

Deteksi Bakteri *Escherichia coli* dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Sampel Makanan Takjil

Frisca Rinaldi Putri¹⁾, Novia Annisa¹⁾, Quratul Akyuni¹⁾, Afifatul Achyar¹⁾
¹⁾Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang
Jl. Prof. Dr. Hamka Air Tawar Barat, Padang Utara, Padang, Sumatera Barat 25171
Email: friscarinaldiputri03@gmail.com

ABSTRAK

Makanan merupakan kebutuhan pokok manusia yang mengandung nutrisi serta diperlukan oleh tubuh, untuk pertumbuhan, memelihara jaringan tubuh, dan menghasilkan energi untuk aktivitas. Makanan yang baik harus bermutu dan aman dikonsumsi. Tingkat kontaminasi makanan masih cukup tinggi (oleh *Escherichia coli* 65,5%) dan prevalensi penyakit diare sebanyak 31,4% kasus tahun 2007. Salah satu parameter kualitas makanan layak konsumsi adalah tidak terkontaminasi *E. coli*. Saat ini, *Polymerase Chain Reactions* (PCR) dapat menjadi metode alternatif karena memiliki akurasi yang tinggi. Primer merupakan salah satu komponen penting dalam PCR sehingga harus dirancang secara khusus untuk menjamin keberhasilan amplifikasi DNA. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi *E. coli* dalam makanan takjil yang dijual oleh pedagang kaki lima (PKL). Sepuluh PKL di sepanjang Jalan Cendrawasih, Air Tawar Barat, Padang, Sumatera Barat, dipilih secara acak sebagai sampel. *E. coli* pada sampel berbagai jenis makanan dideteksi dengan metode PCR. Hasil dari penelitian ini menunjukkan dari 10 sampel tidak terdapat pita DNA target berukuran 417 bp kecuali pada kontrol positif PCR sehingga semua sampel disimpulkan tidak mengandung bakteri *E. coli*.

Keywords: Makanan, *Escherichia coli*, PCR

PENDAHULUAN

Makanan merupakan kebutuhan pokok bagi manusia, dalam penyajiannya pengolahannya perlu diperhatikan berbagai aspek seperti nutrisi dan kebersihan dalam pembuatannya. Keamanan dari bahan yang digunakan merupakan karakteristik yang sangat penting baik bagi produsen maupun konsumen. Salah satu mata pencarian masyarakat Indonesia adalah sebagai pedagang makanan.

Seseorang dapat menyiapkan dan mengolah sendiri bahan makanan untuk memenuhi kebutuhan makanannya. Namun, untuk situasi dan kondisi tertentu kebutuhan makanan didapat dengan membeli makanan matang untuk langsung dikonsumsi. Terdapat beberapa tempat yang menjual dan menyediakan makanan matang, mulai dari restoran, rumah makan, bahkan pedagang kaki lima. Berbeda dengan pengusaha restoran atau rumah makan yang menjual makanan di bangunan permanen, Pedagang Kaki Lima (PKL) umumnya berjualan di mana saja di keramaian, seperti di pinggir jalan, pasar,

termasuk di sekolah. Makanan dan minuman yang diolah oleh penjamah makanan di lokasi berjualan atau disajikan sebagai makanan siap santap untuk dijual bagi umum selain yang disajikan jasa boga, rumah makan/restoran, dan hotel disebut sebagai makanan jajanan. Umumnya PKL berjualan makanan jajanan menggunakan gerobak, mobil, atau kalau pun menetap hanya menggunakan fasilitas seadanya. Termasuk fasilitas sanitasi seperti penyediaan air bersih, pengolahan sampah padat dan limbah cair yang tidak memenuhi syarat kesehatan. Kondisi tersebut dapat menimbulkan adanya kontaminasi pada makanan atau minuman yang dijual.

Dalam prakteknya sendiri jumlah pedagang makanan akan mengalami peningkatan ketika bulan Ramadhan, masyarakat banyak menggunakan momentum ini untuk berjualan takjil. Takjil merupakan makanan ringan ataupun makanan manis yang dikonsumsi masyarakat ketika memasuki waktu berbuka puasa. Takjil umumnya digambarkan dengan makanan kecil kecilan dengan cita rasa manis baik kue kering ataupun kue basah, tak hanya kue takjil juga dapat berupa minuman dan juga makanan manis bersantan seperti aneka kolak. Bahan-bahan dan metode yang digunakan dalam pembuatan makanan jika terpapar organisme yang berbahaya dapat menimbulkan keracunan atau penyakit menular dan dampak buruknya adalah dapat menyebabkan kematian.

Penyakit yang ditularkan melalui makanan dapat menyebabkan penyakit yang ringan dan berat bahkan berakibat kematian di antaranya diakibatkan oleh belum baiknya penerapan higienitase makanan. Kejadian penyakit yang ditularkan melalui makanan di Indonesia cukup besar ini terlihat dari masih tingginya penyakit infeksi seperti tifus, kolera, disentri, dan sebagainya. Dari 90% kasus keracunan pangan disebabkan oleh kontaminasi mikroba (Hartono, 2006).

Penyebab dari beberapa kasus keracunan makanan di Indonesia di antaranya disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* dan *Salmonella* sp. Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri yang berasal dari kotoran hewan maupun manusia.

Bahaya mikroba pada pangan perlu mendapat perhatian, karena jenis bahaya ini sering menjadi agen penyebab kasus keracunan pangan. *E. coli* merupakan bakteri patogen yang sering menyebabkan keracunan pangan dan juga menjadi salah satu mikroba indikator sanitasi. Keberadaan *E. coli* pada pangan dapat menunjukkan bahwa praktek sanitasi lingkungan yang buruk. *E. coli* umumnya berhabitat pada saluran pencernaan manusia dan hewan (Tannock, 1995; Sorum and Sunde, 2001; Biswas, 2010), dapat dengan mudah disebarluaskan di luar habitat asalnya melalui perantara air dan pangan (Perreten, 2005). Pada kondisi tertentu, *E. coli* dapat menyebabkan infeksi,

terutama pada pasien dengan gangguan sistem imun atau pada kondisi dimana barrier pada gastrointestinal terganggu, bahkan *E. coli* non pathogen sekalipun dapat menyebabkan infeksi (Huang et al., 2006). Sekitar 98% mikroba yang terdapat pada pangan merupakan mikroba non pathogen (Kumar et al., 2002). Sehingga perlu dikembangkan tes diagnostik yang sesuai untuk mendeteksi *E. coli* pathogen.

E. coli adalah salah satu jenis spesies utama bakteri Gram negatif. Pada umumnya bakteri ini diketahui terdapat secara normal dalam alat pencernaan manusia dan hewan. Keberadaannya di luar tubuh manusia menjadi indikator sanitasi makanan dan minuman apakah pernah tercemar oleh kotoran manusia atau tidak. Keberadaan *E. coli* dalam air atau makanan juga dianggap memiliki korelasi tinggi dengan ditemukannya bibit penyakit (patogen) pada pangan (Rahayu, 2003). Di dunia, sebagian besar kasus diare yang dihantarkan melalui makanan disebabkan oleh kontaminasi bakteri.

E. coli merupakan bakteri penyebab diare terkait makanan yang paling umum. Bakteri ini diketahui memiliki beberapa patotipe yaitu Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Enteroaggregative *E. coli* (EAEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), dan Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) yang juga dikenal sebagai Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). Diantara kelima patotipe tersebut, ETEC adalah patotipe yang paling banyak ditemukan, diikuti oleh EPEC dan STEC/EHEC (Budiyanti, 2020). Dalam persyaratan mikrobiologi *E. coli* dipilih sebagai indikator tercemarnya air atau makanan karena keberadaan bakteri *E. coli* dalam sumber air atau makanan merupakan indikasi terjadinya kontaminasi tinja manusia. Adanya *E. coli* menunjukkan suatu tanda praktek sanitasi yang tidak baik karena *E. coli* bisa berpindah dengan kegiatan tangan ke mulut atau dengan pemindahan pasif lewat makanan, air, susu dan produk-produk lainnya. *E. coli* yang terdapat pada makanan atau minuman yang masuk kedalam tubuh manusia dapat menyebabkan gejala seperti kolera, disentri, gastroenteritis, diare dan berbagai penyakit saluran pencernaan lainnya (Nurwanto, 2007).

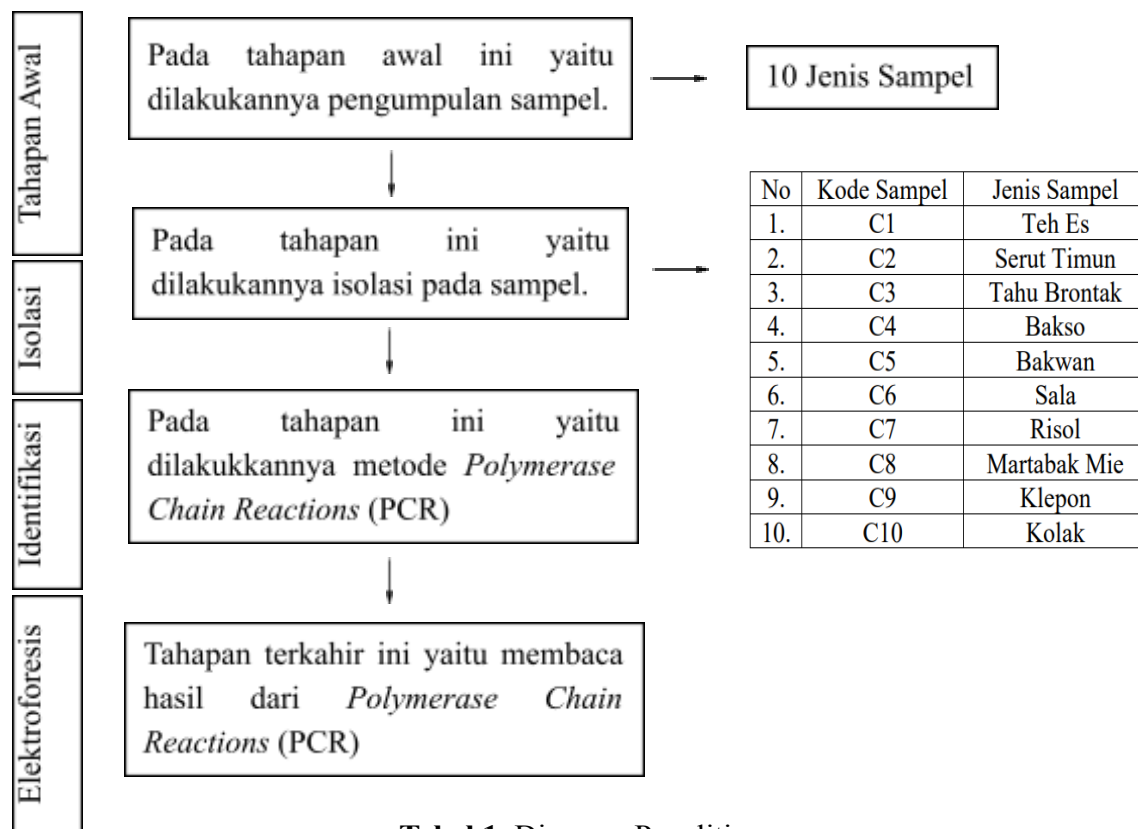
Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah pilihan teknik yang digunakan untuk identifikasi bakteri tertentu. Metodologi berbasis PCR merupakan teknik yang berhasil dalam pengidentifikasian bakteri *E. coli* pada makanan. (Farouk et al., 2006; Wolf et al., 1999; Stratil et al., 1997 dan Wintero et al., 1990).

Dari latar belakang diatas maka peneliti tertarik untuk mengangkat judul “Deteksi Bakteri *Escherichia coli* dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Sampel Makanan Takjil”. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi

keberadaan bakteri *E. coli* pada makanan takjil yang dijual dipinggir jalan di Kelurahan Air Tawar, Kecamatan Padang Utara, Kota Padang.

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolasi menggunakan Chelex-TE dengan subjek penelitian bakteri *E. coli*. Jumlah sampel yang diuji sebanyak 10 sampel dengan sampel berupa teh es, serut timun, tahu brontak, bakso, bakwan, sala, risol, martabak mie, klepon, dan kolak. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2022 di Laboratorium Biologi FMIPA UNP.



Tabel 1. Diagram Penelitian

Isolasi DNA dengan Chelex-TE

Larutan Chelex-TE 10% dibuat dengan menimbang 0,1 gram Chelex kemudian ditambahkan dengan 1 mL TE pH 8.0. Sebanyak 100 µl larutan Chelex-TE 10% dipipet dengan tip berlubang lebar (*wide bore pipette tips*) ke dalam microtube 1,5 ml steril. Kemudian 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) ditambahkan ke dalam microtube, lalu di-spin down. Setelah itu sampel dimasukkan hingga terendam di dalam larutan chelex-TE-proteinase K. Sampel diinkubasi pada suhu 56°C untuk melisiskan sel

selama semalaman. Inkubasi pada suhu 99°C selama 10 menit untuk meng-inaktivasi enzim proteinase K. Sebanyak 1 ul supernatan digunakan untuk PCR. Sisanya disimpan freezer dengan suhu -20°C.

PCR Deteksi *Escherichia coli*.

Dalam melakukan PCR, hal pertama yang dilakukan adalah menentukan jenis primer dan sekuen yang akan digunakan, jenis primer yang digunakan adalah E. coli-AA-Fwd dan E.coli-AA-Rev sedangkan sekuen genom adalah *Escherichia coli* (NC_000913.3) (Annisa, 2021).

Setelah menentukan primer dan sekuen kemudian memasukkan komponen reaksi PCR ke dalam PCR tube sesuai tabel berikut:

Tabel 2. Komponen reaksi PCR

Komponen Reaksi	[Awal]	[Akhir]	Volume per tube (µl)	**Jumlah Reaksi	Volume Mix PCR (µl)
PCR Master Mix	2x	1x	5 µl	x13	65
Primer -forward	10µM	0,4µM	0,4	x13	5,2
Primer -reverse	10µM	0,4µM	0,4	x13	5,2
Nuclease-free water	Mencukupkan volume sampai 10µl		3,2	x13	41,6
*Sampel DNA			1	<ul style="list-style-type: none"> ● Vortex dan spin down mix PCR ● Bagi mix PCR @9 µl ke dalam 10 tube PCR yang telah diberi label ● Tambahkan @DNA sampel ● Vortex dan spin down 	
Volume Total			10 µl		

* Sampel DNA yang digunakan terdiri dari 10 sampel dan 2 kontrol (+ dan -)

** Jumlah reaksi: $10+2= 12 + (10\% \times 12) = 12 + 1,2 = 13,2 \sim 13$

Tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR, lalu pada mesin PCR diatur kondisi suhu dan siklus PCR (program PCR) *Touchdown* PCR patogen sesuai dengan tabel berikut:

Tabel 3. Program PCR

Tahap PCR	Suhu (°C)	Durasi	Siklus
Denaturasi awal	95	1 menit	1 x
Denaturasi	95	15 detik	5 x
Annealing	70	15 detik	
Elongasi	72	10 detik	
Denaturasi	95	15 detik	10 x
Annealing	69-61	15 detik	
Elongasi	72	10 detik	
Denaturasi	95	15 detik	20 x
Annealing	60	15 detik	
Elongasi akhir	72	10 detik	

* Suhu diturunkan 1° setiap siklus

Elektroforesis gel agarose produk PCR

Hasil amplifikasi DNA (amplikon) dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa. Konsentrasi agarosa sebesar 1,5 %. Amplikon dimasukan ke dalam sumuran sebanyak 5 µl yang ditambahkan 1 µl loading dye dan 5 µl GelRed 1:1.000. Sebagai penanda ukuran DNA (marker) digunakan ladder 100 bp. Elektroforesis dijalankan dengan kondisi tegangan 100 V selama 20 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan GelDoc UVITEC kemudian didokumentasikan.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Teknik PCR adalah salah satu teknik molekuler yang digunakan untuk mengidentifikasi penyakit infeksi yang disebabkan oleh *E. coli*. Metode ini memiliki banyak kelebihan yaitu dapat menghasilkan amplifikasi produk yang akurat, cepat, spesifik, membutuhkan jumlah sampel yang sedikit (Bakri, 2015).

Dalam penelitian ini kami menggunakan 10 sampel jenis. Deteksi Bakteri *Escherchia coli* pada jajanan takjil dapat diketahui dengan cara isolasi menggunakan Chelex-TE, kemudian diamplifikasi menggunakan primer *E. coli*-AA-F dan *E. coli*-AA-R. Pada isolasi DNA kami menggunakan 10 dengan keterangan M = Marker , A = Kontrol (-), C1 = Teh Es, C2 = Serut Timun, C3 = Tahu Brontak, C4 = Bakso, C5 = Bakwan, C6 = Sala, C7 = Risol, C8 = Martabak Mie, C9 = Klepon, C10 = Kolak dan B = Kontrol (+)



Gambar 1. Hasil elektroforesis menggunakan metode PCR dengan primer *E. coli* AA-F- dan *E.coli* AA-R

Dari hasil elektroforesis diatas menunjukkan bahwa dari 10 sampel makanan yang di uji tidak terdeteksi adanya cemaran *E. coli* sesuai dengan gen target yaitu 417 bp. Namun dalam penelitian ini, tidak diteliti lebih mendalam mengenai teknis pembuatan dan penyajiannya sampel makanan yang diuji. Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar makanan yang dijual oleh pedagang kaki lima di Jalan Cendrawasih, Kecamatan Padang Utara, Padang bebas dari cemaran kontaminasi bakteri *E. coli*.

Standar kandungan *E. coli* sesuai dengan Kepmenkes No.1096/Menkes/Per/VI/2011 sebanyak 0 per gram sampel makanan. *E. coli* merupakan salah satu jenis spesies bakteri yang normal hidup pada saluran pencernaan khususnya pada usus besar manusia (Sutiknowati, 2016). Bakteri ini tergolong ke dalam famili dari Enterobacteriaceae, berbentuk batang, dan tergolong bakteri gram negatif yang merupakan patogen utama pada manusia (Jang et al, 2017 ; Kaper, 2004). *E. coli* merupakan salah satu bakteri yang paling umum menyebabkan infeksi pada manusia dan hewan (Allocati et al, 2013). Adanya *E. coli* pada sampel makanan menunjukkan bahwa makanan tersebut tidak layak untuk dikonsumsi. Bakteri *E. coli* merupakan bakteri indikator higienitas makanan dan minuman yang menandakan apakah makanan layak untuk dikonsumsi atau tidak apabila berada di luar tubuh manusia (Kurniadi, dkk., 2013). Bakteri ini banyak terdapat di

dalam daging yang belum masak (Sutiknowati, 2016).. Struktur populasi dari keberadaan *E.coli* sangat dipengaruhi oleh kondisi usus dari inangnya.

PENUTUP

Hasil dari penelitian ini menunjukkan dari 10 sampel tidak terdapat pita DNA amplicon berukuran 417 bp sehingga disimpulkan semua sampel tidak mengandung bakteri *E. coli*. Hal ini menunjukkan bahwa makanan takjil di sekitar Jalan Cendrawasih, Air Tawar, Kecamatan Padang Utara aman untuk dikonsumsi.

REFERENSI

- Achyar, A., Putri, A. I., Putri, D. H., & Ahda, Y. (2021). Primer design, in silico PCR and optimum annealing temperature for *Escherichia coli* detection in refillable drinking water samples. *Tropical Genetics*, 1(2), 52-60.
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M.F., Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Vol. 10 : 6235- 6254.
- Bakri, Z., Hatta, M., & Massi, M. N. (2015). Deteksi keberadaan bakteri *Escherichia coli* O157: H7 pada feses penderita diare dengan metode kultur dan PCR. *JST kesehatan*, 5(2), 184-192.
- Jang, J., H.-G. Hur, M.J. Sadowsky, M.N. Byappanahalli, T. Yan and S. Ishii. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications a review. *Journal of Applied Microbiology*. 123 : 570- 581
- Hartono. 2006. *Penyakit Bawaan Makanan, Fokus Pendidikan Kesehatan*. Jakarta. EGC.
- Huang, D.B., Mohanty, Dupont, H.L., Okhuysen, P.C. and Chiang T. 2006. A Review of An Emerging Enteric Pathogen Enterohaggative *Escherichia coli*. *J. Med-Microbiol*. 55 : 1303-1311.
- Kurniadi, Y.,Saam, Z., Afandi, D., (2013). Faktor Kontaminasi Bakteri *E. Coli* Pada Makanan Jajanan Di lingkungan Kantin Sekolah Dasar Wilayah Kecamatan Bangkinang. *Jurnal Ilmu Lingkungan*. Vol.7 (1) : 28-37.
- Kumar, S.H., Iddya, K., Karunasajar, I. 2002. Molecular. Methods for Rapid and specific detection of pathogens in seafood
- Nurwanto. 2007. Tata Laksana Higiene Hidangan, Keracunan Hidangan dan Jenis Bakteria, <http://www.ihsmakassar.com>. (access 13 Juni 2022)

- Perreten, V. 2005. Resistance in the Food Chain in Bacteria From Animals: Relevance to Human Infections, In White D.G., Aleksun M.N., McDemont PF (eds). *Frontiers in Antimicrobial Resistance*. ASM Press. Washington DC. 446-464 pp.
- Rahmayani, R. D., & Simatupang, M. M. (2019). Analisis Pengaruh Higiene Penjamah Dan Sanitasi Makanan Terhadap Kontaminasi E. Coli Pada Jajanan Sekolah. *Jurnal Untuk Masyarakat Sehat (JUKMAS)*, 3(2), 164-178.
- RS, I. G. A. I. P., & Budayanti, N. N. S. (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Identifikasi Gen *bfpA*, *stx1*, dan *stx2* dari Bakteri *Escherichia coli* Yang Terisolasi dari Spesimen Usap Dubur Penjamah Makanan Di Kota Denpasar Tahun 2015. *E-jurnal Medika Udayana*, 9(9), 30-36.
- Susanna. 2003. *Pemantauan Kualitas Makanan Ketoprak dan Gado-Gado di Lingkungan Kampus UI Depok Melalui Pemeriksaan Bakteriologis*. Tesis FKM UI. Depok.
- Sutiknowati, L., I. (2016). Bioindikator Pencemar, Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Oseana*. Volume XLI (4) : 63 – 71.
- Tannock, G.W. 1995. Normal Microflora An Introduction to Microbes Inhabiting Specific detection of Pathogens in Seafood. *Aquacult Asia* 3. 34-37.