja T., dan Moge R. 2010. Bakteri Coliform di Perairan Teluk Doreri, Manokwari Aspek Pencemaran Laut dan Identifikasi Spesies. *Jurnal Ilmu Kelautan.* 15 (1):47-52.
- WHO, 2001, Laporan Komisi WHO Mengenai Kesehatan dan Lingkungan, Gajah Mada University Press, Yogyakarta
- Widianti P., Ristianti N. 2005. Analisis Kualitatif Bakteri Koliform Pada Depot Air Minum Isi Ulang di Kota Singaraja Bali. *Jurnal pendidikan biologi.*
- Widjaja. 2000. Mengatasi Diare dan Keracunan pada Balita. Jakarta : Kawan Pustaka.
- Widoyono. 2010. Hubungan Antara Pengetahuan dan Lingkungan Dengan Kejadian Diare Akut Pada Anak di Kelurahan Pabbundukang Kecamatan Pangkajene Kabupaten Pangkep Kelurahan Andir Kecamatan Baleendah Kabupaten Bandung. Bandung.
- Yuliastri, R. dan Indra, R. 2010. Penggunaan Serbuk Biji Kelor (*Moringa oleifera*) sebagai Koagulan dan Flokulan dalam Perbaikan Kualitas Air Limbah dan Air Tanah. SKRIPSI. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta.