

Identifikasi dan Enumerasi *Escherichia coli* dengan Kombinasi Metode MPN-PCR

Atik Kurniawati¹, Dwi Listyorini², Agung Witjoro²

1) Poltekkes Kemenkes Malang, Malang, Indonesia

2) Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Negeri Malang, Malang, Indonesia

Correspondence to: listyorini.aljabari@um.ac.id

ABSTRACT

Tanggal Submit:
3 Juni 2021

Tanggal Review:
29 November 2021

Tanggal Publish
Online:
21 Juni 2022

Healthy and nutritious food should be free from biological contaminants. The presence of *Escherichia coli* in food is an indicator contamination and also presence of other pathogenic bacteria. This study aims to determine the value of MPN *E. coli* in food samples using the MPN-PCR combination technique. Samples were taken from five traders in Malang City. The results showed that three out of five food samples were contaminated by *E. coli*, indicated by the presence of a specific band amplified and produced a DNA band measuring 584bp band amplified. Conclusion: MPN value of *E. coli* in the three food samples code II 34 MPN / gram, code III 75 MPN / gram and V code 290 MPN / gram. The MPN-PCR combination can be used as an alternative method for the conventional MPN test because it can detect the presence of *E. coli* bacteria in food quickly and reliably.

Keywords: E.coli, MPN-PCR, Food

PENDAHULUAN

Makanan merupakan kebutuhan setiap manusia untuk menjamin kelestarian hidupnya, untuk menjaga agar tetap sehat dan produktif setiap orang harus bisa memilih makanan sehat dan bergizi. Makanan baik secara mutlak bebas dari cemaran baik kimiawi maupun biologi, karena adanya cemaran dalam jumlah tertentu sangat merugikan dan membahayakan kesehatan (BPOM 2009). Sumber pencemaran biologi dalam makanan dapat berasal dari kotoran manusia, air yang tercemar, lalat, hewan peliharaan, peralatan, tangan yang kotor dan debu (Motarjemi et al. 1993). Pencemaran tersebut dapat terjadi pada

saat sebelum maupun saat penyajian makanan (Taulo et al. 2009). Faktor lain yang berpengaruh adalah perilaku penjamah makanan yang tidak mencuci tangan dengan benar (Kusuma, Eryando, and Susanna 2012).

Bakteri *Escherichia coli* telah lama digunakan sebagai indikator kontaminasi tinja dan kemungkinan adanya bakteri patogen dalam makanan seperti *Salmonella*, *Escherichia coli* O157-H7, *Yersinia enterocolitica* dan *Vibrio parahaemolyticus* (Ray and Bhunia 2013). Makanan yang tercemar *E.coli* dapat menyebabkan diare dan kurang gizi pada bayi dibawah usia lima

tahun (Islam et al. 2012) hal ini berkaitan dengan kemampuan patogen mengganggu penyerapan usus, meningkatkan katabolisme dan penyerapan nutrisi yang dibutuhkan untuk sintesis dan pertumbuhan jaringan (Brown 2003). Strain *E.coli* penyebab diare yang berperan dalam penyakit yang ditularkan melalui air atau makanan adalah *enterotoxigenic E.coli (ETEC)*, *enteroinvasive E.coli (EIEC)*, *enteropathogenic E.coli (EPEC)*, dan *entero-haemorrhagic E.coli (EHEC)* (Manual 2010).

Angka Paling Mungkin (APM) atau sering disebut dengan Most Probable Number (MPN) adalah suatu konsep lama yang dikenalkan oleh Mc Crady tahun 1915 yaitu teknik penghitungan langsung kepadatan mikro-organisme dalam cairan (Cochran 1950). Hal ini didasarkan pada penerapan teori kemungkinan pada jumlah respon pertumbuhan positif yang diobservasi pada sejumlah pengenceran standar ketika sampel inokulum ditempatkan kedalam sejumlah set tabung media kultur. Jumlah tabung positif di setiap pengenceran dapat menunjukkan perkiraan asli, yaitu konsentrasi murni dari bakteri dalam sampel (Blodgett 2006). Prosedur MPN secara umum untuk enumerasi total coliform, coliform fekal dan *E.coli* melalui beberapa tahapan yaitu presumptive test,

confirmed test dan completed test secara keseluruhan prosedur konvensional MPN membutuhkan waktu lebih dari 24 jam.

Teknik terbaru yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti menggunakan kombinasi MPN-PCR, dimana angka bakteri *E.coli* dihitung dengan adanya gen *E.coli* yang teramplifikasi. Prosedur ini relatif lebih singkat karena hanya menggunakan waktu kultur bakteri delapan jam (Picozzi and Foschino 2016) dibandingkan metode konvensional yang membutuhkan waktu kultur lebih lama (Miwa et al. 2003). Selain itu kombinasi MPN-PCR dapat menargetkan gen spesifik *E.coli* melalui penambahan primer 16E1, 16E2 dan 16E3 yang mampu mendeteksi sel *E.coli* baik patogen maupun non patogen dan dapat mendeteksi kurang dari 1-2 cfu *E.coli*/ml sampel (Gautman, S. K., Suresh Kumar, S., Batish, V. K., Grover, S., & Mohanty 2011) (Tsen, Lin, and Chi 1998)

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi dan mengetahui nilai MPN *E.coli* dalam sampel makanan dengan menggunakan kombinasi teknik MPN-PCR

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif observasional, bertujuan untuk mengetahui nilai MPN *E.coli* dengan

menggunakan teknik kombinasi MPN-PCR.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sampel bubur bayi yang siap makan (MP-ASI siap santap) sebanyak 5 sampel makanan yang diperoleh dari pedagang yang berbeda di Kota Malang. Kontrol positif *E.coli* ATCC 25922, kontrol negatif *Salmonella thypi*, Amplifikasi gen marker dilakukan dengan teknik routine PCR menggunakan satu forward dan dua primer reverse mengikuti Tsen *et al.*, (1998) sebagai berikut: primer forward 16E1 5'GGGAGTAAAGTTAATACCTTTG CTC3', primer reverse 16E2 5'TTCCCGAAGGCACATTCT3'; dan primer reverse 16E3 5'TTCCCGAAGGCACCAATCA3' (Tsen, Lin, and Chi 1998)

Prosedur penelitian ini lebih detail dideskripsikan dibawah ini:

Pengambilan Sampel

Sampel MP-ASI siap santap dibeli dari pedagang makanan pada lokasi yang telah ditetapkan kemudian segera membawa ke laboratorium dengan menempatkannya di dalam termos es.

Preparasi Medium dan Larutan Pengencer

Pembuatan medium Lauryl sulphate broth: sebanyak 17,8g serbuk media ditimbang dan dilarutkan dengan 500ml aquadest kemudian dipanaskan

diatas kompor dan diaduk hingga homogen. Setelah homogen larutan dipipet kedalam tabung reaksi yang berisi tabung Durham terbalik dengan volume masing-masing 9ml. selanjutnya tabung reaksi ditutup dengan kapas berlemak. Media disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit suhu 121°C dan tekanan 15 lbs.

Larutan pengencer dibuat dengan cara sebanyak 3,4g serbuk KH_2PO_4 ditimbang dan dimasukkan kedalam becker glass, kemudian dilarutkan dengan 50 ml aquadest. Dari campuran ini dipipet 10ml dan dilarutkan dengan 1 liter aquadest. Selanjutnya larutan disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit suhu 121°C dan tekanan 15 lbs.

Pengenceran dan Inokulasi Sampel

Pengenceran dan Inokulasi sampel (Standar Nasional Indonesia 01-2332.1-2006 2006): sebanyak 25 gram sampel ditimbang kemudian dimasukkan ke erlenmeyer yang berisi 225 ml pengencer (10^{-1}) kemudian dikocok selama 25 detik. Sebanyak 1 ml dari pengenceran 10^{-1} dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan pengencer (10^{-2}), kemudian sebanyak 1 ml dari pengenceran 10^{-2} dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan pengencer (10^{-3}). Selanjutnya dari masing-masing pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) sebanyak 1 ml dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi medium LSB

dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama delapan jam.

Isolasi DNA total

Isolasi DNA: sebanyak 1 ml larutan diambil dari sembilan tabung Lauryl Sulphate Broth (LSB) yang telah diinkubasi 8 jam. Masing-masing aliquot dicentrifugasi dengan kecepatan 3.500 x g selama 5 menit, pelet yang diperoleh dicampur lagi dengan 1 ml aquadest steril kemudian dipanaskan 100°C selama 10 menit. Suspensi dicentrifugasi dengan kecepatan 3.500 x g selama 10 menit. Sebanyak 25 µl supernatan dilarutkan dengan 100 µl aquadest steril.

Amplifikasi gen marker

Amplifikasi gen spesifik *E.coli*: sebanyak 1 µl DNA total ditambahkan dengan masing-masing 1 µl dari primer forward dan reverse, 10 µl Taq polimerase dan 6 µl SDW. Selanjutnya proses amplifikasi pada mesin thermal cycler mengikuti protokol sebagai berikut: inisial denaturasi suhu 97°C selama 2 menit, denaturasi suhu 94°C selama 20 detik, annealing suhu 54°C selama 20 detik, extension suhu 72°C selama 30 detik, siklus ini diulangi sampai 35 kali.

Evaluasi hasil PCR dilakukan dengan cara hasil amplifikasi DNA, kontrol positif, kontrol negatif dan DNA penanda dimasukkan dalam sumuran gel agarose 1%. Setelah itu gel diamati pita-pita DNA nya menggunakan UV

transilluminator. Foto gel dilakukan dengan kamera digital dalam suatu cangkup yang dihubungkan ke komputer.

Enumerasi dan Analisis data

Band DNA dari fragmen yang teramplifikasi dibandingkan dengan kontrol positif dan DNA *marker*. Sampel menunjukkan positif *E.coli* jika terdapat pita nyata pada ukuran 584 pasang basa pada tiap sumuran dan dihitung sebagai nilai 1, hasil ini kemudian dirujuk ke tabel MPN 333 sehingga diperoleh angka *E.coli/g* (Miwa et al. 2003).

Data yang diperoleh berupa nilai MPN *E.coli* yang dianalisis dengan kombinasi band positif di agarose sebagai analog tabung MPN dan dirujuk ke tabel MPN 333.

HASIL PENELITIAN

Hasil uji menunjukkan adanya bakteri pada tiga sampel (Gambar 1). Pada sampel I dan IV tidak didapatkan adanya band spesifik *E.coli* pada semua pengenceran (IA-IC dan IVA-IVC), sedangkan pada sampel II didapatkan adanya dua band spesifik *E.coli* pada pengenceran 10⁻¹, satu band spesifik pada pengenceran 10⁻², dan tiga band spesifik pada pengenceran 10⁻³, sampel III didapatkan tiga band pada pengenceran 10⁻¹, satu band spesifik pada pengenceran 10⁻², dan satu band spesifik pada pengenceran 10⁻³, pada sampel V didapatkan tiga band spesifik pada

pengenceran 10^{-1} , dua band spesifik pada pengenceran 10^{-2} dan tiga band spesifik pada pengenceran 10^{-3} . Angka MPN dalam sampel makanan ditunjukkan pada Tabel 1. Sehingga didapatkan hasil nilai MPN/gram pada sampel dengan kode I dan IV adalah 0, sedangkan kode sampel II memiliki nilai 34 MPN/gram, kode sampel III memiliki nilai 75 MPN/gram dan kode sampel V memiliki nilai 290 MPN/gram



Tabel 1. Jumlah band spesifik *E.coli* dan Nilai MPN

Kode Sampel	Jumlah band pada pengenceran ke-			Nilai MPN/gram
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
I	-	-	-	0
II	2	1	3	34
III	3	1	1	75
IV	-	-	-	0
V	3	2	3	290

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini ditemukan adanya bakteri *E.coli* didalam sampel II, III dan V yang didasarkan hasil adanya band spesifik *E.coli* yang teramplifikasi pada fragmen yang mengkode domain V3 dan V6 gen 16s rRNA dari bakteri

E.coli (Tsen, Lin, and Chi 1998). Sampel yang tidak menunjukkan band spesifik kemungkinan tidak mengandung bakteri *E.coli* atau tidak teramplifikasi akan tetapi hal itu tidak menjadi ukuran karena kontrol positif yaitu *E.coli* ATCC 25922 menunjukkan band spesifik pada 584 pasang basa dan pada kontrol negatif bakteri *Salmonella typhi* tidak menunjukkan ada band spesifik artinya primer yang digunakan sudah sesuai dengan daerah sekuens V3 dan V6 gen penyandi 16s rRNA yang spesifik pada *E.coli*.

Reaksi polimerase berantai atau dikenal sebagai *polymerase chain reaction* (PCR), merupakan suatu proses sintesis enzimatis untuk mengamplifikasi nukleotida secara invitro. Metode PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA sebanyak ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar 10^6 - 10^7 kali (Fatchiyah, EL Arumingtyas, S Widyarti 2011) sehingga bila dalam sampel terdapat sedikit sel saja yang dapat memenuhi limit PCR maka akan dapat terdandan dan dapat terbaca di gel agarose. Menurut Copin *et. al* (2012), meskipun PCR bisa mendeteksi sel mati dan sel hidup yang tidak dapat dikultur akan tetapi justru dapat menjadi pertimbangan bahwa bila terdapat gen yang teramplifikasi maka dapat menunjukkan bahwa makanan tersebut

sebelumnya sudah terkontaminasi bakteri dan mungkin saja menimbulkan bahaya kesehatan terhadap manusia (Copin, S., Robert-Pillot, A., Malle, P., Quilici, M. L., & Gay 2012)

Kombinasi MPN-PCR yang digunakan untuk menghitung dan mengidentifikasi bakteri *E.coli* di penelitian ini membutuhkan waktu 24 jam sampai diperoleh hasilnya. Metode ini dapat menjadi metode alternatif dalam pengujian makanan selain uji MPN konvensional yang biasanya menggunakan masa kultur dan identifikasi berjenjang sesuai karakteristik biokimia bakteri. Selain itu pada prosedur konvensional pertumbuhan bakteri golongan Enterobacteriaceae lain pada media selektif dan differensial dapat mengganggu pemeriksaan (Radji, Puspaningrum, and Sumiati 2010)

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai MPN pada sampel makanan terdapat 2 sampel dengan nilai 0 MPN/gram dan terdapat sampel dengan kode II memiliki nilai 34 MPN/gram, kode sampel III memiliki nilai 75 MPN/gram dan kode sampel V memiliki nilai 290 MPN/gram. Hal ini perlu menjadi perhatian karena bagi seseorang yang belum memiliki kekebalan lengkap sangat rentan terinfeksi bakteri *E.coli*.

DAFTAR PUSTAKA

- Blodgett, R. 2006. "BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions." *FDA Bacteriological Analytical Manual*.
- B POM. 2009. "Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia Nomor HK.00.06.1.52.4011 Tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba Dan Kimia Dalam Makanan." *Jdih Bpom Ri*: 1–28.
- Brown, Kenneth H. 2003. "Diarrhea and Malnutrition." *The Journal of Nutrition*.
- Cochran, William G. 1950. "Estimation of Bacterial Densities by Means of the 'Most Probable Number.'" *Biometrics*.
- Copin, S., Robert-Pillot, A., Malle, P., Quilici, M. L., & Gay, M. 2012. "Evaluation of Most-Probable-Number-PCR Method with Internal Amplification Control for the Counting of Total and Pathogenic *Vibrio Parahaemolyticus* in Frozen Shrimps." *Journal of food protection* 75(1): 150–53.
- Fatchiyah, EL Arumingtyas, S Widyarti, S Rahayu. 2011. *Biologi Molekuler: Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.
- Gautman, S. K., Suresh Kumar, S., Batish, V. K., Grover, S., & Mohanty, A. K. 2011. "Rapid and Sensitive Detection of *Escherichia Coli* in Milk by 16S rRNA Gene Targeted PCR." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 1(1): 107–10.

- Islam, M. A. et al. 2012. "Microbiological Quality of Complementary Foods and Its Association with Diarrhoeal Morbidity and Nutritional Status of Bangladeshi Children." *European Journal of Clinical Nutrition*.
- Kusuma, Aria, Tris Eryando, and Dewi Susanna. 2012. "Escherichia Coli Contamination of Babies' Food-Serving Utensils in a District of West Sumatra, Indonesia." *WHO South-East Asia Journal of Public Health*.
- Manual, Bacteriological Analytical. 2010. "Food BAM: Enumeration of Escherichia Coli and the Coliform Bacteria." *Development*.
- Miwa, Norinaga et al. 2003. "Evaluation of MPN Method Combined with PCR Procedure for Detection and Enumeration of Vibrio Parahaemolyticus in Seafood." *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*.
- Motarjemi, Y., F. Kaferstein, G. Moy, and F. Quevedo. 1993. "Contaminated Weaning Food: A Major Risk Factor for Diarrhoea and Associated Malnutrition." *Bulletin of the World Health Organization*.
- Picozzi, Claudia, and Roberto Foschino. 2016. "Exploiting a MPN-PCR Technique to Quantify Escherichia Coli in Minced Meat." (January 2004).
- Radji, Maksum, Anglia Puspaningrum, and Atiek Sumiati. 2010. "Deteksi Cepat Bakteri Escherichia Coli Dalam Sampel Air Dengan Metode Polymerase Chain Reaction Menggunakan Primer 16E1 Dan 16E2." *Jurnal Makara Sains* 14(1): 39–43.
- Ray, Bibek, and Arun Bhunia. 2013. *Fundamental Food Microbiology*.
- Standar Nasional Indonesia 01-2332.1-2006. 2006. "Cara Uji Mikrobiologi-Bagian 1: Penentuan Coliform Dan Escherichia Coli Pada Produk Perikanan."
- Taulo, S. et al. 2009. "Quantification and Variability of Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus Cross-Contamination during Serving and Consumption of Cooked Thick Porridge in Lungwena Rural Households, Malawi." *Food Control*.
- Tsen, H. Y., C. K. Lin, and W. R. Chi. 1998. "Development and Use of 16S rRNA Gene Targeted PCR Primers for the Identification of Escherichia Coli Cells in Water." *Journal of Applied Microbiology* 85(3): 554–60.