

**DETEKSI CEMARAN BAKTERI PATOGEN *Escherichia coli* O157:H7
PADA SUSU SAPI PERAH SECARA KONVENSIONAL DAN
MOLEKULER**

SKRIPSI

Oleh :
FAIZATUL IZZA
12620089



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2017**

**DETEKSI CEMARAN BAKTERI PATOGEN *Escherichia coli* O157:H7
PADA SUSU SAPI PERAH SECARA KONVENSIONAL DAN
MOLEKULER**

SKRIPSI

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri
Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Biologi**

**Oleh :
FAIZATUL IZZA
NIM. 12620089/S-1**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2017**

**DETEKSI CEMARAN BAKTERI PATOGEN *Escherichia coli* O157:H7
PADA SUSU SAPI PERAH SECARA KONVENSIONAL DAN
MOLEKULER**

SKRIPSI

Oleh:
FAIZATUL IZZA
NIM. 12620089

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji :
Tanggal : 03 Januari 2017

Pembimbing I



Kholifah Holil, M. Si
NIP. 19751106 200912 2 002

Pembimbing II



Umaiyatus Sarifah, M. A
NIP. 19820925 200901 2 005

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi


Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP. 19741018 200312 2 002

DETEKSI CEMARAN BAKTERI PATOGEN *Escherichia coli* O157:H7
PADA SUSU SAPI PERAH SECARA KONVENSIONAL DAN
MOLEKULER

SKRIPSI

Oleh:
FAIZATUL IZZA
NIM. 12620089

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal 06 Januari 2017

Penguji Utama	Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M. Si	
	NIP. 19710919 200003 2 001	
Ketua Penguji	Priya Dewi F., M. Sc	
	NIP. 19900428 2016 0801 2062	
Sekretaris Penguji	Kholifah Holil, M. Si	
	NIP. 19751106 200912 2 002	
Anggota Penguji	Umaiatus Syarifah, M. A	
	NIP. 19820925 200901 2 005	

Mengesahkan,
Ketua Jurusan Biologi




Dr. Evika Sandi Savitri, M. P.
NIP. 19741018 200312 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Faizatul Izza
NIM : 12620089
Jurusan : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan, atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

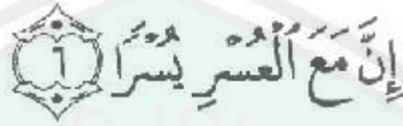
Malang, 01 Januari 2017
Yang membuat pernyataan,

METERAI
TEMPEL
26886ADF04717804
6000
ENAM RIBU RUPIAH

Faizatul Izza
NIM. 12620089

MOTTO

Hidup adalah perjuangan



“Sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan”

(QS. Al-Insyirah (94);6)

Dan

“Apa yang sudah dimulai dengan baik, dikerjakan dengan baik, harus diselesaikan dengan baik pula”

HALAMAN PERSEMBAHAN

*Terima kasih kepada Allah SWT
atas kesempatan untuk saya hidup dan menjalani kehidupan ini,
dan juga yang telah mempertemukan saya dengan orang-orang hebat
di bawah ini*

1. Terima kasih untuk kedua orang tua saya (Ayah **Mukhammad Tohir** dan Ibu **Chusnul Mazidah**), madarasah pertama saya yang telah banyak memberikan contoh yang baik tentang bagaimana menjalani kehidupan, dan doa dari beliau yang senantiasa mengalir dalam diri saya, serta dukungan baik secara material maupun non material
2. Terima kasih untuk nenek saya (**Masruroh** (Alm.)), sosok yang sangat inspiratif bagi saya karena pesan terakhir beliaulah yang selalu menjadi penggugah di kala semangat saya menurun, “(dalam bahasa jawa) seng pinter, kasihan orang kedua tuamu ”
3. Terima kasih untuk kedua paman saya (**Mahmud** dan **Hasan Toha**), karena kebaikan beliau yang sudah memberikan sebagian tempat di rumahnya untuk saya tinggal selama masa studi S1 di Malang, selain itu juga menyediakan fasilitas lengkap guna menunjang studi S1 saya, serta membagikan ilmu dalam hal berdagang
4. Terima kasih untuk dosen pembimbing saya (ibu **Kholifah Holil**, M.Si dan ibu **Umayyatus Syarifah**, M. A), sosok yang sangat inspiratif, sabar, telaten, dan bijaksana, yang telah banyak membagikan ilmu beliau, memberikan saran dan masukan untuk perbaikan penelitian saya
5. Terima kasih untuk dosen penguji seminar proposal dan dosen penguji sidang skripsi saya (ibu **Priya Dewi Fitriasari**, M. Sc, dan ibu Dr. drh. Hj. **Bayyinatul Muchtaromah**, M. Si) yang telah banyak memberikan saran dan masukan untuk perbaikan penelitian saya
6. Terima kasih untuk kedua adik saya (**Muhammad Firmansyah** dan **Husna Wardati**) yang telah memberikan contoh yang baik untuk saya agar bisa menjadi kakak yang lebih baik dari hari ini
7. Terima kasih untuk *partner* penelitian saya (**Diah Arifiani**) yang telah banyak membantu dari segi tenaga, pikiran, dan ilmu
8. Terima kasih untuk semua personil dalam “*mikromania team*” biologi 2012 (**Nita, Naim, Emil, Rurin, Riza, Zahara, Kikin, Anik, Fina, Wahyu,**

Ainin, Betti, Nadya, Khoiri, Umda), mereka adalah teman senasib seperjuangan yang telah banyak memberikan ilmu mereka, tenaga mereka, materi mereka, dan tentunya canda tawa yang selalu saya rindukan

9. Terima kasih untuk laboran genetika dan mikrobiologi (Mas **Ismail** dan Mas **Basyar**) yang telah banyak membantu pada saat penelitian saya berlangsung
10. Terima kasih untuk semangat yang senantiasa ditularkan kepada saya dari semua teman-teman biologi angkatan 2012, Pengabdian masyarakat (kelompok 113 2012), dan teman penelitian dari jurusan kimia
11. Terima kasih untuk sahabat saya dimanapun kalian berada (**Ratna, Imroatul, Muafifah, Fika, Asmaul, Zia, Iim, Syamsi,**)

Skripsi ini bagi saya sangat berarti karena selain dari segi proses penelitian dan penyusunan yang memberikan banyak pengalaman juga kehadiran kalian dalam proses penyelesaian skripsi ini, semoga Allah SWT senantiasa memudahkan urusan kalian (dalam hal apapun yang positif), melancarkan rezeki kalian, dan melancarkan jalan kalian untuk meraih kesuksesan baik di dunia maupun di akhirat

Amin

Faizatul Izza
(19 Oktober 2016)

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Syukur alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus menyelesaikan tugas akhir atau skripsi ini dengan baik.

Selanjutnya penulis haturkan ucapan terima kasih seiring doa dan harapan jazakumullah ahsanal jaza' kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada :

1. Prof. Dr. H. Mudjia Raharjo, M. Si, selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, yang telah banyak memberikan pengetahuan dan pengalaman yang berharga.
2. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M. Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dr. Evika Sandi Savitri, M. P selaku ketua jurusan biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Kholifah Holil, M. Si dan ibu Umaiatus Syarifah, M. A selaku dosen pembimbing skripsi yang telah banyak memberikan pengarahan dan pengalaman yang berharga.
5. Segenap civitas akademika jurusan biologi, teutama seluruh dosen, terima kasih atas segenap ilmu dan bimbingannya.
6. Ayahanda dan Ibunda tercinta yang senantiasa memberikan doa dan restunya kepada penulis untuk menuntut ilmu.
7. Semua pihak yang ikut membantu menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis secara pribadi.

Amin Ya Robbal Alamin.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 03 Januari 2017
Penulis

DAFTAR ISI

HALAMANJUDUL	
HALAMAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
HALAMAN MOTTO	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
ABSTRAK	xvi
ABSTRACT	xvii
مخلص البحث	xviii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Pendahuluan	1
1.2. Rumusan Masalah	9
1.3. Tujuan Penelitian	10
1.4. Manfaat Penelitian	10
1.5. Batasan Masalah	11
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Tinjauan Umum Tentang Susu	13
2.1.1. Komponen Susu	13
2.1.2. Sumber Kontaminasi Susu	15
2.1.3. Batas Cemaran Mikroorganisme Susu	17
2.2. <i>Escherichia coli</i>	19
2.3. <i>Escherichia coli</i> O157:H7	22
2.3.1. Faktor Virulensi dan Antigen O157	25
2.3.2. Kasus Foodborne Disease yang Disebabkan Oleh Bakteri <i>Escherichia coli</i> O157:H7	29
2.4. Kultur dan Media Pertumbuhan Bakteri	30
2.4.1. Media Diferensial	30
2.4.2. Media Selektif Diferensial	31
2.5. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	32
2.5.1. Komponen <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	33
2.5.2. Langkah <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	35
2.5.3. Faktor yang Mempengaruhi <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	37
2.5.4. Kelebihan <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	37
2.6. Primer Gen <i>rfbE</i>	38
BAB III METODE PENELITIAN	

3.1. Rancangan dan Jenis Penelitian	42
3.2. Objek Penelitian	42
3.3. Waktu dan Tempat	42
3.4. Alat dan Bahan	
3.4.1. Alat	43
3.4.2. Bahan	43
3.5. Prosedur Penelitian	
3.5.1. Tahap Persiapan.....	45
3.5.1.1. Sterilisasi Alat dan Bahan.....	45
3.5.1.2. Pengambilan Sampel	45
3.5.1.3. Pembuatan Media	45
3.5.2. Tahap Pemeriksaan Sampel.....	45
3.5.2.1. Uji nilai pH Sampel Susu.....	45
3.5.2.2. Uji Pendugaan (Presumptive Test).....	46
3.5.2.3. Uji Konfirmasi (Confirmed Test)	47
3.5.2.4. Pewarnaan Gram	47
3.5.2.5. Inokulasi di Media Selektif Diferensial <i>Mac Conkey</i> agar ..	
dengan sorbitol	48
3.5.2.6. Pemurnian dan Sub Kultur	48
3.5.3. Tahap Uji Secara Molekuler	48
3.5.3.1. Persiapan kultur Isolat Susu Sapi Perah.....	48
3.5.3.2. Ekstraksi DNA	49
3.5.3.3. Kuantitas dan Kualitas DNA.....	49
3.5.3.4. Amplifikasi DNA dengan PCR.....	51
3.5.3.5. Visualisasi Hasil PCR	51
3.5.4. Kontrol Positif	52
3.6. Parameter.....	52
3.7. Analisis data.....	52
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Nilai Potensial Hidrogen (pH) Susu dan Hubungannya dengan Keberadaan Jenis Mikroorganisme di dalam susu.....	53
4.2. Identifikasi Bakteri <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	60
4.2.1. Hasil Uji Pendugaan MPN koliform, Uji Penegasan di media EMB agar, dan Pengecatan Gram.....	60
4.2.2. Identifikasi Bakteri <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Menggunakan Media Selektif Diferensial <i>Mac Conkey</i> agar dengan Sorbitol	72
4.3. Deteksi Salah Satu Faktor Virulensi Isolat <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Melalui Pendekatan Molekuler	78
4.3.1. Kuantitas dan Kualitas DNA Isolat <i>Escherichia coli</i> O157:H7....	78
4.3.2. Amplifikasi DNA Menggunakan Primer Gen <i>rfbE</i>	85
 BAB V PENUTUP	
5.1. Simpulan	98
5.2. Saran.....	98

DAFTAR PUSTAKA	100
LAMPIRAN.....	112



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Perbedaan komposisi kandungan susu pada spesies yang berbeda.....	15
Tabel 2.2 Spesifikasi persyaratan mutu batas maksimum cemaran mikroorganism pada susu (dalam satuan CFU/Gram atau mL).....	18
Tabel 2.3 Karakteristik <i>E. coli</i> O157:H7 dibanding dengan serotipe yang lain .	23
Tabel 2.4 Estimasi dosis infeksius dari spesies bakteri yang berhubungan dengan diare	25
Tabel 4.1 Nomor sampel susu dan lokasi peternakan	53
Tabel 4.2 Nilai pH ke-15 sampel susu sapi perah.....	54
Tabel 4.3 Hasil Uji MPN Koliform.....	61
Tabel 4.4 Hasil Uji Penegasan di Media EMB Agar	65
Tabel 4.5 Hasil Pewarnaan Gram.....	70
Tabel 4.6 Hasil identifikasi bakteri <i>E. coli</i> O157:H7.....	73
Tabel 4.7 Nilai kuantitas DNA genom isolat <i>E. coli</i> O157:H7.....	79
Tabel 4.8 Suhu dan Waktu Proses Annealing.....	90
Tabel 4.9 Primer gen <i>rfbE</i> dari beberapa sumber penelitian.....	94

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur antigenik <i>Escherichia coli</i>	22
Gambar 2.2 <i>Kluster</i> gen <i>rfb</i>	28
Gambar 2.3 Struktur Komponen antigen O pada O157.....	29
Gambar 2.4 koloni Gram Negatif di medium diferensial EMB agar.....	31
Gambar 2.5 koloni <i>E. coli</i> O157:H7 dan <i>E. coli</i> non O157:H7.....	32
Gambar 2.6 Prinsip kerja PCR.....	36
Gambar 3.1 Uji Pendugaan.....	46
Gambar 4.1 Koloni bakteri koliform di media EMB agar.....	67
Gambar 4.2 Hasil goresan <i>E. coli</i> di media EMB agar.....	69
Gambar 4.3 Bakteri Gram negatif dengan pembesaran 40x.....	70
Gambar 4.4 Inokulasi dari isolat <i>E. coli</i> O157:H7 dan <i>E. coli</i> non-O157:H7 Di media selektif <i>Mac Conkey</i> agar dengan Sorbitol.....	75
Gambar 4.5 Visualisasi hasil isolat DNA <i>E. coli</i> O157:H7.....	83
Gambar 4.6 elektroforegram kelima sampel isolat <i>E. coli</i> O157:H7 dengan suhu <i>annealing</i> yang berbeda-beda.....	87

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran I Persyaratan Cemar Bakteri Pada Susu	112
Lampiran II Pembuatan Media.....	115
Lampiran III Dokumentasi Penelitian.....	121



ABSTRAK

Izza, Faizatul. 2017. Deteksi Cemaran Bakteri Patogen *E. coli* O157:H7 pada Susu Sapi Perah secara Konvensional dan Molekuler. Skripsi, Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing Biologi: Kholifah Holil M. Si; Pembimbing Agama: Umayyatus Syarifah, M. A

Kata Kunci : Susu sapi perah, *E. coli* O157:H7, DNA, PCR, Primer gen *rfbE*, Virulensi

Susu sapi perah merupakan bahan pangan asal ternak yang keberadaannya dekat dengan berbagai sumber cemaran bakteri baik patogen maupun nonpatogen. Sumber cemaran tersebut dapat melalui kondisi sanitasi lingkungan yang buruk, kondisi hewan ternak, kebersihan pemerah, sumber air yang digunakan, dan proses yang berlangsung selama pemerahan susu sapi perah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui cemaran bakteri *Escherichia coli* O157:H7 pada susu sapi perah yang ada dilokasi Desa Petungsewu dan Desa Pujon Kulon secara konvensional dan molekuler.

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksplorasi dengan menggunakan rancangan penelitian deskriptif kualitatif. Sampel susu sapi perah didapatkan dari 15 peternak yang berbeda-beda, 9 sampel dari Desa Petungsewu dan 6 sampel berasal dari Desa Pujon Kulon yang dipilih secara acak. Pengujian dilakukan secara konvensional melalui uji pendugaan menggunakan metode MPN koliform, uji penegasan *E. coli* di media diferensial *Eosin Methylene Blue* agar, pewarnaan Gram, dan identifikasi *E. coli* O157:H7 menggunakan media selektif diferensial *Mac Conkey* agar dengan sorbitol dan dibandingkan dengan kontrol positif *E. coli* O157:H7. Selanjutnya uji konfirmasi melalui pendekatan molekuler dengan isolasi DNA isolat bakteri dan amplifikasi DNA target menggunakan primer gen *rfbE*.

Hasil pengujian bahwa 6 sampel susu sapi perah dari 2 lokasi peternakan yang berbeda tercemar bakteri *E. coli*, 4 sampel dari 15 sampel (26,67 %) yang berasal dari Desa Petungsewu positif tercemar bakteri *E. coli* O157:H7. Hasil amplifikasi menggunakan primer gen *rfbE* tidak terlihat pita DNA yang mengamplifikasi gen target dengan ukuran produk PCR 239 bp.

ABSTRACT

Izza, Faizatul. 2017. Contamination Detection of Pathogenic Bacteria *Escherichia coli* O157:H7 in Milk Dairy Cattle with Conventional and Molecular Methods. Undergraduate Thesis. Departement of Biology. Faculty of Science and Technology. Islamic State University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Biology Advisor : Kholifah Holil, M.Si; Religion Advisor: Umayyatus Syarifah, M. A

Keywords : Milk dairy cattle, *E. coli* O157:H7, DNA, PCR, Primer gen *rfbE*, Virulence

Milk dairy cattle is the origin from cattle and its existence adjacent with source of contamination both of nonpathogenic and pathogenic bacteria. The source of the contamination can be through bad sanitation, animal condition, cleanliness of the milker, source of water is used, and the milking process. This study aims to determine contaminant of *Escherichia coli* O157: H7 in milk dairy cattle ini Petungsewu and Pujon Kulon village through conventional and molecular method.

Type of research is exploratory with qualitative descriptive design. Milk dairy cattle obtained from 15 different breeders and selected randomly. Conventional method with prediction test of MPN coliforms, confirmation test to detect *E. coli* with differential media *Eosin Methylene Blue* agar, Gram staining tests and identification of *E. coli* O157: H7 using selective-differential media and it compared with the positive control *E. coli* O157: H7. Further confirmation test through molecular approaches to DNA isolation and amplification used *rfbE* primer.

The results showed that 6 samples from 2 different location contaminated by *E. coli* bacteria, 4 of 15 samples (26,67%) from Petungsewu village positively contaminated with *E. coli* O157:H7. The results of the amplification using *rfbE* primer not visible DNA bands were supposed to amplify the *rfbE* gene with the size of PCR product is 239 bp.

مختصر البحث

عزة، فائزة . ٢٠١٦ . اكتشاف شوائب البكتيرية المسببة للأمراض *E. coli* O157: H7 في حليب البقر تقليدياً كانت وجيزية. بحثٌ علمي. قسم البيولوجيا، كلية العلوم والتكنولوجيا، الجامعة الإسلامية الحكومية (UIN) مولانا مالك إبراهيم مالانغ. الشرف: خليفة خليل للاحتير و أمية الشرية للاحتير.

الكلمات الرئيسية: حليب البقر وبكتيرية *E. coli* O157: H7 والحمض النووي (DNA) و PCR ومراقبة للحيات [*Primer gen*] و طاقة البكتيرية لسبب الأمراض

حليب البقر هو غذاء منشأ من للاشية قريب من مصادر تلوث البكتيرية مسببة للأمراض أم لا. يكون مصادر هذا التلوث إما من أحوال البيئة السيئة و أحوال المواشي ونظافة الحالب و مصدر المياه المستعملة والعملية تجري حين تحليب حليب البقر. يهدف هذا البحث إلى معرفة شوائب البكتيرية المسببة للأمراض *O157: H7 E. coli* في حليب البقر من تعريف التقليدية و اختبار التأكيد لكشف احد العوامل من طاقة البكتيرية لسبب الأمراض بمنهج الجزئية مع تقنية "وثاق رحمي من فوليجمراسي [*Polymerase Chain Reaction*] (PCR)".

نوع البحث للعمول هو بحثٌ استكشافي باستخدام تصميم البحث التوعمي الوصفي. و عينات الحليب مأخوذة من خمسة عشر مرعياً واختبرت حرافاً. جرى اختبار التقليدية باستخدام اختبار النظرية بمنهج "م ف ن كوليفورم [MPN Coliform]" و اختبار التأكيد من *E. coli* O157: H7 باستخدام المنبت المختلف المصنوع من حلام "ويوزين الميثيلين الأزرق [*Eosin Methylene Blue*]", وتلونين غرام، و تعرّف بكتيرية *E. coli* O157: H7 باستخدام المنبت لللتحيب المصنوع من حلام "ماك كونكي [*Mac Conkey*]" مع السورينول المنقارن بمراقبة إيجابية من *E. coli* O157: H7. تم اختبار التأكيد بمنهج الجزئية بالفصل الحمض النووي من البكتيرية المعزولة، والصاق الحمض النووي للهدوف باستخدام الماركة للحيات [*Primer gen*] *rfbE*.

والحاصل من الاختبار أنه يحتوي على شوائب البكتيرية *E. coli*، أربعة من خمس عشرة عينة (٤٠٪) للوثة بكتيرية *E. coli* O157: H7 إيجابية استناداً إلى رؤيتها في اختلاف لون المستعمرة باستخدام المنبت لللتحيب. وحاصل إضاق الحمض النووي باستخدام الماركة للحيات [*Primer gen*] *rfbE* لا يدل على مربية ربط الحمض النووي مع أنه ينبغي أن يُلصق للحيات المستهدفة بقدر إنتاج PCR ٢٣٩ bp.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Susu menurut pengertian bakunya merupakan hasil dari sekresi kelenjar mammae atau kelenjar susu mamalia. Susu merupakan makanan yang mengandung unsur-unsur penting yang dibutuhkan oleh tubuh manusia seperti lemak, gula, protein, beberapa mineral, dan vitamin (Mahran, 2005). Adapun hewan-hewan yang dapat menghasilkan susu meliputi sapi perah, kerbau, unta, kambing perah (kambing etawah), dan domba. Hewan-hewan tersebut oleh Allah SWT diberikan keistimewaan melalui produk yang dihasilkan oleh binatang ternak berupa susu seperti firman Allah SWT dalam al-Quran surat an-Nahl (16) ; 66.

وَإِنَّ لَكُمْ فِي الْأَنْعَامِ لَعِبْرَةً ۖ نُسْقِيكُمْ مِمَّا فِي بُطُونِهِ مِنْ بَيْنِ فَرْثٍ وَدَمٍ لَبْنَا خَالِصًا سَائِغًا لِلشَّارِبِينَ

Artinya:

“Dan sesungguhnya pada binatang ternak itu benar-benar terdapat pelajaran bagi kamu. Kami memberimu minum dari pada apa yang berada dalam perutnya (berupa) susu yang bersih antara tahi dan darah, yang mudah ditelan bagi orang-orang yang meminumnya”.

Berdasarkan ayat di atas, lafadz (labanaan) yang berarti susu (Shihab, 2002). Menurut Hadiwiyoto (1994) air susu termasuk jenis bahan pangan hewani, berupa cairan putih yang dihasilkan oleh hewan ternak mamalia dan diperoleh dengan cara pemerahan. Susu merupakan salah satu nikmat dari Allah SWT yang cukup berperan dalam pemenuhan kebutuhan gizi yang dibutuhkan oleh manusia karena semua zat makanan yang terkandung di dalam air susu dapat diserap oleh darah dan dimanfaatkan oleh tubuh. Melalui ayat tersebut, Allah SWT

memberikan pelajaran berupa manfaat dan nasihat bagi kaum yang memikirkannya melalui binatang ternak (Jamaluddin, 2010).

Manfaat yang dapat diambil dari ayat tersebut berkaitan tentang kandungan nilai gizi yang tinggi pada susu. Melalui kandungan nilai gizi yang tinggi pada susu menjadi hal yang perlu diwaspadai mengingat susu yang dihasilkan oleh binatang ternak keluar diantara kotoran dan darah (Muhammad, 2003). Kotoran dan darah merupakan 2 hal penting yang tidak dapat dipisahkan dari susu. Susu terbentuk dari bahan-bahan yang ada diantara kotoran (gula, *volatile fatty acids*, gas, berbagai protein, dan lemak) yang dialirkan oleh darah menuju ke saluran ambung untuk melalui serangkaian proses fisiologis dan terbentuklah produk berupa susu (Malaka, 2010).

Beberapa bahan yang ada diantara kotoran memiliki potensi untuk menunjang keberadaan mikroorganisme dalam susu salah satunya amonia yang berfungsi untuk membentuk protein bakteri. Selain amonia, darah juga dapat menjadi media transportasi mikroorganisme di dalam tubuh hewan ternak. Oleh karena itu, melalui ayat di atas secara tidak langsung juga berisi nasihat bagi kaum yang memikirkan bahwa susu yang dihasilkan oleh binatang ternak itu terlihat bersih secara fisik, namun juga perlu diteliti bagaimana kondisi secara mikrobiologi dari susu tersebut sebelum dikonsumsi lebih lanjut oleh manusia.

Menurut data statistik diketahui bahwa 58 % jumlah produksi susu sapi di Indonesia dihasilkan oleh Provinsi Jawa Timur dengan total produksi susu yang dihasilkan sebanyak 554.312 liter ton pada tahun 2012 (BPS, 2014). Kota Batu sebagai salah satu daerah sentra sapi perah dan penyuplai utama susu bagi

beberapa pabrik susu besar. Kecamatan Dau dan Pujon merupakan 2 kecamatan yang sebagian besar penduduknya bermata pencaharian sebagai peternak susu sapi perah (Damayanti, 2014). Susu sapi perah yang berasal langsung dari peternakan tidak disarankan untuk langsung diminum melainkan harus melalui beberapa tahapan seperti pemanasan, pasteurisasi, ozonisasi, atau juga pemanasan dengan suhu tinggi (*ultra high temperature*) mengingat banyaknya kasus cemaran bakteri non-patogen maupun patogen pada susu. Kualitas susu secara mikrobiologi dari masing-masing peternak juga berbeda-beda. Semua bergantung selama pemrosesan dan juga sanitasi lingkungan pada setiap peternak. Proses pra produksi pada tingkatan peternak menjadi proses yang penting untuk diketahui guna menelusuri berbagai kemungkinan cemaran bakteri non-patogen maupun patogen sebelum bahan pangan yang berasal dari ternak tersebut dikonsumsi.

Susu yang boleh dikonsumsi oleh manusia tidak hanya sebatas bersih dari segi fisik saja, tetapi juga terbebas dari syarat secara mikrobiologi mengingat susu merupakan media potensial penyebaran bakteri patogen maupun nonpatogen. Menurut Octaviantris (2007) kondisi susu yang memiliki nilai gizi ideal sangat disukai oleh mikroorganisme patogen dan nonpatogen untuk berkembang. Mikroorganisme yang tumbuh dan berkembang dalam susu dapat berasal dari sapi perah itu sendiri maupun dari lingkungan pemerahan susu sapi tersebut. Menurut Frank (2001) susu akan terkontaminasi oleh mikroorganisme yang berasal dari saluran puting dan kain penyaring. Penggunaan kain penyaring yang hanya dibilas dengan air dingin, dikhawatirkan akan ada sisa dari susu serta kotoran lain masih tetap menempel. Kemungkinan pencemaran lainnya berasal dari tangan pemerah

yang hanya mencuci tangan dengan menggunakan air sehingga dimungkinkan masih adanya bakteri yang menempel pada tangan pemerah. Oleh karena itu kebersihan lingkungan dan pemerah susu sapi perlu diperhatikan karena dapat mempengaruhi kualitas susu yang dihasilkan.

Hal tersebut dapat dibuktikan jika terdapat bakteri nonpatogen di dalam susu maka kualitas susu menjadi menurun (Octaviantris, 2007). Menurut Balia *et al.* (2008), perubahan kualitas susu akibat adanya mikroorganisme non patogen ditandai oleh perubahan rasa, aroma, warna, konsistensi, dan penampilan. Salah satu bakteri indikator yang menandakan bahwa susu terkontaminasi adalah adanya *Escherichia coli* yang dapat diketahui dari gas yang ditimbulkan pada saat kemasan susu dibuka (Yusuf, 2011). Oleh karena itu, berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) No. 01-3141-1998 dan SNI No. 7388:2009 tentang syarat mutu susu segar disyaratkan bahwa cemaran mikroorganisme maksimum untuk total bakteri (Total Plate Count/TPC) adalah 1×10^6 CFU/mL, bakteri *coliform* adalah 20/mL, Angka MPN (*Most Probable Number*) *Escherichia coli* <3/mL dan negatif untuk bakteri patogenik (BSN, 2009).

Banyak faktor yang dapat mempengaruhi mutu dan keamanan produk ternak dalam hal ini susu sapi perah dikarenakan kemungkinan kontak dengan berbagai sumber cemaran lebih mungkin terjadi sehingga berbagai sumber penyakit setiap saat dapat terjadi diproses ini. Jika didapati susu tercemar oleh bakteri patogen maka bakteri tersebut dapat menularkan penyakit *foodborne disease* yaitu penyakit yang disebabkan karena mengonsumsi makanan dan minuman yang tercemar bakteri patogen. *E. coli* O157:H7 termasuk bakteri

patogen penyebab *foodborne disease* (Masturotul, 2009; Monem, *et al.*, 2014). Penularan pada *foodborne disease* umumnya melalui oral, jika tertelan dan masuk ke dalam saluran pencernaan akan menimbulkan gejala klinis diantaranya mual, muntah, dan diare (Supardi, 1999).

Gejala yang ditimbulkan oleh *foodborne disease* tersebut dapat menyebabkan morbiditas yang tinggi. Survey morbiditas yang dilakukan oleh Subdit Diare Departemen Kesehatan tahun 2000 sampai 2010 terlihat kecenderungan insiden 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 (Kemkes, 2011). Data tersebut menunjukkan bahwa kejadian diare yang disebabkan oleh *foodborne disease* tidak bisa dianggap remeh melihat penyebarannya yang tergolong cepat.

Kecepatan penyebaran penyakit yang disebabkan oleh *foodborne disease* dipengaruhi oleh beberapa faktor. Pertama, rendahnya sistem kekebalan tubuh pada seseorang menjadi faktor mudahnya terinfeksi bakteri *foodborne disease E. coli* O157:H7. Bila daya tahan tubuh seseorang menurun maka sistem kekebalan tubuh kurang mampu memberikan respon yang baik untuk melawan paparan antigen dari bakteri tersebut sehingga tubuh akan lebih mudah terinfeksi. Disamping itu, bakteri *E. coli* O157:H7 dapat ditularkan dari manusia yang telah terinfeksi ke manusia lainnya. Penyebaran bakteri *E. coli* O157:H7 dari manusia ke manusia yang lain terjadi secara peroral. Jika seseorang yang telah terinfeksi dan terjadi kontak dengan seseorang lainnya maka hal tersebut akan mempercepat proses penyebarannya.

Kedua, daya infeksi yang dimiliki oleh bakteri *E. coli* O157:H7 tergolong cukup tinggi karena dengan jumlah sel yang sedikit dapat menimbulkan gejala klinis. Berdasarkan hasil laporan yang terkumpul ternyata 10 sel bakteri *enterohaemorrhagic E. coli* (EHEC) sudah dapat menyebabkan sakit (Andriani, 2006). Pruumboom-Bress, *et al.* (2000), menyatakan dosis infeksi untuk dapat menginfeksi dan menimbulkan gejala klinis dari *E. coli* O157:H7 kurang lebih adalah 10 *colony forming unit* (CFU) dengan masa inkubasi 2 sampai 8 hari dan gejalanya akan muncul sekitar 3 sampai 4 hari pasca infeksi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jumlah bakteri *E. coli* O157:H7 yang sedikit saja apabila menginfeksi anak-anak, orang manula maupun orang yang memiliki sistem kekebalan yang rendah sudah dapat menyebabkan sakit. Contoh penyakitnya seperti *Hemorrhagic colitis* (HC) yaitu peradangan pada usus besar yang mengakibatkan pendarahan dan penyakit *Hemolytic Uremic Syndrome* (HUS) yang mengakibatkan gagal ginjal dan anemia (Kandou, 2009).

Potensi *E. coli* O157:H7 sebagai penyebab penyakit infeksi seperti HUS dan HC dikarenakan beberapa faktor virulensi yang dimiliki diantaranya fimbria, polisakarida kapsul O, O-antigen kapsul, lipopolisakarida, aerobaktin, hemolisin, dan sitotoksin (Prihtiyantoro, 2014). Masing-masing faktor virulensi dikode oleh gen yang berbeda dan memiliki peran yang berbeda pula dalam menginfeksi. Ada yang saling bekerja sama memainkan perannya antara faktor virulensi satu dengan yang lain. Seperti faktor virulensi sitotoksin, *Shiga toxin 1* dan *shiga toxin 2* yang dihasilkan oleh EHEC dalam lumen usus manusia dapat masuk ke lapisan usus bagian lebih dalam, akibat adanya faktor virulen yang lain yaitu intimin. Faktor

virulen intimin dapat menyebabkan munculnya *attaching* dan *effacing lesions* sehingga terjadi *locus of enterocyte effacement* (LEE). Bakteri EHEC menghasilkan faktor protein *EspA* dan *EspB* yang dapat membantu terjadinya penempelan pada epitel usus, dengan dibantu adanya gen *eae* yang terdapat pada bakteri EHEC (Andriani, 2006).

Selain faktor virulensi yang dikode oleh gen *stx₁*, *stx₂*, *eae*, *hlyA*, dan *fliC*, ada juga faktor virulensi dari Bakteri *E. coli* O157:H7 yang bekerja sendiri seperti lipopolisakarida (LPS). LPS sering terlibat dalam proses patologi bakteri Gram negatif dan memegang peranan penting dalam menginfeksi (Morin, *et al.*, 2004). LPS merupakan salah satu faktor virulensi yang menyebabkan terjadinya sepsis dan inflamasi dengan mengaktifkan CD14 pada makrofag. Kemudian makrofag menghasilkan lipid aktif seperti TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, dan IL-10. Lipopolisakardia tersusun atas komponen Antigen O. Antigen O pada *E. coli* O157 dikode oleh gen *rfbE*. Tidak seperti faktor virulensi lainnya, yang hanya memiliki fungsi terkait menyebabkan penyakit tapi faktor virulensi yang dikode oleh gen *rfbE*, selain berperan dalam menginfeksi terkait dengan lipopolisakarida, gen *rfbE* juga dapat membedakan antara *E. coli* O157:H7 dan *E. coli* non O157:H7 karena struktur antigen O pada O157 yang berbeda dari yang lain (Morin, *et al.*, 2004).

Penelitian deteksi *E. coli* O157:H7 terhadap sampel susu sudah pernah dilakukan di Indonesia. Suwito (2009) melakukan deteksi cemaran bakteri patogen *E. coli* O157:H7 pada susu sapi yang berasal dari peternakan di Kabupaten Bogor, Sukabumi, dan Cianjur diperoleh hasil sekitar 0,57% dari 351

sampel susu yang diperiksa telah tercemar bakteri *E. coli* O157:H7. Gie, *et al.* (2015), juga melakukan deteksi cemaran bakteri *E. coli* O157:H7 terhadap sampel susu sapi perah di lingkungan peternakan Yogyakarta dan didapatkan hasil dari 27 sampel susu, 2 susu diantaranya tercemar oleh bakteri *E. coli* O157:H7. Keduanya menggunakan metode konvensional dengan cara menginokulasi di media selektif diferensial khusus *E. coli* O157 yaitu *Mac Conkey Sorbitol* agar. Berbeda dengan yang dilakukan oleh Kandou (2009) selain identifikasi secara konvensional untuk mendapatkan isolat *E. coli* O157:H7, juga melakukan deteksi secara molekuler menggunakan gen target *rfbE* guna mengonfirmasi hasil isolat dari identifikasi secara konvensional.

Deteksi salah satu faktor virulen dari isolat *E.coli* O157:H7 dapat dilakukan dengan mengamplifikasi gen target menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan teknik dalam bidang molekuler yang kepentingannya untuk mengamplifikasi DNA secara *in vitro* (McPherson dan Moller, 2006). Menurut Rahman (2013), umumnya PCR digunakan pada penelitian skala laboratorium dalam bidang kesehatan dan biologi yaitu deteksi penyakit. Kelebihan dari deteksi penyakit secara molekuler adalah cepat, akurat, sensitif, dapat digunakan untuk bakteri yang tidak dapat dikulturkan maupun yang dapat dikulturkan. Selain itu lebih mudah mengetahui GMO (*Genetically Modified Organism*) di lapangan, serta tingkat diskriminatifnya tinggi, bisa sampai pada tingkatan strain (Tan, 2001).

Berdasarkan paparan latar belakang di atas, diharapkan penelitian yang akan dilakukan memberikan informasi mengenai cemaran bakteri patogen *E. coli*

O157:H7 pada susu sapi perah dari peternakan yang berbeda-beda yang ada di 2 Desa yaitu Petungsewu dan Pujon Kulon serta konfirmasi dari isolasi secara konvensional melalui teknik PCR dengan parameter yang diamati berupa pita DNA yang disajikan dari hasil elektroforesis. Jika positif mengandung *E. coli* O157:H7 maka akan terlihat koloni yang tidak berwarna (*colourless*) pada medium selektif diferensial *MaC Conkey* agar dengan sorbitol dan primer spesifik (gen *rfbE* yang mengkode biosintesis lipopolisakarida O157) mampu mengamplifikasi gen target dari *E. coli* O157:H7 dimana posisi sekuens gen pada strand 5' – 3' yaitu 7441 – 7680 bp, ukuran produk PCR adalah 239 bp (Morin, *et. al.*, 2004). Sebaliknya, jika negatif mengandung *E. coli* O157:H7 maka tidak terlihat perbedaan koloni di media selektif diferensial.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini dipaparkan sebagai berikut.

1. Apakah terdapat cemaran bakteri *Escherichia coli* pada susu sapi perah di peternakan Desa Petungsewu dan Desa Pujon Kulon ?
2. Apakah terdapat cemaran bakteri *E. coli* O157:H7 pada susu sapi perah di peternakan Desa Petungsewu dan Desa Pujon Kulon ?
3. Bagaimana hasil aplikasi metode konvensional dan molekuler untuk mendeteksi cemaran bakteri patogen *E. coli* O157:H7 pada sampel susu sapi perah ?

1.3. Tujuan

Tujuan dalam penelitian ini akan dipaparkan sebagai berikut.

1. Untuk mengetahui cemaran bakteri *Escherichia coli* pada susu sapi perah di peternakan Desa Petungsewu dan Desa Pujon Kulon.
2. Untuk mengetahui cemaran bakteri *E. coli* O157:H7 pada susu sapi perah di peternakan Desa Petungsewu dan Desa Pujon Kulon.
3. Untuk mengetahui hasil aplikasi metode konvensional dan molekuler guna mendeteksi cemaran bakteri patogen *E. coli* O157:H7 pada sampel susu sapi perah.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini dipaparkan sebagai berikut.

1. Memberikan informasi ilmiah tentang tingkat keamanan pangan dalam hal ini susu sebagai objek penelitian.
2. Memberikan informasi ilmiah tentang keberadaan bakteri *E. coli* O157:H7 pada susu sapi perah di tingkat peternak yang merupakan informasi penting untuk memperbaiki kualitas susu di tingkat peternak.
3. Memberikan kontribusi dalam mengembangkan metode deteksi menggunakan pendekatan molekuler melalui faktor virulen yang dimiliki oleh bakteri patogen *E. coli* O157:H7.

1.5. Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini dipaparkan sebagai berikut.

1. Kontrol positif berupa isolat *E. coli* O157:H7 dari laboratorium mikrobiologi, Universitas Airlangga.
2. Susu sapi perah didapat dari peternakan sapi perah yang berbeda-beda dan berasal dari 2 lokasi yang berbeda namun masih dalam 1 kota yaitu Kota Batu, Provinsi Jawa Timur. Sebanyak 9 sampel dari Kecamatan Dau, Desa Petungsewu dan 6 sampel dari Kecamatan Pujon, Desa Pujon Kulon yang dipilih secara *random sampling*.
3. Sampel susu diambil sebanyak 500 mL langsung dari ambing sapi dan dimasukkan ke dalam plastik steril.
4. Ekstraksi atau isolasi DNA bakteri menggunakan metode CTAB/NaCl yang (Ausubel, 2003)
5. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA *E. coli* O157:H7 dengan *rfbE* sebagai gen target. sekuen primer 5'-3' primer forward :GTGCTTTTGATATTTTCCGAGTACATTGG dan primer reverse : TTTATATCACGAAAACGTGAAATTGCTGAT. Posisi sekuens gen pada strand 5' – 3' yaitu 7441 – 7680 bp, ukuran produk PCR adalah 239 bp (Kandou, 2009).
6. Parameter yang diamati berupa pH susu, hasil isolasi secara konvensional untuk mendeteksi keberadaan bakteri *E. coli* dan *E. coli* O157:H7 menggunakan media diferensial dan selektif diferensial, hasil dari isolasi DNA secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan elektroforesis dan

spektrofotometer nanodrop serta hasil amplifikasi DNA target dengan menggunakan primer gen *rfbE*.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Umum Tentang Susu

2.1.1. Komponen Susu

Susu menurut pengertian bakunya merupakan hasil dari sekresi kelenjar mammae atau kelenjar susu mamalia (Waster, 2006). Sebagian besar susu yang dikonsumsi oleh manusia berasal dari sapi perah, karena jenis ternak ini adalah penghasil susu yang potensial. Ternak lain seperti kerbau, kambing, domba dan kuda juga menghasilkan susu, tetapi masih dalam jumlah terbatas. Susu yang berasal dari sapi perah lazim disebut susu, sedangkan susu dari ternak yang lain diberi sebutan sesuai dengan nama hewan penghasilnya. Sebagai contoh, susu dari kerbau disebut susu kerbau dan susu dari kambing disebut susu kambing (Muhamad, 2002).

Hewan ternak seperti sapi perah, kerbau, unta, kambing perah (kambing etawah), dan domba tersebut oleh Allah SWT diberikan keistimewaan melalui produk yang dihasilkan oleh binatang ternak berupa susu. Seperti firman Allah SWT dalam al-Quran surat al-Mukminun (23) ; 21.

وَإِنَّ لَكُمْ فِي الْأَنْعَامِ لَعِبْرَةً نُّسْقِيكُم مِّمَّا فِي بُطُونِهِ وَلَكُمْ فِيهَا مَنَافِعُ كَثِيرَةٌ وَمِنْهَا تَأْكُلُونَ

Artinya:

“Dan sesungguhnya pada binatang-binatang ternak, benar-benar terdapat pelajaran yang penting bagimu, Kami memberimu minum dari air susu yang ada dalam perutnya, dan (juga) pada binatang ternak itu terdapat faedah yang banyak untukmu, dan sebagian darinya kamu makan “

Berdasarkan ayat di atas, lafad **مَنَافِعُ** yang berarti faedah (Shihab, 2002). menurut tafsir Ibnu Katsir (Mubarakfuri, 2007) Allah SWT menyebutkan bahwa apa yang telah Dia ciptakan bagi makhluk-Nya pada binatang ternak terdapat berbagai manfaat. Salah satunya manusia dapat meminum susu yang berasal dari perut binatang ternak. Manfaat yang dapat diperoleh dari susu dikarenakan banyaknya kandungan gizi di dalam susu. Hal tersebut dipertegas oleh Muhammad (2002) secara kimiawi susu tersusun atas dua komponen utama, yaitu air yang berjumlah sekitar 87% dan bahan padat yang berjumlah sekitar 13%. Di dalam bahan padat susu terdapat berbagai senyawa kimia, baik yang tergolong senyawa zat gizi makro (makro nutrien) seperti lemak, protein, dan karbohidrat, maupun senyawa zat gizi mikro (mikro nutrien) seperti vitamin dan mineral serta beberapa senyawa lainnya.

Komposisi kandungan susu dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain spesies, tingkat laktasi, pakan, interval pemerahan, temperatur, dan umur. Sebagai contoh terdapat variasi komposisi kandungan susu diantara 5 spesies hewan dan manusia (**tabel 2.1**).

Tabel 2.1. Perbedaan komposisi kandungan susu pada spesies yang berbeda

Spesies	Komposisi					
	Lemak	Casein	Protein kering	Laktosa	Kadar abu	Total
Sapi (<i>Bos taurus</i>)	3,9	2,6	0,6	4,6	0,7	12,7
Kambing (<i>Capra hircus</i>)	4,5	2,6	0,6	4,3	0,8	13,3
Domba (<i>Ovis aries</i>)	7,2	3,9	0,7	4,8	0,9	18,0
Kerbau (<i>Bubalus bubalis</i>)	7,4	3,2	0,6	4,8	0,8	17,2
Unta (<i>Camelus dromedarius</i>)	4,0	2,7	0,9	5,0	0,8	13,5
Manusia (<i>Homo sapiens</i>)	4,5	0,4	0,9	7,1	0,2	12,9

Sumber : JUFF dan DEETH (2007)

Berdasarkan tabel di atas menunjukkan kandungan gizi di dalam susu cukup tinggi dan lengkap sehingga susu merupakan bahan pangan yang sangat berpotensi untuk disukai oleh mikroorganisme. Hal tersebut didukung oleh Octaviantris (2007) adanya kandungan gizi yang cukup tinggi dan lengkap dapat menyebabkan banyaknya bakteri baik patogen maupun nonpatogen tumbuh dan berkembang di dalam susu tersebut.

2.1.2. Sumber Kontaminasi Susu

Susu dapat terkontaminasi oleh mikroorganisme melalui 2 faktor yaitu faktor intrinsik (yang berasal dari hewan itu sendiri) dan faktor ekstrinsik (yang berasal dari lingkungan) (Bali, *et al.*, 2013). Menurut Gustiani (2009), proses pencemaran mikroba pada susu dimulai ketika susu diperah karena adanya bakteri yang tumbuh di sekitar ambing, sehingga pada saat pemerahan bakteri tersebut

terbawa dengan susu. Hal tersebut termasuk salah satu contoh pencemaran dari faktor intrinsik. Sedangkan dari segi faktor ekstrinsik ada banyak hal yang menyebabkan susu terkontaminasi.

Faktor ekstrinsik pertama terjadinya kontaminasi berasal dari kebersihan pemerah, terutama tangan pemerah yang langsung bersentuhan dengan ambing sapi. Menurut Frank (2001), tangan pemerah yang hanya mencuci tangan dengan menggunakan air sehingga dimungkinkan masih adanya bakteri yang menempel pada tangan pemerah. Selain itu, Forsythe dan Hayes (1998) juga menjelaskan bahwa di bawah kuku dapat ditemukan bakteri patogen sampai 10^7 CFU/cm². Menurut penelitian Sartika, Indrawani dan Sudiarti (2005), usapan tangan pemerah susu dari Kukusan dan Batutulis, sekitar 41,7% tercemar *E.coli* O157:H7. Keadaan tersebut menunjukkan bahwa higiene perorangan masih kurang sehingga perlu ditingkatkan.

Faktor ekstrinsik kedua terjadinya kontaminasi berasal dari sanitasi kandang. Lokasi pemerahan seharusnya dipisah dengan lokasi aktifitas harian sapi karena jika lokasi tersebut disatukan kemungkinan kontak dengan mikroorganisme lebih besar. Disamping itu, kebersihan lantai juga harus diperhatikan, menurut FAO dan IDF (2011) semakin sering peternak membersihkan lantai kandang maka kontaminasi bakteri yang berasal dari lantai kandang yang kotor dan ambing sapi yang terinfeksi mastitis dapat ditekan.

Faktor ekstrinsik ketiga terjadinya kontaminasi dapat berasal dari alat pemerahan. Penggunaan kain penyaring yang hanya dibilas dengan air dingin, dikhawatirkan akan ada sisa dari susu serta kotoran lain masih tetap menempel

(Frank, 2001). Kemungkinan pencemaran lainnya berasal dari tersedianya *milk can* serta ember khusus sebagai tempat penampung pada saat diperah juga dapat mempengaruhi tingkat kontaminasi susu. Bagaimanapun juga ember yang digunakan secara bersamaan untuk menampung susu dan memandikan ternak sangat besar terjadinya kontaminasi (Suwito, 2009). Oleh karena itu, pemerahan susu harus dilakukan di bawah kondisi bersih dengan menjaga kebersihan tempat dan lingkungan sekitarnya.

2.1.3. Batas Cemar Mikroorganisme Susu

Mikroorganisme yang berkembang dalam susu dapat menurunkan kualitas susu dan mempengaruhi keamanan produk tersebut bila dikonsumsi oleh manusia. Beberapa penampakan kerusakan pada susu yang disebabkan oleh cemaran mikroorganisme sebagai berikut (Gustiani, 2009).

1. Pengasaman dan penggumpalan, yang disebabkan oleh fermentasi laktosa menjadi asam laktat sehingga pH susu menurun dan kasein menggumpal.
2. Susu berlendir seperti tali karena terjadinya pengentalan dan pembentukan lendir akibat pengeluaran bahan seperti kapsul dan bergetah oleh beberapa jenis bakteri.
3. Penggumpalan susu tanpa penurunan pH yang disebabkan oleh bakteri *B. cereus*.
4. Gas yang ditimbulkan pada saat kemasan susu dibuka akibat terkontaminasi oleh bakteri *Escherichia coli*.

Oleh karena itu, untuk mencegah kerusakan penampakan susu dan akhirnya menurunkan kualitas susu, pemerintah Indonesia memiliki standarisasi

nasional Indonesia (SNI) yang mengatur batas maksimum cemaran mikroba dalam susu 01-6366-2000 (**tabel 2.2**) yang harus dipatuhi oleh semua pihak yang terlibat.

Tabel. 2.2. Spesifikasi persyaratan mutu batas maksimum cemaran mikroorganisme pada susu (dalam satuan CFU/Gram atau mL)

Jenis cemaran mikroorganisme	Batas maksimum cemaran mikroba			
	Susu segar	Susu pasteurisasi	Susu bubuk	Susu steril/UHT
Jumlah total (<i>total plate count</i>)	1×10^6	$<3 \times 10^2$	5×10^4	$<10/0,1$
Koliform	2×10^1	$<0,1 \times 10^1$	0	0
<i>Escherichia coli</i> (patogen)(*)	0	0	0	0
<i>Enterococci</i>	1×10^2	1×10^2	1×10^1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1×10^2	1×10^1	1×10^1	0
<i>Clostridium sp</i>	0	0	0	0
<i>Salmonella sp</i> (**)	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
<i>Camphylobacter sp</i>	0	0	0	0
<i>Listeria sp</i>	0	0	0	0

Keterangan : (*) dalam satuan MPN/Gram atau ml, (**) : dalam satuan kualitatif
Sumber : SNI No. 01-6366-2000

Berdasarkan **tabel 2.2** ada beberapa jenis bakteri yang dapat mencemari susu. Mikroorganisme yang dapat mencemari susu dikategorikan menjadi dua golongan, yaitu mikroorganisme patogen dan mikroorganisme pembusuk (Saleh, 2004). Cemaran bakteri pembusuk menyebabkan kualitas susu menjadi menurun sedangkan cemaran bakteri patogen dapat menyebabkan penyakit yang membahayakan bagi manusia atau yang lebih dikenal dengan istilah *foodborne disease* yaitu penyakit yang disebabkan karena mengonsumsi makanan dan

minuman yang tercemar bakteri patogen. Bakteri patogen yang sering terlibat dalam kasus *foodborne disease* adalah *E. coli* O157:H7.

2.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah bakteri yang hidup secara normal dalam usus manusia dan hewan, pertama kali diisolasi oleh Dr. Theodor Escherich (1885) dari tinja bayi dan diberi nama *Bacterium coli commune*, selanjutnya dinamakan menjadi *Escherichia coli*. Selama bertahun-tahun bakteri ini dianggap sebagai organisme yang komensalisme pada usus besar (kolon), tetapi anggapan ini berakhir sampai tahun 1935 sebab ditemukan strain dari *Escherichia coli* yang menjadi penyebab penyebaran diare pada bayi (Todar, 2004; Clark, 2007).

E. coli yang berhubungan dengan penyakit diare diklasifikasikan berdasarkan karakteristik virulensinya dimana tiap kelompok menyebabkan penyakit dengan mekanisme yang berbeda (Jawetz, *et al.*, 2005). *Escherichia coli* yang dapat berhubungan dengan penyakit diare terdapat lima golongan yaitu (Jawetz, *et al.*, 2005) :

1. *Enteropathogenic E. coli* (EPEC)

adalah penyebab diare pada bayi atau anak-anak kurang dari 1 tahun dan jarang pada orang dewasa. Gejala yang tampak berupa demam tidak tinggi, muntah, malaise dan diare dengan tinja mengandung banyak lendir dan tidak bercampur darah.

2. *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC)

Strain dari kelompok ini memproduksi toksin yaitu *heat-labile toxin* (LT) dan *heat-stabile toxin* (ST) yang mirip dengan toksin *Vibrio cholera*. Infeksi dengan ETEC ditandai dengan gejala demam rendah, tinja encer seperti air, tidak bercampur darah, dan lendir yang biasa disertai dengan rasa kram pada abdomen dan biasanya sembuh dengan sendirinya.

3. *Enteroinvasive E. coli* (EIEC)

Penyebab diare seperti disentri yang disebabkan oleh *Shigella*. Strain ini dapat melakukan penetrasi, invasi dan kerusakan pada mukosa usus halus. Infeksi dengan EIEC ditandai dengan tinja agak encer bahkan seperti air, mengandung nanah, lendir dan darah, demam, abdomen terasa kram berat dan malaise.

4. *Enterohaemorrhagic E. coli* (EHEC)

Strain *E. coli* O157:H7 (EHEC) penyebab diare hemorrhagic dan colitis serta *hemolytic uremic syndrome* (HUS). Gejala yang ditimbulkan yang jumlah trombosit berkurang, anemia hemolitik, kegagalan ginjal, tinja encer berair, dapat mengandung darah, abdomen kram dan terasa sakit serta demam rendah atau tanpa demam. Berbeda dengan *Shigella dysentery* dan infeksi EIEC karena pada tinja penderita EHEC tidak ditemukan sel lekosit. *E.coli* O157: H7 memproduksi 2 jenis sitotoksin, yaitu *vero toxin* I dan II, dimana *vero toxin* I dan II tidak dapat dinetralisir oleh antibodi *Shiga toxin*.

5. *Enteroadherent E. coli* (EAHEC)

EAHEC disebut pula *Escherichia coli* enteroagregative *E.coli* (EAGGEC), strain dari kelompok ini menyebabkan diare dengan gejala yang ditimbulkan tinja encer berair, muntah, dehidrasi dan biasanya sakit pada abdomen.

E. coli memiliki karakteristik dimulai dari ukuran sel dengan panjang 2,0 – 6,0 μm dan lebar 1,1 – 1,5 μm serta berat sel *E. coli* 2×10^{-12} gram. Bakteri ini berbentuk batang, lurus, tunggal, berpasangan, atau rantai pendek, termasuk Gram negatif, dapat hidup soliter maupun berkelompok, umumnya motil, tidak membentuk spora, serta fakultatif anaerob (Carter dan Wise 2004). *E. coli* mempunyai tipe metabolisme fermentasi laktosa. Pertumbuhan yang baik dengan suhu optimal 37 °C pada media yang mengandung 1% peptone sebagai sumber karbon dan nitrogen (Berg, 2004).

Menurut Quinn, *et al.* (2002), tiga struktur antigen utama (**gambar 2.1**) permukaan yang digunakan untuk membedakan serotipe golongan *E. coli* adalah antigen somatik (O), kapsul (K), dan flagellar (H). Antigen O merupakan polisakarida spesifik spesies sebagai komponen pembuat kompleks lipopolisakarida dari dinding sel serta berperan dalam endotoksin. Antigen H merupakan antigen protein flagellar yang penting dalam serotyping dan merupakan aspek penting dari patogenitas. Antigen K merupakan komponen polisakarida yang ada pada enterobakter berperan dalam patogenitas bakteri dalam hal mekanisme pembentukan koloni bakteri. Antigen ini menghambat fagositosis dan efek dari serum antibodi hospes. Oleh karena itu, dengan adanya kapsul, antibodi tidak dapat menghancurkan *E. coli* tersebut.



Gambar 2.1. Struktur antigenik *Escherichia coli* (Campbell, 1999)

2.3. *Escherichia coli* O157:H7

E. coli O157:H7 adalah bakteri Gram negatif yang mempunyai kemampuan lambat memfermentasikan sorbitol (**tabel 2.3**), gagal memproduksi B-glukoronidase, dan memiliki kemampuan yang resisten terhadap antibiotik dan agen inhibitor seperti *tellurite*. *E. coli* serotipe O157:H7 memiliki arti dimana huruf “O” merujuk pada antigen somatik, sedangkan huruf “H” merujuk pada antigen flagellar. Kelompok serogroup *E. coli* O157 memiliki antigen O yang merupakan polisakarida spesifik spesies, dimana antigen tersebut berperan sebagai komponen pembuat kompleks lipopolisakarida dari dinding sel. LPS sering terlibat dalam proses patologi bakteri Gram negatif dan memegang peranan penting dalam menginfeksi (Morin, *et al.*, 2004).

Tabel 2.3. Karakteristik *E. coli* O157:H7 dibanding dengan serotipe yang lain

	Reaksi <i>E. coli</i> O157:H7	Reaksi <i>Escherichia</i> yang lain
Pewarnaan Gram	Negatif	Negatif
IMViCs		
Indole	+ (Merah)	Bervariasi
Methyl Red	+ (Merah)	+ (Merah)
Vogues-Proskauer	- (Tidak berwarna)	- (Tidak berwarna)
Citrate	- (Hijau atau tidak tumbuh)	- (Hijau atau tidak tumbuh)
Cellobiose	- (Ungu)	- (Ungu)
Sorbitol	- (Pucat atau tidak berwarna)	- (Berwarna)
Urea miring	- (Pucat)	- (Pucat)
Pigmen Production on Nutrien	- (Tidak memiliki pigmen warna)	- (Tidak memiliki pigmen warna)
Reaksi dengan MUG	-(Tidak fluoresensi)	+ (Fluoresensi)
Reaksi dengan BCIG	-(Pucat)	+ (Berwarna)
Latex Agglutination	+ (Positif)	-(Negatif)
O157	+ (Positif)	-(Negatif)
H7	+ (Positif)	-(Negatif)
Produksi verotoxin (VT)	VT 1+ dan/atau VT2+	VT 1 dan/atau VT 2+ or -

^A + (reaksi positif); - (reaksi negatif)

^B banyak *E. coli* O157 yang memberikan respon negative terhadap uji indol

^C *E. coli* O157:H16 dan H45 menampakkan warna ketika dalam MUG

Sumber: laboratory procedure MFLP-80, Maret 2008

Escherichia coli O157:H7 merupakan satu dari ratusan strain bakteri *Escherichia coli* yang berbahaya, menghasilkan toksin yang sangat kuat dan dapat menyebabkan penyakit berat (Clark, 2007). Contoh penyakitnya seperti

Haemorrhagic colitis yaitu peradangan pada usus besar yang mengakibatkan pendarahan dan penyakit *Hemolytic Uremic Syndrome* (HUS) yang mengakibatkan gagal ginjal dan anemia (Kandou, 2009). Akibat yang disebabkan oleh bakteri *E. coli* O157:H7 tersebut didukung oleh penyebarannya yang tergolong cepat.

Kecepatan penyebaran penyakit yang disebabkan oleh *foodborne disease* dipengaruhi oleh beberapa faktor. Pertama, rendahnya sistem kekebalan tubuh pada seseorang menjadi faktor mudahnya terinfeksi bakteri *foodborne disease E. coli* O157:H7. Bila daya tahan tubuh seseorang menurun maka sistem kekebalan tubuh kurang mampu memberikan respon yang baik untuk melawan pajanan antigen dari bakteri tersebut sehingga tubuh akan lebih mudah terinfeksi. Disamping itu, bakteri *E. coli* O157:H7 dapat ditularkan dari manusia yang telah terinfeksi ke manusia lainnya. Penyebaran bakteri *E. coli* O157:H7 dari manusia ke manusia yang lain terjadi secara peroral. Jika seseorang yang telah terinfeksi dan terjadi kontak dengan seseorang lainnya maka hal tersebut akan mempercepat proses penyebarannya. Kedua, daya infeksi yang dimiliki oleh bakteri *E. coli* serotipe O157:H7 tergolong cukup tinggi karena dengan jumlah sel yang sedikit dapat menimbulkan gejala klinis. Berdasarkan hasil laporan yang terkumpul ternyata 10 sel bakteri *enterohemorrhagic E. coli* (EHEC) sudah dapat menyebabkan sakit (Andriani, 2006). Pruijboom-Bress, *et al.* (2000), menyatakan dosis infeksi untuk dapat menginfeksi dan menimbulkan gejala klinis dari *E. coli* O157:H7 kurang lebih adalah 10 *colony forming unit* (CFU) (**tabel**

2.4) dengan masa inkubasi 2 sampai 8 hari dan gejalanya akan muncul sekitar 3 sampai 4 hari pasca infeksi.

Tabel 2.4. Estimasi dosis infeksius dari spesies bakteri yang berhubungan dengan diare

Spesies Bakteri	Estimasi Dosis Infeksius (jumlah sel bakteri)	Penyakit	Sumber
<i>E.coli</i> O157:H7	10-100	<i>Hemorrhagic colitis</i>	Standar higienis yang rendah, daging giling yang tidak matang, susu yang tidak dipasteurisasi, dan air yang terkontaminasi
<i>E. coli</i>	1.000.000-100.000.000	<i>Traveler's diarrhea</i>	Standar higienis yang rendah dan air yang terkontaminasi
<i>Salmonella</i>	100-1.000.000.000	Salmonellosis	Standar higienis yang rendah, unggas yang tidak matang, telur mentah
<i>Shigella spp.</i>	10-1.000.000	Disentri	Higienis individu yang rendah
<i>Vibrio cholera</i>	1.000.000-1.000.000.000	Kolera	<i>Seafood</i> mentah atau air tidak matang dan air yang terkontaminasi

Sumber : Petridis, H; G. Kidder and A. OGram (2002)

2.3.1 Faktor Virulensi dan Antigen O157

Dosis infeksius dari bakteri *E. coli* O157:H7 yang tinggi, hal tersebut didukung karena *E. coli* O157:H7 memiliki beberapa faktor virulensi yang membantu bakteri menyerang *host* yaitu saluran pencernaan manusia. *Shiga like*

toxin (SLT) atau *shiga toxin* seperti *stx 1* dan *stx 2* adalah faktor virulensi dari *Escherichia coli* O157:H7. Kedua faktor virulensi tersebut bekerja sama dengan faktor virulen lain seperti intimin dapat masuk ke lapisan usus bagian lebih dalam menyebabkan munculnya *attaching* dan *effacing lesions* sehingga terjadi *locus of enterocyte effacement* (LEE). Ketika lesi terbentuk maka toksin yang dihasilkan dalam lumen usus akan menembus lapisan yang lebih dalam dan juga menembus lapisan endotel sehingga masuk ke dalam aliran darah dan menyebabkan efek sistemik (Andriani, 2006).

Selain faktor virulensi yang dikode oleh gen *stx₁*, *stx₂*, *eae*, *hlyA*, dan *fliC*, ada juga faktor virulensi dari Bakteri *E. coli* O157:H7 yang bekerja sendiri seperti lipopolisakarida (LPS). Lipopolisakarida disebut juga dengan endotoksin, merupakan sebuah molekul berukuran besar yang mengandung lipid dan karbohidrat. Lipopolisakarida merupakan suprastruktur utama bakteri Gram negatif dalam membangun integritas struktural bakteri, dan melindungi bakteri dari pertahanan imunitas inang (Murray dan Wilton, 2003).

Lipopolisakarida ini disebut endotoksin karena terikat pada bakteri dan dilepaskan saat bakteri mengalami lisis atau pecahnya sel, beberapa juga dilepaskan saat penggandaan bakteri. Komponen toksik pada LPS adalah bagian lipid atau lemak, yang disebut lipid A. Komponen lipid A ini bukanlah struktur makromolekuler tunggal melainkan terdiri dari susunan kompleks dari residu-residu lipid. Endotoksin hanya ada pada bakteri Gram negatif berbentuk batang dan kokus yang tidak secara aktif dilepaskan dari sel serta dapat menimbulkan demam, syok, dan gejala lainnya. LPS terdiri dari tiga bagian yaitu rantai samping

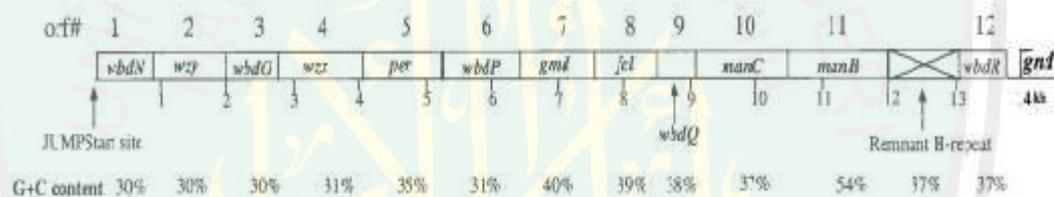
polisakarida (O), inti polisakarida, dan lipid A. Lipid A biasanya mengandung asam lemak (seperti *hydroxy-myristic acid*). Inti polisakarida mengandung gula (seperti KDO, *ketodeoxyoctulonate* dan *heptulose*). Inti polisakarida yang melekat pada lipid A merupakan bagian yang bertanggung jawab terhadap toksisitas bakteri Gram negatif (Abbas dan Lichtman, 2001).

Lipopolisakarida tidak mempunyai sifat toksis, tetapi merangsang mediator inflamasi dari bermacam tipe sel dan bertanggungjawab pada inisiasi proses sepsis. LPS beraksi sebagai *protypical endotoxin*, karena mengikat kompleks reseptor CD14/TLR4/MD2 yang memacu sekresi sitokin pro inflamatori pada berbagai tipe sel seperti TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, dan IL-10. Mediator inflamasi tersebut antara lain sitokin, nitrat oxide, superoxide, anion dan mediator lipid (Sumarmi dan Guntur, 2008).

Lipopolisakarida di dalam darah akan berikatan dengan protein darah membentuk LBP (Jessen, *et al.*, 2007; Shahin, *et al.*, 2006). LBP adalah suatu protein fase akut yang dianggap sebagai penanda suatu infeksi (Shahin, *et al.*, 2006). LBP dapat langsung mengaktifkan sistem imun seluler dan humoral yang dapat menimbulkan perkembangan gejala septikemia (Shahin, *et al.*, 2006; Guntur, 2008). TLR4 adalah reseptor *signal* untuk LPS (Kaneko, *et al.*, 2005). LBP yang berada dalam darah penderita akan bereaksi dengan makrofag melalui TLRs4 (*Toll Like Receptors 4*) sebagai reseptor transmembran dengan perantaraan reseptor CD¹⁴⁺ dan makrofag mengekspresikan imunomodulator (Shahin, *et al.*, 2006; Guntur, 2008). Makrofag mengeluarkan polipeptida yang disebut TNF, IL-

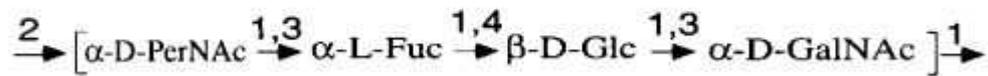
1, dan IL-8 yang merupakan mediator kunci dan sering meningkat sangat tinggi pada penderita *immunocompromise* (IC) yang mengalami sepsis (Guntur, 2008).

Lipopolisakardia tersusun atas komponen Antigen O. Antigen O mengandung banyak pengulangan dari unit oligosakarida. Antigen O memberikan kontribusi utama terhadap variasi antigen pada permukaan sel dan merupakan dasar dari variasi *E. coli* yang terbagi menjadi 166 serogrup O. Semua gen spesifik untuk sintesis antigen O telah diklusterkan (**Gambar 2.2**). Normalnya kluster gen antigen O panjangnya lebih dari 10 kb (Wang, 1998).



Gambar 2.2. Kluster gen *rfb*

Antigen O pada O157 mengandung *N-acetyl-D-perosamine*, *L-fucose*, *D-glucose*, dan *N-acetyl-D-galactose*. Jalur GDP *L-fucose* dikode oleh 4 gen yaitu *manB*, *manC*, *gmd*, and *fcl*. Jalur GDP *D-perosamine* dikode oleh gen *per* atau *rfbE*. *E. coli* strain O157 tidak berhubungan dengan strain yang lain dikarenakan antigen O pada O157 terkait gen yang mengkode transferase, flippase, komponen antigen O dan polimerase pada O157 spesifik (Wang, 1998). Tidak seperti faktor virulensi lainnya, yang hanya memiliki fungsi terkait menyebabkan penyakit tapi faktor virulensi yang dikode oleh gen *rfbE*, selain berperan dalam menginfeksi terkait dengan lipopolisakarida, gen *rfbE* juga dapat membedakan antara *E. coli* O157:H7 dan *E. coli* non O157:H7 karena struktur komponen antigen O pada O157 yang berbeda dari yang lain (**Gambar 2.3**) (Wang, 1998).



Gambar 2.3. Struktur komponen antigen O pada O157

2.3.2. Kasus Foodborne Disease yang Disebabkan Oleh Bakteri *Escherichia coli* serotipe O157:H7

Kejadian infeksi *Escherichia coli* serotype O157:H7 pada manusia di negara-negara maju cukup tinggi. CDC (*Clinical Disease Center*) melaporkan bahwa *Escherichia coli* serotipe O157:H7 adalah termasuk salah satu bakteri penyebab *food-borne disease* diantara 9 agen penyebab *food-borne disease* yang lainnya (Andriani, 2006). Pada tahun 1996 bulan Juni di kota Hiroshima Jepang sebanyak 65 orang anak menderita *Hemolytic Uremic Syndrome* (HUS). Pada bulan Agustus ditemukan sebanyak 9.578 kasus dengan 11 orang meninggal dunia dan 90 anak mengalami HUS (Bettelheim, 2004). Di Indonesia telah dilaporkan sembilan kasus HUS dan empat diantaranya meninggal dunia (Tambunan *et al.*, 2001).

Selain penyakit HUS, angka kejadian diare di Indonesia yang dilakukan oleh Subdit Diare Departemen Kesehatan tahun 2000 sampai 2010 terlihat kecenderungan insiden 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 (Kemkes, 2011). Data tersebut menunjukkan bahwa kejadian diare yang disebabkan oleh *foodborne disease* tidak bisa dianggap remeh. Oleh karena itu perlu dilakukan deteksi bakteri patogen terhadap sampel susu sapi perah guna mencegah penyakit berbahaya yang ditimbulkan.

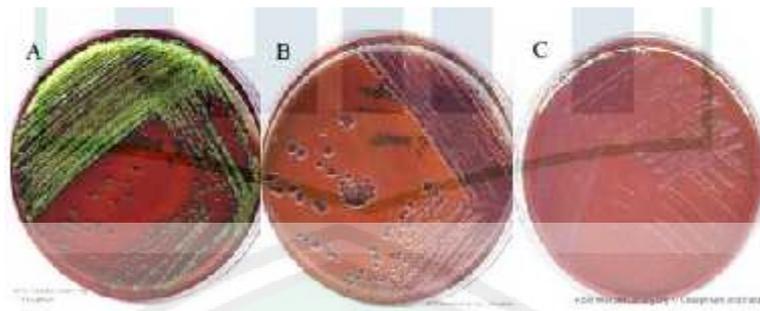
2.4. Kultur dan Media Pertumbuhan Bakteri

Kultur bakteri merupakan suatu proses poliferasi bakteri dengan menggunakan substrat nutrien yang sesuai. Beberapa medium memiliki sumber energi organik seperti karbon, nitrogen, sulfur, fosfor, kalsium, magnesium, dan beberapa enzim. Beberapa bakteri juga membutuhkan faktor pertumbuhan untuk dapat dikultur pada media yang sesuai (Kayser, 2005).

Setiap koloni mikroorganisme yang akan diidentifikasi harus benar-benar murni dan untuk mendapatkan biakan yang murni menggunakan media selektif yang memungkinkan untuk isolasi koloni bakteri berdasarkan pada karakteristik biokimia dari bakteri yang akan mempengaruhi sifat pertumbuhan bakteri pada suatu media spesifik. Identitas bakteri dapat dilihat dari pembentukan koloni yang spesifik pada media (Kayser, 2005).

2.4.1. Medium Diferensial

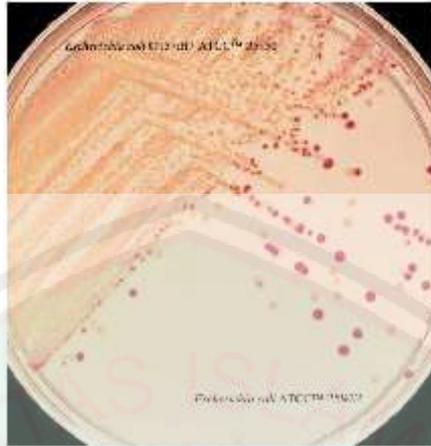
EMB agar (*Eosin Methylene Blue*) merupakan medium diferensial untuk isolasi bakteri Gram negatif. *E. coli* termasuk salah satu bakteri Gram negatif dan pada medium ini memiliki penampakan koloni berwarna ungu kehitaman pada bagian tengah dan kilap logam serta berdiameter 2-3 mm (**gambar 2.4.(A)**). *Enterobacter aerogenes* pada media ini memiliki diameter 4-6 mm, koloni menonjol dan lebih mukoid, berwarna pink dengan bagian tengah yang berwarna gelap dan kebanyakan bergabung antara koloni yang satu dengan lainnya (**gambar 2.4.(B)**). Sementara *Pseudomonas aeruginosa* memiliki koloni yang *colourless*, tidak memiliki kilap logam dan bagian tengah koloni berwarna keabuan (**gambar 2.4.(C)**) (Horvarth, 1974).



Gambar 2.4. Koloni Gram negatif pada EMB agar
 Keterangan gambar (A) Koloni *E. coli*, gambar (B) koloni *Enterobacter aerogenes*, dan gambar (C) koloni *Pseudomonas aeruginosa*
 Sumber : ASM Microbe Library.org

2.4.2. Medium Selektif dan Diferensial

Media selektif dan diferensial berbeda dengan media-media yang lain dikarenakan sumber nutrisi yang dibutuhkan khusus untuk menumbuhkan bakteri tertentu atau melalui nutrisi khusus tersebut yang kemudian menjadi pembeda antara koloni yang dimaksud dengan koloni yang lain. *E. coli* O157:H7 misalnya, bakteri tersebut tidak memiliki kemampuan untuk memfermentasikan sorbitol. Koloni *E. coli* O157:H7 pada media SMAC (*Sorbitol Mac Conkey* agar) tidak berwarna atau netral (abu-abu) dengan pusat berasap berdiameter 1-2 mm sedangkan *E. coli* non-patogen berwarna merah muda. Pertumbuhan *E. coli* O157:H7 pada *Mac Conkey* agar dengan Sorbitol yang tebal dapat terjadi pada kultur dengan ciri tanpa warna (*colourless*) atau *sorbitol-nonfermenting*. *Colourless* atau merah muda pada koloni merah diproduksi untuk mengetahui kemampuan isolat untuk memfermentasi karbohidrat sorbitol (**gambar 2.5**) (Anggreini, 2015).



Gambar 2.5. Koloni *E. coli* O157:H7 dan *E. coli* non O157:H7 di medium SMAC agar

Koloni *E. coli* O157:H7 tidak berwarna (*colourless*) sedangkan koloni *E. coli* non O157:H7 berwarna merah muda

Sumber : Anggreini (2015)

2.5. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) menurut definisi adalah reaksi memperbanyak DNA secara *in vitro* dengan memanfaatkan cara replikasi DNA dengan bantuan enzim DNA polimerase dan perubahan sifat fisik DNA terhadap suhu (Lisdayanti, 1997). Sedangkan menurut Erlich (1989) PCR adalah suatu metode *in vitro* yang digunakan untuk mensintesis sekuen tertentu DNA dengan menggunakan 2 primer oligonukleotida yang menghibrid pita yang berlawanan dan mengapit daerah target DNA. Prinsip dasar dari metode ini adalah amplifikasi materi genetik yang terkandung dalam setiap organisme hidup. PCR dapat dilakukan dalam waktu kurang dari satu hari dan jutaan DNA bisa berhasil dibuat. Karena DNA setiap organisme adalah spesifik, maka dengan menggunakan teknik ini dapat diidentifikasi secara akurat organisme asalnya (Muladno, 2001).

2.5.1. Komponen *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama sebagai berikut (Yuwono, 2006).

1. DNA cetakan (*template*)

Fungsi DNA template di dalam proses PCR adalah sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. Template DNA ini dapat berupa DNA kromosom, DNA plasmid ataupun fragmen DNA apapun asal di dalam DNA template tersebut mengandung fragmen DNA target yang dituju. Penyiapan DNA template, untuk proses PCR dapat dilakukan dengan menggunakan metode lisis sel ataupun dengan cara melakukan isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid dengan menggunakan metode standar yang ada. Pemilihan metode yang digunakan di dalam penyiapan DNA template tergantung dari tujuan eksperimen (Handoyo dan Rudiretna, 2000). DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara $10^5 - 10^6$ molekul. Dua hal penting tentang cetakan adalah kemurnian dan kuantitas (Yusuf, 2010).

2. Oligonukleotida primer

Dalam proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA. Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein bisa didapatkan dari *database Gen Bank*. Apabila urutan DNA maupun 45 urutan protein yang dituju belum diketahui maka perancangan primer dapat didasarkan pada hasil analisis homologi

dari urutan DNA atau protein yang telah diketahui mempunyai hubungan kekerabatan yang terdekat (Handoyono dan Rudiretna, 2000).

3. *Deuksiribonukleotida trifosfat (dNTPs)*

dNTPs merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksosotidin trifosfat) dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat). Dalam proses PCR dNTPs bertindak sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTP akan menempel pada gugus -OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA template. Konsentrasi optimal dNTPs untuk proses PCR harus ditentukan (Handoyo dan Rudiretna, 2000). Konsentrasi dNTP yang rendah akan meminimalkan *mispriming* pada daerah non target dan menurunkan kemungkinan perpanjangan nukleotida yang salah, oleh karena itu spesifitas dan ketepatan PCR meningkat pada konsentrasi dNTP yang lebih rendah (Sulistyaningsih, 2007).

4. Enzim polimerase

Pada proses PCR enzim polimerase diperlukan untuk tahap ekstensi DNA. Enzim polimerase DNA berfungsi sebagai katalis untuk reaksi polimerasi DNA. Enzim polimerase DNA diisolasi dari bakteri termofilik atau hipertermofilik sehingga enzim ini bersifat termostabil sampai temperatur 95°C. Dengan menggunakan teknik PCR, panjang fragmen DNA yang dapat diamplifikasi mencapai 35 kilo basa. Amplifikasi fragmen DNA pendek (kurang dari tiga kilo basa) relatif lebih mudah dilakukan. Untuk mengamplifikasi fragmen DNA panjang (lebih besar dari tiga kilo basa) memerlukan beberapa kondisi

khusus, di antaranya adalah diperlukan polimerase DNA dengan aktivitas yang kuat dan juga buffer PCR dengan pH dan kapasitas tinggi (*High-salt buffer*) (Handoyono dan Rudiretna, 2000).

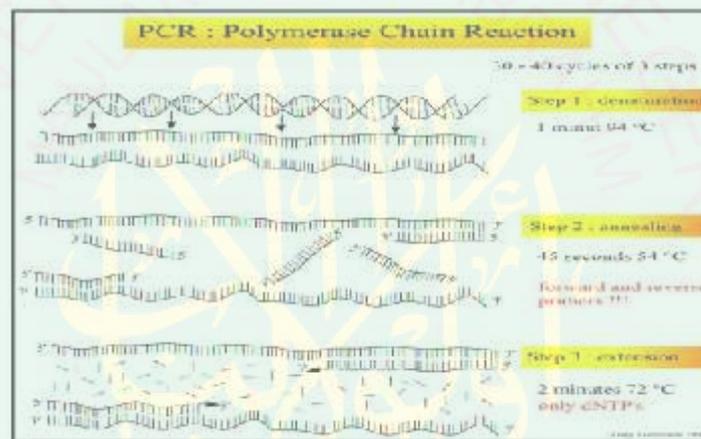
5. *Buffer*

Reaksi PCR hanya akan berlangsung pada kondisi pH tertentu. Oleh karena itu untuk melakukan proses PCR diperlukan buffer PCR. Fungsi buffer adalah menjamin pH medium. Selain buffer PCR diperlukan juga adanya ion Mg^{2+} , ion tersebut berasal $MgCl_2$. $MgCl_2$ bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas senyawa DNA polimerase. Dengan adanya $MgCl_2$ ini akan meningkatkan interaksi primer dengan template yang membentuk kompleks larut dengan dNTP antara. Dalam proses PCR konsentrasi $MgCl_2$ berpengaruh pada spesifitas dan perolehan proses (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

2.5.2. Langkah *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Tahap denaturasi, rantai utas ganda DNA akan terpisah secara sempurna dan menghasilkan utas tunggal yang merupakan cetakan bagi pembentukan utas baru DNA. Penyebab kegagalan PCR yang paling umum adalah proses denaturasi yang tidak sempurna. DNA utas ganda pada umumnya terdenaturasi sempurna pada suhu 94-95°C (Taylor, *et al.*, 1995). Setelah cetakan DNA terdenaturasi, selanjutnya pada suhu yang lebih rendah terjadi proses penempelan primer (*annealing*) pada DNA utas tunggal yang komplemen dengan urutan nukleotida primer. Suhu dan lamanya waktu *annealing* bergantung pada komposisi, panjang dan konsentrasi primer, namun biasanya berlangsung selama 45 detik hingga 1 menit pada suhu 50-68°C (Former, *et al.*, 1994). Selanjutnya tahap pemanjangan

atau ekstensi yang mana apabila suhu dinaikkan kembali menjadi 70-75°C maka primer dengan bantuan enzim DNA polymerase akan membentuk untai DNA yang baru (**gambar 2.6**). Jika ketiga tahap dalam proses PCR telah dilakukan maka setiap satu segmen DNA untai ganda diamplifikasi menjadi 2 segmen DNA untai ganda yang identik, sehingga jumlahnya menjadi dua kali lebih banyak, siklus 26 diulangi kembali dari awal, demikian seterusnya hingga siklus selesai (Diffenbach, 1995).



Gambar 2.6. Prinsip kerja PCR (Campbell, 1999)

Setiap tahap PCR tersebut harus dilakukan secara berurutan dan satu perjalanan dari tahap denaturasi hingga tahap ekstensi dinamakan satu siklus (*cycle*). Umumnya satu proses PCR membutuhkan sekitar 30 – 40 siklus demi mendapatkan untaian DNA baru (*amplicon*) dalam jumlah cukup banyak sesuai kebutuhan hasil analisis DNA. Perubahan suhu dalam setiap tahap PCR tersebut juga harus dilakukan dalam waktu singkat, oleh sebab itu PCR dilakukan menggunakan alat bernama PCR *thermal cycler* (Diffenbach, 1995).

2.5.3. Faktor Yang Mempengaruhi *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Hasil yang didapatkan dari teknik PCR dipengaruhi oleh beberapa hal seperti substansi yang digunakan serta pola gradien dan siklus PCR. Guna mendapatkan hasil yang optimal, dibutuhkan konsentrasi enzim Taq Polimerase sekitar 1 – 2.50 unit/100 μ L reaksi, dNTP dengan konsentrasi 10 mM, magnesium klorida dengan konsentrasi 1 – 10 mM, buffer Tris-HCl konsentrasi 10 – 50 mM pH 8.30 – 8.80. Disamping itu untuk mendapatkan hasil PCR yang optimal, dibutuhkan primer yang spesifik sesuai kebutuhan dengan konsentrasi 0,1-1 μ M. Kemurnian DNA target juga mampu mempengaruhi hasil PCR, sehingga untuk mendapatkan hasil PCR yang optimal diperlukan DNA target yang murni dengan konsentrasi 500 ng (Agrawal, 2008).

Pola gradien dan siklus PCR merupakan faktor lain yang juga berpengaruh besar terhadap hasil PCR. Namun seringkali pola gradien dan siklus PCR tidak dapat ditentukan dengan pasti. Hal ini dikarenakan pola gradien dan siklus PCR dapat berbeda-beda menyesuaikan dengan substansi yang digunakan, utamanya suhu *annealing* yang menyesuaikan dengan jenis primer yang digunakan. Meski begitu, umumnya PCR dilakukan dengan pola gradien dan siklus yang tidak berbeda jauh. Pola gradien yang umumnya digunakan adalah tahap denaturasi pada suhu 90 – 97°C, tahap *annealing* pada suhu 50 – 65°C, tahap ekstensi pada suhu 72°C, serta siklus PCR sebanyak 25 – 35 siklus (Agrawal, 2008).

2.5.4. Kelebihan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan teknik dalam bidang molekuler yang kepentingannya untuk mengamplifikasi DNA secara in

vitro (McPherson dan Moller, 2006). Menurut Rahman, *et al.* (2013), mengatakan bahwa umumnya PCR digunakan pada penelitian skala laboratorium dalam bidang kesehatan dan biologi yaitu deteksi penyakit. Kelebihan dari deteksi penyakit secara molekuler adalah cepat, akurat, sensitif, dapat digunakan untuk bakteri yang tidak dapat dikulturkan maupun yang dapat dikulturkan. Selain itu lebih mudah mengetahui GMO (*Genetically Modified Organism*) di lapangan, serta tingkat diskriminatifnya tinggi, bisa sampai pada tingkatan strain (Tan, 2001).

Bakri, *et al.* (2014), mengatakan di dalam penelitiannya teknik PCR dapat digunakan untuk mengatasi kelemahan diagnostik metode konvensional (kultur) terutama berkaitan dengan keakuratan suatu data (spesifik). Hal tersebut dibuktikan oleh Bakri, *et al.* (2014), di dalam penelitiannya yang membandingkan keakuratan kedua metode (konvensional dan modern) dengan feses manusia sebagai sampel diperoleh 6 sampel positif *E. coli* O157:H7 melalui metode kultur sedangkan melalui metode PCR diperoleh 13 sampel positif *E. coli* O157:H7.

2.6. Primer Gen *rfbE*

Keakuratan data yang diperoleh dengan menggunakan teknik PCR tidak terlepas dari peranan primer PCR yang bersifat spesifik. Kandou (2009) melakukan penelitian dengan menggunakan teknik PCR dan primer khusus untuk *E. coli* O157:H7 yaitu gen *rfbE*. Hasil dari penelitian milik Kandou (2009) didapatkan data melalui teknik PCR dengan menggunakan primer gen *rfbE* sebanyak 8,33% sampel air minum dalam kemasan dan 25% sampel air minum isi ulang tercemar bakteri *E. coli* O157:H7. Hal tersebut memberikan informasi dan

membuktikan melalui teknik PCR terbukti lebih sensitif, spesifik, dan cepat untuk mengkonfirmasi serotipe O157 mengingat implikasi dari deteksi *E. coli* O157:H7 pada sampel makanan dan minuman adalah penting.

Hal terpenting dalam teknik PCR adalah desain primer untuk amplifikasi DNA yang memerlukan data sekuen dari genom agen yang bersangkutan (Aprijani, 2004). Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA. Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein bisa didapatkan dari *database GenBank*. Apabila urutan DNA maupun 45 urutan protein yang dituju belum diketahui maka perancangan primer dapat didasarkan pada hasil analisis homologi dari urutan DNA atau protein yang telah diketahui mempunyai hubungan kekerabatan yang terdekat (Handoyono dan Rudiretna, 2000).

Amplifikasi DNA dilakukan pada gen target *rfbE* yaitu salah satu gen yang bertanggung jawab untuk sintesis rantai samping O dimana rantai samping O adalah bagian dari lipopolisakarida (LPS) yang merupakan konstituen yang esensial dari membran luar bakteri. Lipopolisakarida (LPS) sering terlibat dalam proses patologi bakteri Gram negatif dan memegang peranan penting dalam infektivitas dari bakteri-bakteri patogen (Morin, *et al.* 2004; Yaron and Matthews, 2002). Gen *rfbE* dari *E. coli* O157:H7 menyandi komponen dari Antigen O yaitu *N-acetyl-D-perosamine* pada *E. coli* O157. LPS O157 dan merupakan gen yang unik untuk serogroup *E. coli* O157 (Wang, 1998).

Allah SWT yang mempunyai kerajaan langit, bumi, dan isinya telah menciptakan segala sesuatu menurut ukuran dan serapi-rapinya. Sebagaimana firman Allah SWT dalam al-Quran surat al-Furqon (25) ; 2.

يَا أَيُّهَا الْمَلِكُ السَّمَاوَاتِ لَأَرْضًا وَمَا يَتَّخِذُ لَدَاؤَ وَمَا يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا

Artinya :

“yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan(Nya), dan dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya”

Lafad (*faqoddarohu*) yang berarti menetapkan ukuran-ukuran (Shihab, 2002). Allah SWT telah menetapkan pola dan ukuran bagi setiap makhluk-Nya (Shihab, 2002). Setiap makhluk baik manusia, hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme di dalam tubuhnya diatur oleh unit terkecil di dalam sel atau yang lebih dikenal dengan istilah gen. Gen diwariskan melalui proses reproduksi oleh individu terhadap keturunannya bersama dengan DNA yang membawanya (Campbell, 2002).

Begitu halnya dengan gen *rfbE* yang memiliki ukuran tertentu dan telah diidentifikasi sebagai penanda (*marker*) yang baik karena diturunkan pada semua fase pertumbuhan (*growth phases*) dari fase eksponensial awal sampai fase stasioner akhir. Menurut Yaron dan Matthews (2002) gen *rfbE* merupakan gen target yang baik untuk mendeteksi kehadiran dari bakteri *E. coli* O157:H7 dalam sampel. Primer yang digunakan pada penelitian ini merujuk pada primer yang digunakan oleh Kandou (2009) dimana spesifisitasnya 100%, kedua primer secara spesifik mengamplifikasi DNA gen target. Sensitifitas dari teknik PCR untuk mendeteksi *E. coli* O157:H7 adalah kurang lebih 30 sel. Primer spesifik (gen *rfbE*) mampu mengamplifikasi gen target dari *E. coli* O157:H7 dimana posisi

sekuens gen pada strand 5' – 3' yaitu 7441 – 7680 bp, ukuran produk PCR adalah 239 bp (Morin, *et al.*, 2004).



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan dan Jenis Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksploratif dan jenis penelitian ini menggunakan deskriptif kualitatif dimana sampel susu sapi perah nantinya diuji secara konvensional melalui media selektif dan dilanjutkan dengan teknik biologi molekuler melalui isolasi DNA bakteri dan amplifikasi DNA target menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) untuk mendeteksi salah satu faktor virulensinya.

3.2. Objek Penelitian

Objek penelitian dalam penelitian ini dipilih secara acak menggunakan metode *random sampling* sebanyak 15 sampel susu dari 15 peternak susu sapi perah yang berbeda-beda yang tersebar di daerah Batu, Provinsi Jawa Timur (Desa Petungsewu dan Desa Pujon Kulon).

3.3. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan sekitar bulan September – November 2016. Pengambilan sampel susu sapi perah di peternakan sapi rumahan di Desa Petungsewu dan Desa Pujon Kulon. Dilanjutkan dengan pengujian sampel di laboratorium mikrobiologi dan laboratorium biologi molekuler, jurusan biologi,

fakultas sains dan teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1. Alat

Alat- alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain timbangan analitik, spatula, botol flakon, vortex, sentrifus, mikropipet BioRad (5-10 ul, 20-200 ul, 100-1000 ul), mesin *thermal cycler* seri BioRAD, sarung tangan, masker, UV-transiluminator seri BioRAD molecular imager Gel DocTMXr imaging system, elektroforesis horizontal, chamber elektroforesis, ultra sentrifus, plastik, botol sampel, spektrofotometer nanodrop seri BioRAD smartspecTM Plus, kuvet, tube eppendorf (volume 2 mL), plastik klip, gunting, alat tulis, tabung durham, rak tabung, tabung reaksi, *ice box*, mikrotip (*blue tip*, *yellow tip*, *white tip*), gelas ukur, beaker glass, erlenmeyer, hot plate, inkubator, shaker-inkubator, cawan petri, lemari es, bunsen, korek api, kertas label, botol semprot, jarum ose, pH indikator, dan plastik wrap.

3.4.2. Bahan

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini meliputi medium NA [*nutrient* agar (20 gr/L); *beef extract* 3 gr, *bacto pepton*, 5 gr, agar 15 gr, dan akuades 1 L], medium LB [*Lactose Broth* (13 gr/L); *Beef extract* 3 gr, peptone 5 gr, laktosa 5 gr, dan akuades 1 L], medium *Eosin Methylene Blue* agar (EMB agar (37,46 gr/L), peptone 10 gr, laktosa 10 gr, eosin 0,4 gr, *methylene blue* 0,065 gr, agar 15 gr, dan akuades 1 L], medium LB broth (Luria bertani broth (25 gr/L);

casein enzymic hydrolysate 10 gr, *yeast extract* 5 gr, *sodium chloride* 10 gr, pH 7,5, dan akuades 1 L), medium *Mac Conkey* agar dengan sorbitol cair 70% [*Mac Conkey* (50,03 gr/L); *peptic digest of animal tissue* 17 gr, *proteose peptone* 3 gr, 1,420 mL sorbitol 70%, *bile salts mixture* 1,5 gr, laktosa 10 gr, *sodium chloride* 5 gr, *neutral red* 0,03 gr, *crystal violet* 0,001 gr, agar 13,5 gr, pH 7,1, dan akuades 1 L], sampel susu sapi perah, buffer TE (Tris EDTA), SDS (*Sodium dodecyl sulfat*) 10%, NaCl (Natrium Klorida) 5 M, larutan CTAB (*cethyltrimethyl ammonium bromide*) 10%, larutan CTAB/NaCl, klorofom, isoamil alkohol, fenol, isopropanol, etanol 70%, NH₄COOH (Ammonium asetat) 5M, akuades, alkohol 70%, PBS (*phosphate buffer saline*), gel agarosa 1,5% yang mengandung 0,5 mg/L ethidium bromide, buffer elektroforesis Tris acetic acid-EDTA (242 g Tris Base, 57 mL acetic acid, dan 100 mL dari 0,5 mol/L EDTA, pH 8,0), EtBr (*ethidium bromide*), *loading dye*, PCR master mix (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1% gelatin), deoksinukleotida trifosfat (dNTP) yaitu dATP, dGTP, dTTP, dCTP, *Taq* DNA polimerase, dua jenis primer yang secara spesifik mengamplifikasi gen *rfbE* sebesar 239 bp yaitu: F: 5' - GTGCTTTTGATATTTTTCCGAGTACATTGG - 3' R: 5' - TTTATATCACGAAAACGTGAAATTGCTGAT - 3' (Morin, *et al.* 2004), dan *marker* (DNA/HindIII).

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Tahap Persiapan

3.5.1.1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Bahan, alat, dan media yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C tekanan 1 atm.

3.5.1.2. Pengambilan Sampel

Tangan disterilkan terlebih dahulu menggunakan alkohol 70%. Sebanyak 500 mL susu sapi perah yang berasal dari ambing sapi di 15 peternakan dimasukkan ke dalam plastik steril kemudian ditali karet. Sampel yang telah didapat dimasukkan ke dalam *ice box* yang diberi es dan segera dibawa ke laboratorium untuk dilakukan uji secara mikrobiologi.

3.5.1.3. Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini ada 4 macam media yang terdiri dari medium LB (*Lactose Broth*), medium NA (Nutrient agar), medium EMB agar (*Eosin Methylen Blue agar*), medium selektif diferensial *Mac Conkey* agar dengan Sorbitol, dan medium LB (Luria bertani) dimana masing-masing media ditimbang sesuai kebutuhan (gram) kemudian ditambahkan akuades steril sesuai kebutuhan (mL) dan dilakukan sterilisasi (**Lampiran 2**).

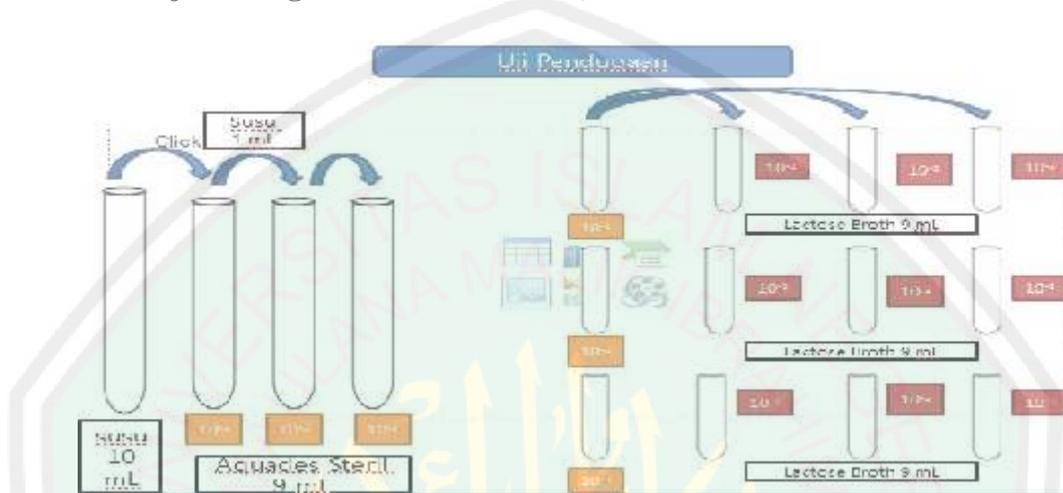
3.5.2. Tahap Pemeriksaan Sampel

3.5.2.1. Uji pH Sampel Susu

Sampel dalam plastik steril kemudian dipindahkan ke dalam botol steril dan dilakukan uji pH menggunakan indikator pH dengan cara dimasukkan

indikator pH ke dalam sampel, ditunggu sekitar kurang lebih 10 detik, setelah itu dicocokkan dengan tebel warna untuk indikator pH.

3.5.2.2. Uji Pendugaan (*Persumptive Test*)



Gambar 3.1 Uji Pendugaan

Akuades steril disiapkan untuk pengenceran 15 sampel dengan membuat pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . 9 tabung reaksi disiapkan yang mana 9 tabung tersebut berisi 9 ml Laktosa Broth (LB) dan 3 botol flakon steril berisi akuades steril. 15 sampel susu dari plastik steril dipindahkan ke dalam botol kultur. 1 ml dari sampel dimasukkan ke dalam tabung pertama (isi akuades steril), kemudian kocoknya sampai homogen, hingga konsentrasi larutan dalam tabung pertama menjadi 10^{-1} . Diambil sampel dari tabung pertama sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung kedua, dikocok sampai homogen, hingga konsentrasi larutan didalam tabung kedua menjadi 10^{-2} , begitu seterusnya sampai jumlah pengenceran 10^{-3} . larutan dari tabung 10^{-1} , diambil sebanyak masing-masing 1 ml untuk 3 tabung (isi LB 9 ml) 10^{-1} , kemudian mengambil larutan dari tabung 10^{-2} , sebanyak masing-masing 1 ml untuk 3 tabung 10^{-2} , sampai pengenceran 10^{-3} . Sampel diinkubasi dengan suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 2×24 jam. Setelah 2×24 jam

dilihat hasilnya dengan menghitung jumlah tabung reaksi yang positif (ditandai dengan adanya gas pada tabung Durham atau kekeruhan yang menandakan sampel tercemar bakteri koliform).

3.5.2.3. Uji Konfirmasi (*Confirmed Test*)

Uji konfirmasi menggunakan medium *Eosin Methylene Blue* agar (EMB) yang merupakan salah satu media diferensial untuk *E. coli*. Sebanyak 1 ose dari biakan LB (*lactose broth*) yang positif koliform diinokulasikan ke media EMB dalam cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. *Escherichia coli* pada EMB diidentifikasi sebagai koloni dengan penampakan atau ciri-ciri koloni bulat, licin dengan warna hijau metalik, dan bintik hitam di tengahnya.

3.5.2.4. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan guna mengetahui bentuk koloni dari isolat yang diduga *E. coli* dengan menggunakan empat reagensia yaitu *crystal violet*, lugol atau *gram's iodine*, alkohol 96%, dan safranin. Koloni sebanyak 1 ose diinokulasikan di atas kaca objek kemudian ditetesi akuades steril dan dikeringkan di atas nyala api bunsen. Setelah itu ditetaskan *crystal violet* sebanyak 1 tetes dan diratakan, didiamkan selama 1 menit dan dibilas aquades. Selanjutnya ditetesi reagen iodine 1 tetes dan diratakan, didiamkan selama 1 menit dan dibilas dengan aquades. Lalu ditetaskan alkohol 96% didiamkan selama 30 detik dan dibilas aquades. Tahap terakhir ditetaskan safranin sebanyak 1 tetes, didiamkan selama 30 detik dan dibilas aquades. Pemeriksaan dan pengamatan koloni *Escherichia coli* di mikroskop dengan pembesaran 400x. Morfologi bakteri selanjutnya

didokumentasikan menggunakan aplikasi *Optilab* di komputer yang langsung terhubung dengan mikroskop pengamatan.

3.5.2.5. Inokulasi di Medium Selektif Diferensial *Mac Conkey* Agar dengan Sorbitol

Inokulasi 1 ose dari media EMB agar yang menunjukkan ciri-ciri koloni *E. coli* di media selektif dan diferensial khusus *E. coli* O157:H7 yaitu media *Mac Conkey* agar dengan Sorbitol. Perbedaan dapat dilihat melalui wana koloni dari isolat yang ada. Positif *E. coli* O157:H7 menunjukkan koloni yang tidak berwarna (*colourless*).

3.5.2.6. Pemurnian dan Sub kultur

Hasil inokulasi dari media selektif diferensial kemudian dimurnikan di medium NA (*Nutrient Agar*) cawan petri. 1 ose dari media selektif diferensial diinokulasikan dengan cara strike. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. setelah 1x24 jam diinkubasi, koloni *E. coli* akan tumbuh. Selanjutnya dilakukan subkultur dengan cara 1 ose dari medium NA cawan petri diinokulasikan di medium NA miring pada tabung reaksi dengan cara strike lalu diinkubasi selama 24 jam suhu 37 °C.

3.5.3. Tahap Uji Secara Molekuler

3.5.3.1. Persiapan Kultur Isolat *E. coli*

Isolat *E. coli* diremajakan dalam medium LB broth (luria bertani). Dua ose dari media NA miring dimasukkan ke dalam medium LB broth 30 mL kemudian diinkubasi dengan shaker-inkubator selama 24 jam suhu 37 °C.

3.5.3.2. Ekstraksi DNA atau Isolasi DNA

Ekstraksi DNA bakteri yang ada pada sampel susu menggunakan metode CTAB/NaCl. Kultur *E. coli* O157:H7 diambil sebanyak 2 mL dan dimasukkan tube (2 mL) selanjutnya disentrifugasi menggunakan ultrasentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 6 menit suhu 4 °C. Supernatan dibuang, pelet ditambahkan 567 µL buffer TE (Tris-EDTA), 30 µL SDS 10% dan 6 µL Proteinase-K 10 mM kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C. Setelah selesai diinkubasi, suspensi ditambahkan 100 µL NaCl 5 M dan larutan CTAB/NaCl sebanyak 80 µL yang kemudian diinkubasi lagi selama 10 menit pada suhu 65 °C. Suspensi tersebut ditambah C (Kloroform) : I (Isoamil) (24 : 1) sebanding dengan volume sampel (1 : 1). Hasilnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 4-5 menit. *Upper fase* dipindahkan kemudian ditambahkan P (Fenol) : C (Kloroform) : I (Isoamil) (25 : 24 : 1). Suspensi tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. *Upper fase* dipindahkan ke tube yang baru dan ditambahkan isopropanol dingin sebanyak 0,6 kali volume sampel serta ditambah 50 µL etanol 70% dingin. Sampel disentrifugasi dan pelet diresuspensi dengan 100 µL buffer TE, selanjutnya sampel disimpan pada suhu -20 °C, hingga dilakukan analisis lebih lanjut (Ausubel, *et al.*, 2003).

3.5.3.3. Kuantitas dan Kualitas DNA

Sampel DNA bakteri diukur secara kuantitatif menggunakan teknik spektrofotometri. Sampel DNA bakteri uji dihitung konsentrasi dan tingkat kemurniannya menggunakan spektrofotometer nanodrop. Sampel DNA diambil

sebanyak 1 μL . Setiap pergantian sampel uji, *pedestal* harus dibersihkan dengan akuades steril agar tidak terjadi *cross-contamination*, dan setiap pengambilan sampel DNA yang berbeda harus mengganti mikrotip (Thermoscientific, 2013).

Sampel DNA bakteri juga diuji secara semi kualitatif dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Sebelum dilakukan uji secara semi kualitatif, gel agarose dibuat terlebih dahulu dengan menimbang sebesar 0,4 gram agarose setelah itu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 40 mL TBE (Tris-Buffer-EDTA) 1X. Dimasukkan ke dalam *microwave* selama 30 detik dan dilihat hasilnya jika hasil suspensi agarose masih terlihat keruh dimasukkan lagi ke dalam *microwave* selama 1 menit sampai didapatkan hasil yang jernih. Gel agarose dituang dan dipadatkan sampai teksturnya memadat.

Gel agarose 1 % yang siap digunakan, dimasukkan ke dalam *chamber* elektroforesis dan ditambahkan buffer TBE 1X sampai gel terendam. Tahap selanjutnya adalah penambahan *loading dye* 0,7 μL , nuclease free water 2 μL dan sampel sebanyak 3 μL . Kemudian dimasukkan pada masing-masing sumuran, dan *running* dilakukan pada voltase 60 V selama 50 menit. Setelah selesai proses *running*, gel kemudian direndam selama 15 menit ke dalam EtBr (*Ethidium Bromida*), setelah 15 menit, dibilas dengan air dan dimasukkan ke dalam alat UV-*transiluminator* seri BioRAD molecular imager Gel DocTMXr imaging system untuk mengamati visualisasi hasil elektroforesis serta mendokumentasikan hasilnya. Parameter yang diamati meliputi ketebalan, kejelasan, dan *smear band* dari hasil isolasi DNA.

3.5.3.4. Amplifikasi DNA dengan PCR

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA target yaitu primer gen *rfbE* dengan ukuran produk PCR sebesar 239 bp dengan urutan basa sebagai berikut.

F: 5' - GTGCTTTTGATATTTTTCCGAGTACATTGG - 3'

R: 5' - TTTATATCACGAAAACGTGAAATTGCTGAT - 3'

Setiap tabung PCR mengandung 2 μ L nuclease free water, 5 uL master mix PCR, 0,5 μ L 10 μ M *forward primer* dan 0,5 μ L 10 μ M *reverse primer* untuk setengah reaksi PCR. Setelah itu, dilakukan amplifikasi dengan menggunakan mesin PCR (*Thermocycler*) (Hybaid, Ashford, UK) sebanyak 40 siklus setiap siklus terdiri dari predenaturasi 94 °C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 57 °C selama 1 menit 15 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 30 detik. Setelah itu dilakukan ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 24 jam.

3.5.3.5. Visualisasi Hasil PCR

Masing-masing 12 μ L produk amplifikasi diambil sebanyak 3 uL dicampur dengan 0,7 μ L larutan loading dye dan 2 uL *nuclease free water*. Setelah tercampur dengan baik, masing-masing dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 1,5% yang terendam dalam tanki yang berisi buffer Tris acetid acid-EDTA. Dimasukkan juga *marker* (DNA/ HindIII) ke dalam sumur gel agarosa untuk mengetahui ukuran DNA produk PCR, kemudian elektroforesis dijalankan selama 1 jam dengan tegangan konstan 75 volt. Setelah 1 jam, elektroforesis dihentikan dan gel diangkat untuk diamati di bawah sinar Ultra Violet (UV). Hasil

yang diperoleh berupa pola pita DNA (band DNA) yang menunjukkan jumlah dan pola yang berbeda.

3.5.4. Kontrol Positif

Kontrol positif dalam penelitian ini menggunakan isolat *E. coli* O157:H7 dari laboratorium mikrobiologi, Universitas Airlangga, diambil 2 ose dan dikultur pada medium Luria bertani (LB) sebanyak 30 mL. Selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA, amplifikasi DNA, dan elektroforesis sesuai dengan prosedur yang sama dengan ekstraksi, amplifikasi, elektroforesis isolat susu sapi perah.

3.6. Parameter

Parameter yang diamati berupa pH susu yang menggambarkan keberadaan mikroorganisme, hasil isolasi secara konvensional untuk mendeteksi keberadaan bakteri *E. coli* dan inokulasi di media selektif diferensial khusus *E. coli* O157:H7 yaitu media *MaC Conkey* agar dengan sorbitol, hasil dari isolasi DNA secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan elektroforesis dan spektrofotometer nanodrop serta hasil amplifikasi DNA target dari isolat susu sapi perah.

3.7. Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif kualitatif. Data disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Nilai Potensial Hidrogen (pH) Susu dan Hubungannya dengan Keberadaan Mikroorganisme di dalam Susu

Sampel susu sapi perah didapatkan dari 15 peternakan yang berbeda dan dipilih secara acak dari 2 Desa yang ada di kecamatan Dau dan Pujon, Batu, Jawa Timur. Sembilan sampel didapatkan dari Desa Petungsewu, Kecamatan Dau dan enam sampel didapatkan dari Desa Pujon Kulon, Kecamatan Pujon. **Tabel 4.1** berikut ini merupakan nomor sampel susu sapi perah yang didapat dari 15 peternakan dan pemilik peternakan yang berbeda-beda.

Tabel 4.1. Nomor sampel susu dan lokasi peternakan

Peternak	Nomor Sampel Susu	Lokasi Peternakan
Peternak A	1	Desa Petungsewu
Peternak B	2	Desa Petungsewu
Peternak C	3	Desa Petungsewu
Peternak D	4	Desa Petungsewu
Peternak E	5	Desa Petungsewu
Peternak F	6	Desa Petungsewu
Peternak G	7	Desa Petungsewu
Peternak H	8	Desa Petungsewu
Peternak I	9	Desa Petungsewu
Peternak J	10	Desa Pujon Kulon
Peternak K	11	Desa Pujon Kulon
Peternak L	12	Desa Pujon Kulon
Peternak M	13	Desa Pujon Kulon
Peternak N	14	Desa Pujon Kulon
Peternak O	15	Desa Pujon Kulon

pH adalah parameter yang berfungsi untuk menggambarkan keberadaan atom hidrogen bebas yang berada dalam bahan pangan (Supardi, 1999). Nilai pH

dalam suatu sampel makanan ataupun minuman merupakan hal yang penting untuk diketahui karena dari nilai pH tersebut berkaitan dengan keberadaan mikroorganisme. Hal tersebut didukung oleh pernyataan Buckle (2009) dimana pH menjadi salah satu faktor ekstrinsik yang dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme. Setiap mikroorganisme memiliki pH optimum dimana pertumbuhan mikroorganisme itu optimal. Umumnya mikroorganisme tumbuh pada pH sekitar 6,0-8,0 dan hanya jenis mikroorganisme tertentu yang ditemukan pada bahan pangan yang mempunyai nilai pH rendah. Adapun contoh bakteri yang bersifat toleran terhadap pH rendah (kondisi asam) misalnya *Lactobacilli*, *Acetobacter*, dan *Sarcina ventriculi*.

Parameter pertama di dalam penelitian ini berkaitan dengan nilai potensial hidrogen (pH) dari 15 sampel susu sapi perah yang diambil dari 15 peternak yang berbeda-beda. Kepentingan pH di dalam penelitian ini sebagai indikator untuk menggambarkan kemungkinan jenis mikroorganisme yang dapat berpotensi mencemari sampel. Adapun nilai pH dari 15 sampel susu sapi perah disajikan dalam **tabel 4.2** berikut ini.

Tabel 4.2. Nilai pH ke-15 sampel susu sapi perah

Nilai pH	Total Sampel	Jumlah Sampel sesuai nilai PH	Persentase nilai pH dari 15 Sampel	Nomor Sampel Susu Ke-
4	15	2	13,33 %	4, 11
6		3	20 %	3, 8, 10
7		10	66,67 %	1, 2, 5, 6, 7, 9, 12, 13, 14, 15

Berdasarkan pengukuran nilai pH susu sapi perah (**tabel 4.2**) didapatkan hasil bahwa terlihat adanya variasi pH dari 15 sampel dengan kisaran nilai pH yaitu 4, 6, dan 7. Nilai pH sebesar 7 merupakan nilai pH yang paling banyak dari 15 sampel dengan persentase 66,67%. Kemudian nilai pH sebesar 6 termasuk nilai pH yang sedikit lebih banyak dari 15 sampel dengan persentase 20%. Sedangkan nilai pH sebesar 4 merupakan nilai pH yang paling sedikit dari 15 sampel dengan persentase 13,33%. Nilai pH sebesar 7 termasuk dalam kategori pH netral artinya sampel tidak dalam kondisi asam maupun basa sedangkan nilai pH di bawah 7 termasuk kategori pH asam dan nilai pH di atas 7 termasuk kategori pH basa.

Nilai pH netral dalam bahan pangan merupakan syarat yang diharapkan agar bahan pangan tersebut dapat diproses ke tahap berikutnya. Nilai pH yang didapatkan dari 15 sampel dalam penelitian ini ada yang sesuai menurut Standar Nasional Indonesia (SNI) tahun 2011 mengatakan bahwa susu segar yang normal memiliki standar nilai pH berkisar antara 6,3-7 yaitu nomor sampel susu ke 1, 2, 5, 6, 7, 9, 12, 13, 14, dan 15. Umumnya bakteri dapat tumbuh dengan baik dalam medium yang memiliki pH netral (pH 7) atau pH yang sedikit basa (pH 7,4) (Volk dan Wheeler, 1993).

Namun pada kenyataannya dalam penelitian ini ada 5 sampel susu segar yang memiliki nilai pH dibawah nilai pH standar SNI yaitu 6 dan 4. Menurut Volk dan Wheeler (1993) mengatakan bahwa beberapa bakteri dapat tumbuh pada nilai pH 6 dan sangat jarang mikroorganisme yang dapat bertahan dengan baik pada pH 4 (Volk dan Wheeler, 1993). Tiga sampel memiliki nilai pH 6 yang termasuk dalam kategori pH sedikit asam, pada pH ini dimungkinkan masih terdapat bakteri

dari kelompok bakteri tertentu yang tumbuh mengkontaminasi sampel susu tersebut. Menurut Hardiningsih (2006) kelompok bakteri asam laktat memiliki kemampuan untuk tumbuh pada pH optimum dengan kondisi pH yang sedikit asam yaitu 6 - 6,5.

Disamping itu, selain 3 sampel yang memiliki nilai pH yang sedikit asam, terdapat 2 sampel susu yang nilai pH nya termasuk kategori pH asam yaitu sampel susu nomor 4 dan 11. Hal ini terjadi kemungkinan karena bakteri memiliki kemampuan dapat menurunkan nilai pH. Menurut Sughita dan Djalil (1989), terjadinya penurunan pH disebabkan oleh hasil konversi dari laktosa menjadi asam laktat oleh mikroorganisme. Selain kelompok bakteri asam laktat yang memiliki kemampuan memfermentasikan laktosa, kelompok bakteri *Enterobacter* seperti *E. coli* juga memiliki kemampuan tersebut. Semakin banyak jumlah bakteri dalam susu, maka hasil aktifitas dari bakteri akan semakin banyak. Mustajib (2010) juga menambahkan bahwa pH susu sapi perah dibawah 6 menandakan bahwa penanganan susu tidak higienis sehingga terjadi peningkatan kontaminasi bakteri pemecah laktosa.

Nilai pH erat kaitannya dengan aktivitas enzim karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus asam amino pada struktur enzim mudah dipengaruhi oleh pH (Meryandini, *et al.*, 2009). Gugus -amino dan -karboksil pada asam amino bertindak sebagai grup asam basa dalam mendonorkan atau menerima proton. Nilai pH yang rendah menyebabkan kedua gugus tersebut terprotonasi dengan sempurna. Sebaliknya kenaikan pH menyebabkan gugus karboksil kehilangan ion hidrogennya disusul gugus amino (Sari, 2010). Mekanisme kerja enzim

didasarkan pada katalisis asam-basa sehingga residu asam amino harus berada pada kondisi protonasi yang sesuai untuk kelangsungan reaksi enzimatik (Murray, *et al.* 2003). Enzim dibutuhkan untuk mengkatalis setiap reaksi metabolisme. Menurut Lehninger (1982), aktivitas katalitik enzim di dalam sel mungkin diatur sebagian oleh perubahan pada medium lingkungan. Struktur 3 dimensi enzim mulai berubah pada kondisi di luar pH optimum, sehingga substrat tidak lagi berada pada posisi yang tepat pada bagian molekul enzim dan menyebabkan proses katalisis tidak berjalan optimum akibatnya aktivitas enzim berkurang (Sadikin, 2002).

Pada pH optimum struktur 3 dimensi enzim paling kondusif untuk mengikat substrat. Bila konsentrasi ion hidrogen berubah dari konsentrasi optimal, maka aktivitas enzim secara progresif hilang sampai akhirnya enzim menjadi tidak fungsional. Berdasarkan nilai pH optimum, menurut Waluyo (2005) bakteri dikelompokkan menjadi 3, bakteri asidofil yang dapat hidup pada pH optimum 2-5 misalnya bakteri *Thiobacillus thiooxidans* dan bakteri BAL (bakteri asam laktat), bakteri mesofil (neutrofil) seperti *Escherichia coli* yang dapat hidup pada pH 6,5-7,5, dan bakteri alkalifil yang dapat hidup pada pH 8,4-9,5 seperti bakteri *Nitrosomonas spp.*

Setiap bakteri memiliki kemampuan untuk dapat hidup dan tumbuh dalam kondisi pH (optimum) yang mendukung pertumbuhannya. *Escherichia coli* misalnya, bakteri tersebut termasuk kelompok bakteri mesofil (neutrofil). Menurut Waluyo (2005) mengatakan bahwa pH optimum untuk pertumbuhan *Escherichia coli* adalah 7,0 – 7,5. *Escherichia coli* termasuk salah satu bakteri yang memiliki

toleransi yang cukup luas terhadap nilai pH. Di dalam genus *Escherichia*, spesies *Escherichia coli* secara nyata lebih toleran terhadap asam dibandingkan spesies dari genus *Escherichia* lainnya (Breidt, *et al.*, 2004). Hal tersebut terbukti menurut penelitian yang dilakukan oleh Breidt, *et al.* (2004), bahwa terdapat kasus cemaran bakteri *Escherichia coli* pada produk makanan cuka apel. Selain mengontaminasi asam cuka, Arocha (1992) menjelaskan bahwa bakteri *Escherichia coli* juga dapat tumbuh pada produk olahan susu fermentasi. Hal tersebut memperlihatkan kemampuan *Escherichia coli* dalam beradaptasi pada kondisi lingkungan asam karena memiliki kemampuan dalam memfermentasikan laktosa pada sampel susu. Jadi tidak hanya kelompok BAL yang dapat memfermentasikan laktosa tapi spesies *Escherichia coli* juga memiliki kemampuan tersebut.

Bakteri *E. coli* O157:H7 adalah salah satu strain patogen dari spesies *E. coli* yang menyebabkan beberapa manifestasi klinis yang berat. Bakteri tersebut memiliki toleransi asam yang luas, bila dibandingkan dengan bakteri patogen lainnya. Bakteri patogen *Escherichia coli* O157:H7 dapat tumbuh pada pH dengan rentang 4,4 sampai 9 dan dapat bertahan di dalam makanan dengan rentang nilai pH 3,5-5,5 (Zhao, *et al.*, 1994). Kemampuan bakteri bertahan pada pH asam tentunya berbeda-beda sesuai jenis bakteri. Menurut Price (2004) melaporkan bahwa ada 3 mekanisme ketahanan atau resistensi *Escherichia coli* terhadap asam atau yang lebih dikenal dengan *acid resistance (AR) system*. Ketiga sistem AR ini meliputi sistem *AR dependent*, sistem *AR glutamate dependent*, dan sistem *arginine dependent*. Tiga sistem AR ini semuanya hanya diekspresikan oleh sel

bakteri pada tahap stasioner, sel *Escherichia coli* dapat menggunakan mekanisme resistensi asam tersebut secara tunggal atau kombinasi sesuai dengan kondisi lingkungan asam yang ada.

Berdasarkan penjelasan di atas, Allah SWT memberikan jaminan kehidupan pada setiap makhluknya, termasuk bakteri. Allah SWT telah menyiapkan segala kebutuhan makhluknya guna menunjang aktivitas di dalam kehidupan mereka. Kebutuhan yang dibutuhkan oleh setiap makhluk hidup tidak hanya berkaitan dengan asupan nutrisi yang dibutuhkan oleh setiap makhluk hidup tetapi juga kondisi lingkungan guna mendukung pertumbuhannya. Seperti firman Allah SWT dalam al-Quran surat al-Hijr (15) ; 20.

وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعَايِشَ وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ بِرَازِقِينَ

Artinya :

“dan Kami telah menjadikan untukmu di bumi keperluan-keperluan hidup, dan kami menciptakan pula makhluk yang kamu sekali-kali bukan pemberi rezeki kepadanya”

Berdasarkan ayat di atas, lafad *مَعَايِشَ* yang berarti keperluan-keperluan hidup (Shihab, 2002). Allah SWT menganugerahkan segala macam sarana guna mendukung aktifitas makhluk hidup (Jamaluddin, 2010). Sarana yang dimaksud di dalam ayat tersebut pengertiannya sangat umum, jika dikaitkan dengan nilai pH, maka nilai pH merupakan sarana dalam artian kondisi lingkungan secara eksternal yang dibutuhkan oleh mikroorganisme. Tidak hanya nilai pH, tetapi Allah SWT juga melengkapi keperluan dari setiap organisme melalui mekanisme ketahanan atau resistensi untuk menanggapi respon lingkungan sehingga bakteri tersebut dapat beradaptasi dengan lingkungannya.

4.2. Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* O157:H7

Selain potensial hidrogen (pH) yang menjadi parameter pengamatan, parameter kedua dari penelitian ini terkait dengan hasil deteksi bakteri *Escherichia coli* O157:H7 melalui beberapa tahap uji. Pertama uji pendugaan menggunakan media *Lactosa Broth* (LB), dilanjutkan uji penegasan menggunakan media diferensial *Eosyn Methylene Blue* agar (EMB agar), pengecatan Gram, dan untuk mendeteksi keberadaan bakteri *E. coli* O157:H7 menggunakan media selektif diferensial *Mac Conkey* agar dengan sorbitol.

4.2.1. Hasil Uji Pendugaan *Most Probable Number* (MPN) Koliform, Uji Penegasan di media *Eosyn Methylene Blue* Agar (EMB Agar) dan Pengecatan Gram

Sampel susu sapi perah yang didapatkan dari 15 peternak yang berbeda-beda kemudian diuji menggunakan *most probable number* (MPN) dengan seri 3 tabung pengenceran. Menurut Arthur (2009) prinsip utama metode MPN adalah mengencerkan sampel sampai tingkat tertentu sehingga didapatkan mikroorganisme yang sesuai dengan mengamati adanya reaksi fermentasi dan pembentukan gas di dalam tabung durham. Tahap pertama yang dilakukan untuk mendeteksi bakteri koliform melalui uji pendugaan menggunakan media berupa *lactose broth*. Menurut Raharja (2015) *lactose broth* mengandung pepton dan ekstrak daging yang menyediakan nutrisi penting untuk metabolisme bakteri. Laktosa yang terkandung di dalam media LB juga menyediakan sumber karbohidrat yang dapat difermentasi oleh bakteri koliform. Adapun hasil yang

didapat dari uji pendugaan kemudian dicocokkan dengan tabel MPN seri 3 tabung yang akan dipaparkan sebagai berikut.

Tabel 4.3. Hasil uji MPN koliform

Nomor Sampel Susu Ke-	MPN Seri 3 Tabung			MPN (cfu/mL)
	3x10 mL	3x1 mL	3x0,1 mL	
1	3	3	3	>2400
2	3	3	3	>2400
3	3	3	3	>2400
4	3	3	3	>2400
5	0	0	0	4 *
6	3	3	2	1100
7	2	2	1	29
8	3	3	2	1100
9	3	3	2	1100
10	3	3	0	240
11	2	2	1	29
12	3	3	2	1100
13	2	2	1	29
14	3	3	2	1100
15	2	2	1	29

Keterangan :

* = Memenuhi syarat SNI

Berdasarkan hasil perhitungan MPN koliform dari 15 sampel susu sapi perah (**tabel 4.3**) menunjukkan jumlah koliform dari setiap peternak bervariasi yaitu berkisar antara 4 sampai dengan >2400 cfu/mL. Sebanyak 14 dari 15 sampel (93,33%) susu sapi perah tercemar bakteri koliform yang melebihi batas ketentuan yang ditetapkan oleh SNI untuk syarat mutu susu segar SNI 01-3141-1998 dan SNI No. 7388-2009 terkait keberadaan bakteri koliform sebanyak 20 cfu/mL. Hanya 1 dari 15 sampel (6,67 %) yang memenuhi SNI yaitu nomor sampel susu ke-5 dengan jumlah koliform sebanyak 4 cfu/mL.

Menurut Fardiaz (1993), bakteri koliform merupakan kelompok bakteri yang digunakan sebagai indikator untuk melihat tingkat sanitasi dari lingkungan

maupun kebersihan ternak. Adanya bakteri koliform di dalam minuman atau makanan menunjukkan bahwa ada satu atau lebih tahap pengolahan minuman atau makanan mengalami kontak dengan feses yang berasal dari usus manusia atau hewan berdarah panas. Bakteri koliform di dalam sampel makanan atau minuman mengindikasikan adanya bakteri yang bersifat enteropatogenik atau toksigenik yang berbahaya bagi kesehatan (Suprihatin, 2003). Koliform dibedakan menjadi 2 tipe yaitu *fecal* dan *non fecal* koliform, tipe *non fekal* koliform biasa ditemukan pada hewan dan tanaman yang telah mati contoh bakterinya seperti genus *Enterobacter* dan *Klebsiella*. Adapun tipe fekal koliform merupakan kelompok bakteri dari kotoran manusia dan hewan seperti spesies *Escherichia coli* (Entjang, 2003).

Berdasarkan data yang telah didapat, 4 dari 15 sampel (26,67%) susu sapi perah memiliki jumlah MPN koliform yang banyak yaitu >2400 cfu/mL. Suprihatin (2003) mengatakan bahwa semakin tinggi tingkat kontaminasi bakteri koliform, semakin tinggi pula resiko kehadiran bakteri patogen lainnya. Selain itu, banyak atau sedikitnya jumlah MPN koliform juga menggambarkan kualitas suatu produk makanan atau minuman. Pracoyo (2006) menambahkan bahwa jika semakin sedikit kandungan bakteri koliform pada sampel makanan atau minuman, maka semakin baik kualitasnya. Sebaliknya, jika semakin banyak jumlah bakteri koliform dalam sampel makanan atau minuman, maka semakin buruk kualitas makanan atau minuman tersebut.

Selain Jumlah MPN yang paling banyak atau melebihi standar dari ketentuan bakteri koliform yang ada pada susu segar, juga ada sampel yang

jumlah MPN koliform hampir mendekati batas standar SNI jumlah koliform yang diperbolehkan pada sampel makanan atau minuman yaitu nomor sampel susu ke 7, 11, dan, 15 dengan jumlah koliform sebesar 29 cfu/mL. Menurut Suwito (2012) jumlah koliform berhubungan dengan tingkat sanitasi dan manajemen pemerahan susu. Jika hasil yang didapat dari penelitian ini, jumlah MPN ada yang mendekati standar yang ditentukan SNI maka hal tersebut berkaitan dengan manajemen lingkungan peternakan dan proses pemerahan yang sudah cukup baik.

Kandungan bakteri di dalam susu dipengaruhi oleh dua faktor yaitu faktor internal dan eksternal. Faktor internal antara lain ambing dan puting susu, sedangkan faktor eksternal berupa kebersihan dari lingkungan sekitar. Secara normal dalam saluran ambing sapi terdapat beberapa bakteri seperti *Micrococcus*, *Streptococcus* dan *Lactobacillus* (Jay, 2000). Pada saat pemerahan susu, pengangkutan, penyimpanan, dan saat pengolahan susu dapat terkontaminasi oleh berbagai macam mikroorganisme. Sumber kontaminasi susu tersebut berasal dari kotoran dan urin sapi, peralatan untuk menampung atau menyimpan susu, kandang dan berbagai insekta di lingkungan peternakan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Elmoslemany (2009) dalam Suwito (2012) bahwa kebersihan dari ambing dan puting sapi, pencucian sebelum pemerahan dan kebersihan tempat menampung susu berperan penting dalam menentukan kualitas susu secara mikrobiologi.

Pemeriksaan kualitas susu dari segi mikrobiologi adalah salah satu parameter dari beberapa parameter uji kelayakan suatu makanan. Makanan atau minuman sebelum dikonsumsi oleh konsumen tentunya harus melewati

serangkaian uji terutama yang berkaitan dengan makanan yang dapat menyebabkan timbulnya penyakit akibat mengonsumsi makanan atau minuman yang tercemar bakteri patogen. Hal yang berkaitan dengan uji suatu makanan sebenarnya sudah tersirat dalam Al-Quran surat Abasa (80) : 24.

فَلْيَنْظُرِ الْإِنْسَانُ إِلَى طَعَامِهِ

Artinya :

“Maka hendaklah manusia itu memperhatikan makanannya”

Menurut Faqih (2006), makna dari lafadz ينظر bukan hanya melihat secara sederhana, tetapi bermakna memperhatikan secara mendalam dan merenungkan masalah-masalah terpenting dari susunan makanan, serta hubungannya dengan terjaganya tubuh dari kerusakan. Sebagian mufasir menjelaskan bahwa ayat tersebut memerintahkan manusia agar melihat bagaimana makanan dipersiapkan; berbahaya bagi kesehatan atau aman untuk dimakan. Melalui ayat tersebut, perintah untuk memperhatikan makanan dapat dilakukan dari berbagai uji kelayakan makanan atau minuman terutama yang berkaitan dengan kualitas secara mikrobiologi. Hal tersebut bermanfaat untuk menelusuri kontaminasi oleh bakteri patogen serta mengetahui peran lingkungan dalam hadirnya kontaminasi tersebut.

Langkah berikutnya untuk menentukan tipe bakteri koliform dengan melakukan uji penegasan menggunakan media diferensial *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB agar). Media EMB agar mengandung *eosin* dan *methylene blue* yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan mendukung pertumbuhan bakteri Gram negatif. Sampel yang memberikan hasil positif pada uji pendugaan dan melebihi batas standar jumlah koliform menurut SNI sebanyak

14 sampel kemudian diinokulasikan pada media EMB agar dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Adapun jenis bakteri koliform yang tumbuh pada media tersebut dipaparkan pada **tabel 4.4** sebagai berikut.

Tabel 4.4. Hasil Uji Penegasan pada EMB Agar

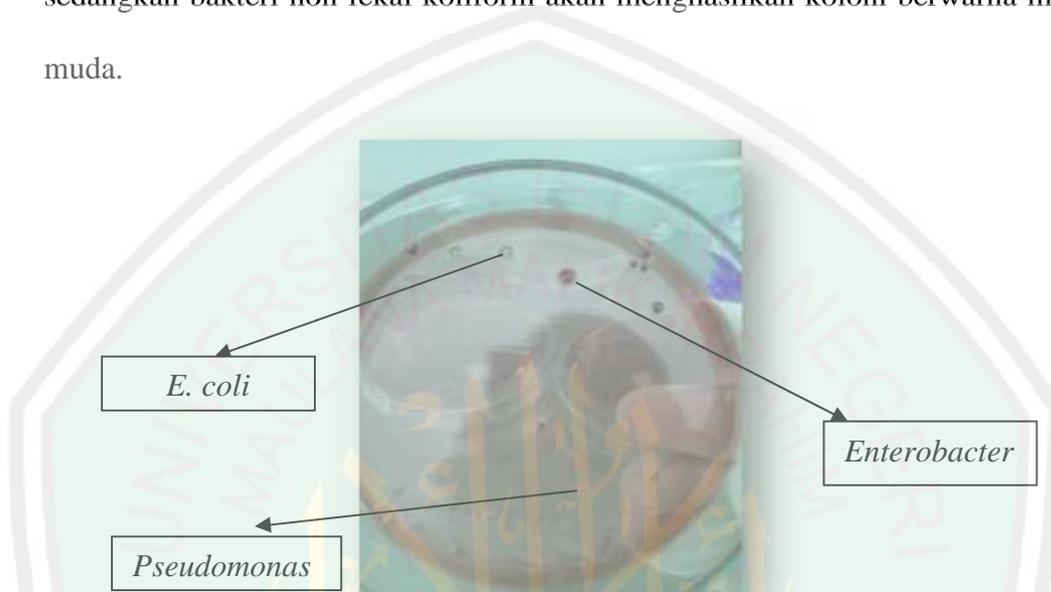
Nomor Sampel Susu Ke-	Koloni pada EMB agar	Keterangan	Lokasi Peternakan
1	Koloni dengan kilap hijau metalik	<i>E. coli</i>	Desa Petungsewu
	Koloni berwarna ungu kehitaman	<i>Lactose fermenter bacteria</i>	
2	Koloni berwarna ungu kehitaman	<i>Lactose fermenter bacteria</i>	Desa Petungsewu
3	Koloni berwarna ungu kehitaman	<i>Lactose fermenter bacteria</i>	Desa Petungsewu
	Koloni berwarna pink	<i>Lactose fermenter bacteria</i>	
4	Koloni dengan kilap hijau metalik	<i>E. coli</i>	Desa Petungsewu
	Koloni berwarna ungu kehitaman	<i>Lactose fermenter bacteria</i>	
	Koloni berwarna pink	<i>Lactose fermenter bacteria</i>	
5	Tidak dilakukan inokulasi	Tidak dilakukan inokulasi	Desa Petungsewu
6	Koloni dengan kilap hijau metalik	<i>E. coli</i>	Desa Petungsewu
7	Koloni berwarna pink	<i>Lactose fermenter bacteria</i>	Desa Petungsewu
8	Koloni dengan kilap hijau metalik	<i>E. coli</i>	Desa Petungsewu
9	Koloni berwarna pink	<i>Lactose fermenter bacteria</i>	Desa Petungsewu
10	Koloni berwarna pink keunguan	<i>Lactose fermenter bacteria</i>	Desa Pujon Kulon
11	Koloni dengan kilap hijau metalik	<i>E. coli</i>	Desa Pujon Kulon
	Koloni berwarna pink	<i>Lactose fermenter bacteria</i>	
12	Koloni berwarna pink dan mukoid	<i>Lactose fermenter bacteria</i>	Desa Pujon Kulon

13	Koloni berwarna ungu kehitaman	<i>Lactose fermenter bacteria</i>	Desa Pujon Kulon
14	Koloni berwarna ungu kehitaman	<i>Lactose fermenter bacteria</i>	Desa Pujon Kulon
	Koloni berwarna pink keunguan	<i>Lactose fermenter bacteria</i>	
15	Koloni dengan kilap hijau metalik	<i>E. coli</i>	Desa Pujon Kulon
	Koloni berwarna pink dan mukoid	<i>Lactose fermenter bacteria</i>	

Berdasarkan data (**tabel 4.4**) hasil uji penegasan di media EMB agar dari 14 sampel susu sapi perah yang telah melalui tahap uji MPN dan positif koliform menunjukkan variasi warna koloni. Media EMB agar bersifat selektif dalam menumbuhkan koliform fekal dan non fekal karena media ini mengandung indikator eosin Y yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan hanya dapat menumbuhkan bakteri Gram negatif (Maksum, *et al.*, 2008). Jadi keseluruhan bakteri yang didapat dan tumbuh di media EMB agar dalam penelitian ini adalah kelompok bakteri Gram negatif.

Selain itu, media EMB agar juga mengandung *methylene blue* yang dapat digunakan sebagai indikator untuk membedakan bakteri yang dapat memfermentasikan laktosa atau tidak (Horvarth, 1974). Ada 2 jenis bakteri yang telah didapat, keduanya termasuk kelompok koliform dilihat dari kenampakannya di media EMB agar menunjukkan kemampuan memfermentasikan laktosa dan menghasilkan produk asam selama fermentasi dengan menunjukkan perbedaan warna koloni (**gambar 4.1**). Menurut Horvarth (1974) mengatakan bahwa bakteri *E. coli* dan *Enterobacter* dapat mereduksi pH media dan menunjukkan koloni yang berwarna sebagai indikator kedua bakteri tersebut mampu

memfermentasikan laktosa. Warna koloni untuk bakteri fekal koliform seperti *E. coli* pada media EMB agar adalah hijau metalik dan bintik hitam di tengahnya, sedangkan bakteri non fekal koliform akan menghasilkan koloni berwarna merah muda.



Gambar 4.1. Koloni bakteri koliform di media EMB agar
(Sumber : Penelitian Pribadi)

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sampel susu sapi perah telah terkontaminasi oleh 3 jenis bakteri yang berbeda yaitu *E. coli* yang termasuk tipe fekal koliform (Raharja, 2015), bakteri *Pseudomonas* dan *Enterobacter* yang termasuk tipe non fekal koliform. Jenis bakteri yang mengontaminasi pada setiap sampel berbeda-beda, dalam 1 sampel susu sapi perah ada yang terkontaminasi mulai dari 1 jenis bakteri sampai 3 jenis bakteri. Perbedaan jenis bakteri yang mengontaminasi sampel juga berhubungan dengan nilai pH. Ternyata nomor sampel susu ke-4 dan 11 yang termasuk kategori pH asam tercemar oleh bakteri *E. coli*, *Pseudomonas*, dan *Enterobacter*. Kemampuan memfermentasikan laktosa tidak hanya dapat dilakukan oleh kelompok bakteri asam laktat (BAL) tetapi kelompok bakteri Gram negatif seperti ketiga jenis bakteri yang mengontaminasi

sampel juga memiliki kemampuan tersebut. Kehadiran bakteri koliform dan *E. coli* pada susu sapi segar dapat menimbulkan gangguan kesehatan pada manusia, dan juga dapat dijadikan sebagai indikator adanya pencemaran susu oleh feses manusia maupun hewan (Supardi dan Sukamto, 1999).

Bakteri yang terdapat dalam susu segar dapat berasal dari sapi yang menderita mastitis subklinis atau klinis, lingkungan kandang terutama sumber air dan peralatan yang digunakan untuk menyimpan susu selama pendistribusian. Resiko susu terkontaminasi oleh bakteri patogenik akan lebih besar jika susu diproses oleh peternak sendiri. Penundaan waktu proses pemerahan dan rendahnya kondisi *hygiene* menyebabkan pertumbuhan mikroorganisme menjadi cepat. Kondisi tersebut juga memudahkan bakteri patogenik untuk tumbuh dalam media pemerahan (Lingathurai, 2010). Cempirkova (2006) menyebutkan bahwa 64% mikroorganisme dalam susu berasal dari *hygiene* yang buruk, 28% oleh temperatur yang rendah dan penyimpanan yang tidak baik, serta 8% oleh penyakit mastitis.

Bakteri *E. coli* merupakan bakteri patogen yang tidak boleh ada di dalam susu. Namun berdasarkan hasil penelitian yang didapat ada sekitar 6 dari 15 sampel (40%) susu sapi perah yang terkontaminasi oleh bakteri *E. coli*. Enam sampel susu sapi perah yang terkontaminasi bakteri *E. coli* berasal dari lokasi yang berbeda-beda. Empat sampel susu sapi perah dengan nomor sampel 1, 4, 6, dan 8 berasal dari Desa Petungsewu sedangkan dua sampel dengan nomor sampel susu 11 dan 15 berasal dari Desa Pujon Kulon juga tercemar bakteri *E. coli*. Hal tersebut menunjukkan bahwa pentingnya deteksi bakteri *E. coli* pada tingkatan

peternak guna memperbaiki kualitas susu. Hal serupa juga terjadi pada penelitian milik Kusumaningsih (2013) sekitar 14 dari 34 sampel (41,18%) susu sapi perah yang berasal dari peternakan yang berbeda-beda juga tercemar bakteri *E. coli*. Penelitian milik Sartika, *et al.* (2005), 19 susu sapi perah, sekitar 14 sampel (73,68%) yang tercemar bakteri *E. coli*. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa bahan pangan asal ternak khususnya susu dalam hal ini perlu diperhatikan dari segi kualitas mikrobiologi karena melihat potensi bahan pangan asal ternak yang lebih besar tercemar bakteri koliform dan patogen toksigenik mengingat keberadaan bahan pangan asal ternak yang lebih dekat dengan sumber cemaran bakteri.

Koloni *E. coli* positif selanjutnya digoreskan ke medium EMB agar lagi yang bertujuan untuk mendapatkan koloni *E. coli* yang terpisah dari koloni lainnya (koloni tunggal). Koloni *E. coli* terlihat dengan bentuk koloni bundar dan berwarna hijau metalik dapat dilihat pada gambar (**gambar 4.2**) di bawah ini.

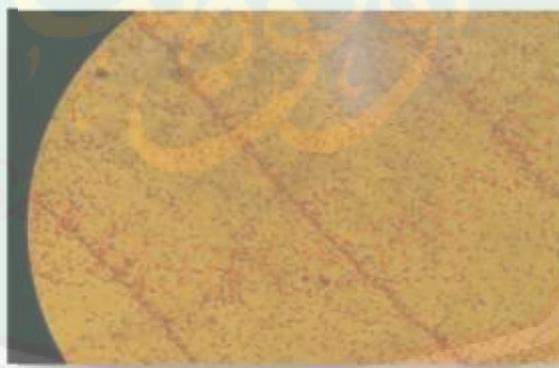


Gambar 4.2 Hasil goresan *E. coli* di medium EMB agar
(Sumber : Penelitian pribadi)

Hasil kultur murni yang menunjukkan ciri-ciri *E. coli*, kemudian dilanjutkan dengan pewarnaan Gram untuk melihat sifat Gram dan morfologi bakteri tersebut secara mikroskopis. Pewarnaan dilakukan pada keenam sampel yang tercemar bakteri *E. coli* pada **tabel 4.5** sebagai berikut.

Tabel 4.5. Hasil Pewarnaan Gram

Nomor Sampel Susu Ke-	Hasil Pewarnaan Gram
1	Gram negatif, batang (pendek)
4	Gram negatif, batang (pendek)
6	Gram negatif, batang (pendek)
8	Gram negatif, batang (pendek)
11	Gram negatif, batang (pendek)
15	Gram negatif, batang (pendek)



Gambar 4.3. Bakteri Gram negatif dengan pembesaran 40x
(Sumber : Penelitian Pribadi)

Berdasarkan hasil pewarnaan dari kultur murni *E. coli* di media EMB agar, dari keenam isolat *E. coli* yang didapat menunjukkan bahwa koloni *E. coli* secara mikroskopis berbentuk batang (pendek), lurus, tunggal atau membentuk rantai pendek (**gambar 4.3**). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Brooks, *et al.* (2004)

bahwa bakteri *E. coli* termasuk bakteri Gram negatif, berbentuk batang pendek, tidak membentuk spora, dan bersifat motil.

Isolat *E. coli* setelah dilakukan pewarnaan akan memperlihatkan warna dasarnya yaitu merah. Hal ini dikarenakan menurut Pratiwi (2008) bakteri Gram negatif memiliki kandungan lipopolisakarida yang tinggi pada lapisan dinding selnya. Pada tahap *decolorizing* menggunakan alkohol 95%, lapisan lipopolisakarida menjadi tidak berwarna. Ketika diberi pewarna safranin menghasilkan gambaran berwarna merah yang menunjukkan kelompok bakteri Gram negatif. Jadi kelompok bakteri Gram negatif memiliki kandungan lipopolisakarida (LPS). LPS merupakan faktor virulensi awal dalam mengawali terjadinya penyakit sepsis dan inflamasi. Adanya kandungan LPS pada bakteri Gram negatif menjadi salah satu ciri faktor virulensi yang umumnya dimiliki oleh bakteri patogen.

Menurut Pelczar dan Chan (2008) lipopolisakarida sering dikaitkan dengan pemicu penyakit seperti sepsis dan inflamasi. Menurut Giacometti, *et al.* (2002), LPS yang dihasilkan oleh bakteri Gram negatif seperti *E. coli* disebut endotoksin karena LPS tersebut erat melekat pada permukaan sel dan hanya dikeluarkan jika sel bakteri mengalami lisis. LPS tersusun atas rantai O-polisakarida, cincin gula, dan lipid A. LPS merupakan Gugus polisakarida dari lipopolisakarida yang disebut dengan antigen O-polisakardia berfungsi sebagai antigen spesifik yang dapat dimanfaatkan untuk membedakan spesies-spesies bakteri Gram negatif (Radji, 2010).

4.2.2. Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* O157:H7 Menggunakan Medium Selektif Diferensial *Mac Conkey* agar dengan Sorbitol

Juliantina, *et al.*, (2008) dalam Arista (2013) mengatakan bahwa *E. coli* adalah salah satu bakteri yang mempunyai tiga struktur antigen spesifik yang digunakan untuk membedakan serotipe dari *E. coli* yaitu antigen O (polisakarida), antigen K (kapsular), dan antigen H (flagella). *E. coli* O157:H7 termasuk spesies dari kelompok *Enterohemorrhagic E. coli* (EHEC) yang dapat menyebabkan penyakit yang bersumber dari makanan atau minuman. Melalui Identifikasi bakteri *E. coli* O157:H7 bertujuan untuk mendeteksi keberadaan bakteri tersebut pada sampel susu sapi perah. Media yang digunakan untuk mendeteksi *E. coli* O157:H7 menggunakan media *Mac Conkey* agar dengan sorbitol. Menurut March (1986) bahwa media *Mac Conkey* agar dengan sorbitol memiliki sensitivitas 100% dan spesifitas 85%. Perbedaan dari media yang lain bahwa terdapat kandungan sorbitol dalam media *Mac Conkey* agar dengan sorbitol. Kepentingan penambahan sorbitol dalam media *Mac Conkey* agar dengan sorbitol menurut Anggreini (2015) mengatakan bahwa *E. coli* O157:H7 tidak memiliki kemampuan memfermentasikan sorbitol dengan menunjukkan koloni yang tidak berwarna (*colourless*). Adapun hasil identifikasi bakteri *E. coli* O157:H7 dari 6 isolat *E. coli* yang didapat dipaparkan pada **tabel 4.6** sebagai berikut.

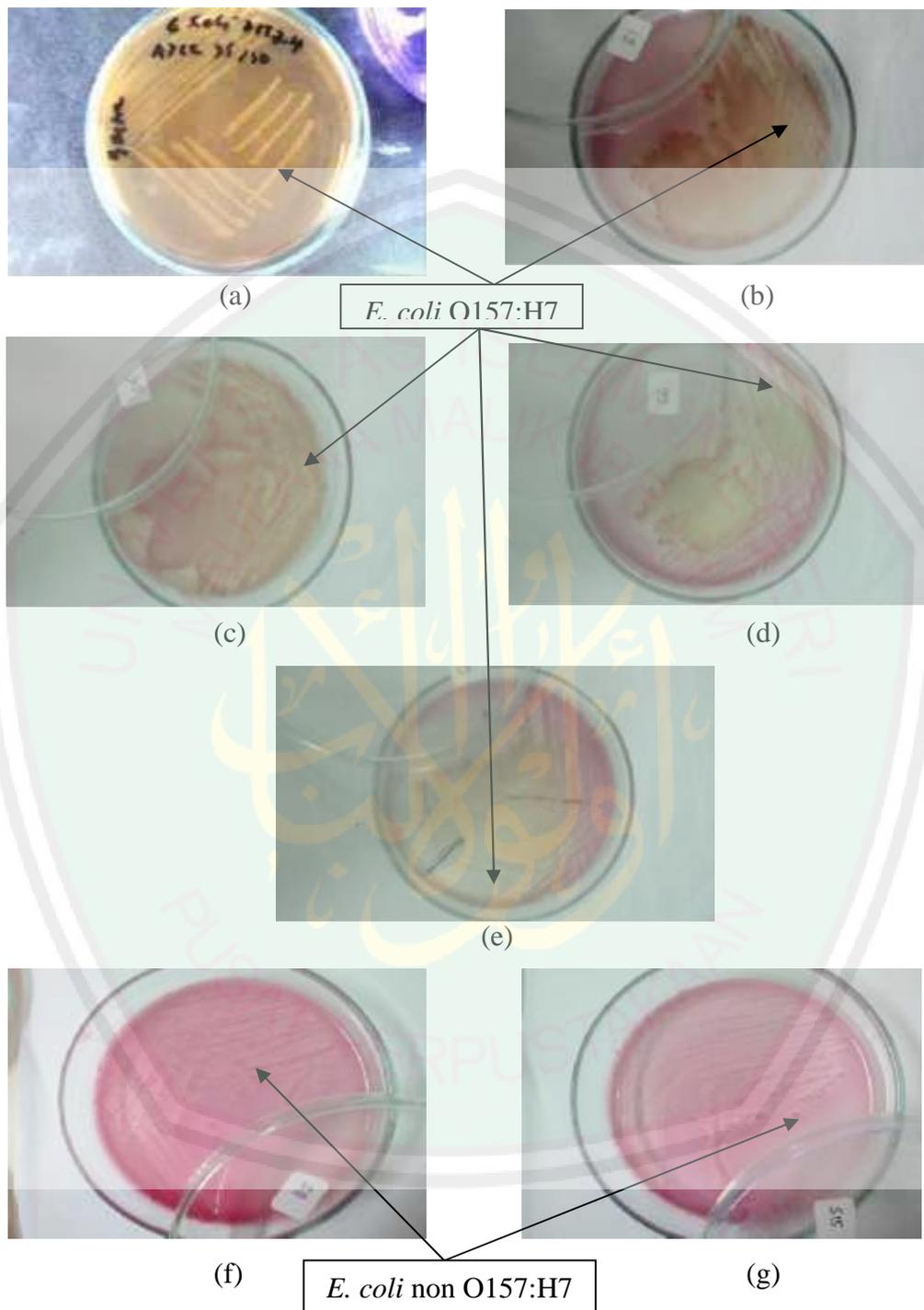
Tabel 4.6. Hasil identifikasi bakteri *E. coli* O157:H7

Nomor sampel susu ke-	Warna koloni pada media <i>Mac Conkey</i> agar dengan sorbitol	Keterangan	Lokasi Peternakan
1	Koloni tidak berwarna (<i>colourless</i>)	<i>E. coli</i> O157:H7	Desa Petungsewu
4	Koloni tidak berwarna (<i>colourless</i>)	<i>E. coli</i> O157:H7	Desa Petungsewu
6	Koloni tidak berwarna (<i>colourless</i>)	<i>E. coli</i> O157:H7	Desa Petungsewu
8	Koloni tidak berwarna (<i>colourless</i>)	<i>E. coli</i> O157:H7	Desa Petungsewu
11	Koloni berwarna merah	<i>E. coli</i> non-O157:H7	Desa Pujon Kulon
15	Koloni berwarna merah	<i>E. coli</i> non-O157:H7	Desa Pujon Kulon

Hasil yang didapat dari 6 isolat *E. coli* yang kemudian diinokulasikan di media selektif diferensial untuk mendeteksi *E. coli* O157:H7 bahwa terdapat 4 sampel yang positif bakteri *E. coli* O157:H7. Sedangkan 2 sampel dari 6 sampel isolat *E. coli* merupakan *E. coli* non-O157:H7. Koloni yang positif *E. coli* O157:H7 pada media memperlihatkan koloni yang tanpa warna (*colourless*) atau *sorbitol non-fermenting*. Berbeda halnya dengan koloni *E. coli* non-O157:H7 memperlihatkan koloni yang berwarna merah dan memiliki kemampuan untuk memfermentasikan sorbitol. Selain keenam sampel yang diuji pada media *Mac Conkey Agar* dengan sorbitol, sebagai kontrol positif digunakan isolat *E. coli* O157:H7 yang di dapat dari laboratorium mikrobiologi, Universitas Airlangga.

Adapun perbedaan warna koloni dari 6 sampel isolat *E. coli* disajikan pada **gambar 4.4** sebagai berikut.





Gambar 4.4. Inokulasi dari isolat *E. coli* O157:H7 dan *E. coli* non-O157:H7 di medium selektif diferensial *Mac Conkey* agar dengan sorbitol

Keterangan gambar (a) isolat kontrol positif *E. coli* O157:H7, gambar (b) isolat dari nomor sampel susu ke-1, gambar (c) isolat dari nomor sampel susu ke-4, gambar (d) isolat dari nomor sampel susu ke-6, gambar (e) isolat dari nomor sampel susu ke-8, gambar (f) isolat dari nomor sampel susu ke-11, dan gambar (g) isolat dari nomor sampel susu ke-15 (Sumber : Penelitian pribadi)

Berdasarkan hasil yang telah diperoleh dari 15 sampel susu sapi perah didapatkan data bahwa 14 dari 15 sampel (93,33 %) memiliki jumlah koliform yang melebihi batas standar SNI. Kemudian 6 dari 14 sampel (42,86 %) tercemar bakteri *E. coli* dan 4 dari 6 sampel (66,67 %) tercemar bakteri *E. coli* O157:H7. Sampel yang tercemar bakteri *E. coli* O157:H7 berarti tidak memenuhi standar yang telah ditetapkan oleh SNI (2011) bahwa nilai cemaran bakteri *E. coli* patogen pada susu sapi perah adalah nol. Empat sampel yang tercemar bakteri *E. coli* O157:H7 berasal dari Desa Petungsewu. Sampel yang positif tercemar bakteri patogen *E. coli* O157:H7 berpotensi menyebabkan penyakit yang didukung oleh faktor virulensi yang dimiliki oleh bakteri tersebut. Kemudian untuk 2 sampel dari lokasi Desa Pujon Kulon tercemar *E. coli non-O157:H7*, hal tersebut bukan berarti tidak termasuk kelompok bakteri patogen, namun dikarenakan masih dalam satu spesies yaitu *E. coli*, kemungkinan bakteri tersebut juga dapat berpotensi menyebabkan sakit hanya saja tingkat virulensinya yang berbeda-beda.

Keberadaan bakteri patogen *E. coli* O157:H7 pada sampel susu sapi perah mengindikasikan bahwa susu sapi perah tercemar feses atau kotoran yang berasal dari hewan dan manusia. Feses yang mengandung *E. coli* O157:H7 lebih banyak disekresikan pada sapi yang berumur kurang dari 2 tahun, sedangkan pada ternak yang dewasa berkolonisasi di dalam usus dalam waktu yang cukup lama (Suwito, 2009). Hewan sapi menurut Suardana, *et al.* (2011), berpotensi sebagai sumber penularan dari agen zoonosis *E. coli* O157:H7. *E. coli* O157:H7 juga dapat menular dari hewan atau produk hewan sebagai reservoirnya.

Susu yang telah terkontaminasi oleh bakteri *E. coli* O157:H7 sama sekali tidak memperlihatkan perubahan organoleptik baik warna, rasa, maupun bau. Jika ditelusuri sumber kontaminasi cemaran bakteri *E. coli* O157:H7 melalui beberapa faktor. Pertama, dari hewan sapi yang merupakan reservoir utama bakteri patogen *E. coli* O157:H7. Kontaminasi pada susu dapat terjadi akibat dari ambing sapi perah yang terinfeksi oleh bakteri patogen. Selain itu kebersihan hewan ternak sapi juga perlu diperhatikan. Bryne, *et al.* (2000), mengatakan bahwa kebersihan ternak menjadi salah satu faktor cemaran bakteri patogen pada produk hewan ternak. Pembersihan ternak sebelum diperah dapat mengurangi terjadinya kontaminasi *E. coli* O157:H7.

Faktor kedua, kondisi sanitasi kandang menentukan tingkat kontaminasi. Kondisi sanitasi kandang dapat mempengaruhi terhadap kualitas susu terutama dari segi mikrobiologi (Suwito, 2009). Faktor ketiga, pencemaran *E. coli* O157:H7 juga dapat berasal dari air yang digunakan untuk mencuci tangan, membersihkan kandang, dan memandikan hewan ternak. Maksom (2010) menemukan bahwa air sumur berpeluang terhadap penyebaran bakteri *E. coli* O157:H7. Disamping itu, *E. coli* dapat dijumpai di air sebagai akibat pencemaran tinja dari manusia ke hewan (Hanif, 2003). Empat isolat *E. coli* O157:H7 yang telah didapat, selanjutnya disubkultur di media NA (Nutrien Agar) cawan petri dan pemurnian kultur isolat di media NA miring untuk disimpan dan demi kepentingan selanjutnya yaitu deteksi salah satu faktor virulensi dari isolat *E. coli* O157:H7 sebagai uji lanjut dan konfirmasi dari identifikasi secara konvensional.

4.3. Deteksi Salah Satu Faktor Virulensi Isolat *E. coli* O157:H7 Melalui Pendekatan Molekuler

Hasil yang telah didapat melalui identifikasi bakteri secara konvensional sebanyak 4 isolat *E. coli* O157:H7, kemudian dilanjutkan dengan mengekstraksi DNA dari isolat tersebut untuk disimpan dan digunakan demi kepentingan selanjutnya yaitu *Polymerase chain reaction* (PCR).

4.3.1. Kuantitas dan Kualitas DNA Isolat *E. coli* O157:H7

Isolasi DNA merupakan langkah awal dalam analisis molekuler yang berbasis DNA. Tahapan isolasi DNA merupakan salah satu faktor yang berperan penting dalam keberhasilan suatu penelitian. Jika hasil ekstraksi DNA yang dapat diketahui melalui uji kuantitas dan kualitas DNA tidak optimal, maka tahapan analisis molekuler berikutnya seperti amplifikasi tidak akan optimal juga. DNA yang digunakan sebagai target merupakan DNA genom dari isolat yang didapat pada sampel susu sapi perah yaitu nomor sampel susu ke-1, 4, 6, 8, dan kontrol positif yang diremajakan dalam media luria bertani broth (LB) selama 1 x 24 jam suhu 37 °C. Isolasi DNA yang dilakukan menggunakan metode CTAB/NaCL. Hasil ekstraksi DNA dapat diketahui melalui uji kualitas yang dapat dilihat melalui hasil elektroforesis (**gambar 4.5**) dan uji kuantitas menggunakan spektrofotometer nanodrop (**tabel 4.7**) sebagai berikut.

Tabel 4.7. Nilai kuantitas DNA genom isolat *E. coli* O157:H7

Nomor Sampel	Konsentrasi DNA (ng/uL)	Kemurnian DNA (A260/280)
P	254,61	2,0
S1	108,71	1,74 *
S4	64,73	1,60 *
S6	56,95	1,99
S8	77,64	1,96

Keterangan, simbol (*) = nilai kemurnian DNA yang rendah

Uji kuantitas DNA meliputi nilai konsentrasi dan kemurnian DNA genom. Berdasarkan hasil pengukuran konsentrasi DNA, nilai konsentrasi DNA yang didapat mulai dari 56,95 ng/uL sampai 254,61 ng/uL. Konsentrasi DNA merupakan banyaknya jumlah DNA yang didapat melalui tahap pelisisan dinding sel bakteri. Campuran *buffer* lisis seperti *buffer* TE (Tris-EDTA), SDS dan Proteinase-K yang digunakan pada tahap isolasi DNA berperan efektif dalam penghancuran dinding sel bakteri serta memisahkan DNA dari pengotor (protein, RNA, dan debris sel). Menurut Iqbal (2007) mengatakan bahwa EDTA berfungsi sebagai perusak sel dengan cara mengikat ion magnesium, SDS digunakan untuk merusak membran sel, dan enzim proteinase-K berfungsi untuk menghancurkan protein. Proteinase-K memiliki aktivitas yang tinggi ketika diaplikasikan bersama dengan bahan kimia seperti EDTA dan SDS (Geno Technology, 2008).

Nilai konsentrasi DNA yang didapat dari ke-5 sampel berbeda-beda. Nilai konsentrasi DNA yang tertinggi adalah sampel P (kontrol positif) sebesar 254,61 ng/uL dan nilai konsentrasi DNA paling rendah adalah nomor sampel 6 yaitu

56,95 ng/uL. Perbedaan nilai konsentrasi DNA dari masing-masing sampel yang dihasilkan dalam proses isolasi DNA genom disebabkan oleh beberapa faktor.

Faktor pertama terkait jumlah sel bakteri hasil kultur semalam yang sedikit sehingga pada saat ekstraksi DNA yang dihasilkan juga sedikit. Faktor kedua terkait kecepatan ekstraksi, pada saat presipitasi menggunakan larutan P : C : I (fenol, klorofom, isoamil alkohol) yang dilakukan secara bergantian, hal demikian dapat membuat DNA yang berada pada *upper fase* mengalami pengendapan. Pada saat pengambilan DNA dari bagian *upper fase* diambil yang paling atas karena jika terlalu kebawah akan bersentuhan dengan bagian tengah. Jika terlalu lama mengambil, maka DNA akan mengendap di bagian bawah yang dekat dengan bagian tengah yang merupakan kontaminan protein. Hal tersebut didukung oleh pernyataan menurut Kumalasari (2009), pada tahap lisis sel dan presipitasi, pengambilan supernatan dilakukan secara bergiliran persampel sehingga beberapa sampel telah terjadi pengendapan.

Rendahnya nilai konsentrasi DNA juga disebabkan oleh faktor yang ketiga yaitu homogenisasi dengan larutan-larutan yang digunakan untuk ekstraksi DNA. Menurut Fatchiyah (2011), homogenisasi larutan yang kurang maksimal menyebabkan disosiasi jaringan dan presipitasi DNA dari jaringan sel yang kurang maksimal akibatnya DNA yang dikeluarkan pada saat tahap ekstraksi menjadi sedikit. Faktor keempat yang mempengaruhi konsentrasi DNA yaitu suhu inkubasi. Tahap inkubasi dilakukan setelah pemberian *buffer* lisis dan juga pemberian CTAB/NaCl. Setelah pemberian *buffer* lisis sampel diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C. Setelah itu penambahan larutan CTAB/NaCl dan

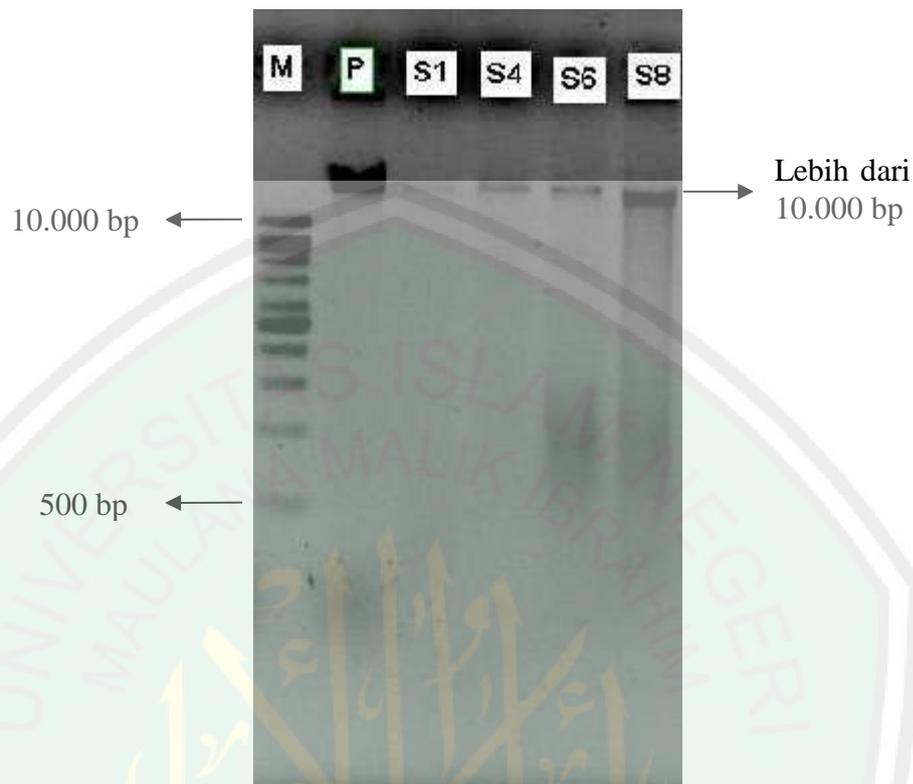
diinkubasi lagi pada suhu 65 °C selama 10 menit. Menurut Nugroho (2015) jika suhu inkubasi yang digunakan terlalu rendah maka membran serta jaringan sel tidak dapat hancur sedangkan jika suhu inkubasi terlalu tinggi maka dapat merusak DNA. Selain suhu yang perlu diperhatikan, waktu inkubasi juga dapat mempengaruhi nilai konsentrasi DNA. Nugroho (2015) mengatakan bahwa waktu inkubasi yang terlalu sebentar tidak dapat menghancurkan membran dan jaringan sel, sebaliknya waktu inkubasi yang terlalu lama juga dapat merusak DNA oleh karena itu, baik suhu dan waktu, keduanya harus diatur dengan sebaik mungkin agar didapatkan nilai konsentrasi DNA yang diharapkan.

Selain nilai konsentrasi DNA, nilai kemurnian DNA juga menjadi parameter pengamatan dalam kuantitas DNA. Berdasarkan **tabel 4.6**, nilai kemurnian DNA berbeda-beda dari masing-masing sampel. Nilai kemurnian DNA juga merupakan syarat penting agar tahapan molekuler lainnya dapat berhasil. Kemurnian DNA merupakan rasio antara A260 dengan A280. Pada penelitian ini kelima sampel memiliki kemurnian mulai dari 1,6-2,0 yaitu nomor sampel P (2,0), S1(1,74), S4(1,60), S6(1,99), dan S8(1,96). Nilai kemurnian terendah adalah nomor sampel S4 (1,6) dan tertinggi nomor sampel P(2,0). Menurut Sambrook dan Russel (2001) hasil isolasi dikatakan murni jika nilai rasio A260/A280 berkisar antara 1,8-2,0. Jika nilai kemurnian A260/A280 kurang dari 1,8 maka menandakan isolat DNA masih mengandung kontaminan berupa fenol dan larutan yang digunakan terlalu banyak. Hal tersebut dapat dilihat dari nilai kemurnian sampel susu S1 dan S4 yang memiliki nilai kemurnian di bawah 1,8 menunjukkan sampel isolat DNA terkontaminasi oleh fenol sebagai akibat dari proses presipitasi

yang kurang lama. Sedangkan nilai kemurnian diatas 2,0 menandakan bahwa masih terdapat kontaminan berupa RNA.

Berdasarkan nilai kemurnian yang didapat, nomor sampel 6 yang diukur kuantitasnya memiliki nilai kemurnian yang rendah. Menurut Fatchiyah (2011) DNA yang tidak murni disebabkan oleh adanya sisa-sisa etanol pada saat pengeringan yang tidak sempurna. Jika pengeringan kurang sempurna, maka larutan purifikasi seperti etanol dapat menurunkan nilai kemurnian DNA pada saat pengukuran menggunakan spektrofotometer nanodrop (Nugroho, 2015). Selain itu nomor sampel 1 juga nilai kemurniannya di bawah 1,8 namun masih mendekati 1,8 yaitu 1,74. Sisanya 3 sampel yang nilai kemurniannya 1,96-2,0 termasuk kategori murni artinya terbebas dari kontaminan dan pengotor sel. Nilai konsentrasi dan kemurnian DNA yang dihasilkan sangat bergantung pada saat teknis isolasi DNA.

Selanjutnya selain mengetahui nilai kuantitas dan kemurnian DNA juga dilakukan analisis terhadap hasil kualitas DNA pada kelima sampel menggunakan gel agarose 1 % kemudian divisualisasikan dengan UV-transiluminator. Hasil kualitas DNA isolat O157:H7 dapat dilihat pada **gambar 4.5** berikut ini.



Gambar 4.5. Visualisasi hasil isolat DNA *E. coli* O157:H7

Keterangan : M = marker 1 kb; P = kontrol positif isolat *E. coli* O157:H7 dari rumah sakit; S1=Nomor sampel susu ke-1; S4 = Nomor sampel susu ke-4; S6 = Nomor sampel susu ke-6; S8=Nomor sampel susu ke-8 (sumber : penelitian pribadi)

Kualitas pita DNA yang dihasilkan melalui visualisasi DNA pada **gambar 4.5** di atas menunjukkan adanya perbedaan. Pita DNA pada sampel P terlihat lebih terang dan tebal dibandingkan pita sampel S1, S4, S6, dan S8. Hal tersebut berkaitan dengan konsentrasi DNA yang didapatkan. Sampel P termasuk sampel yang memiliki nilai konsentrasi DNA yang paling tinggi dibandingkan sampel yang lain. Menurut Sambrook dan Russel (2011) semakin tinggi konsentrasi yang didapatkan, maka pita yang terbentuk semakin tebal dan terang.

Selain sampel P yang memiliki nilai konsentrasi DNA tinggi dan menunjukkan pita yang tebal pada hasil elektroforesis, sampel S1 juga memiliki

nilai konsentrasi DNA yang tinggi kedua setelah sampel P. Namun berdasarkan visualisasi menggunakan elektroforesis, isolat DNA sampel S1 tidak memperlihatkan kualitas pita DNA yang tebal. Hal tersebut dikarenakan nilai kemurnian DNA dari isolat S1 kurang dari standar nilai kemurnian hasil isolat DNA dan menunjukkan sampel S1 terkontaminasi oleh kontaminan berupa fenol. Kontaminan berupa fenol tersebut yang membuat nilai kemurnian menjadi menurun dan mempengaruhi hasil visualisasi elektroforesis sehingga pita yang dihasilkan tidak tebal.

Berdasarkan visualisasi menggunakan gel agarose 1%, sampel P masih terlihat adanya *smear*. *Smear* merupakan suatu indikasi bahwa masih terdapat kontaminan dalam sampel tersebut padahal bila dilihat kemurniannya, sampel P termasuk kategori sampel yang memiliki nilai kemurnian yang baik yaitu 2,0. Nilai kemurnian 2,0 dimungkinkan masih terdapat kontaminasi berupa RNA dalam jumlah yang sedikit karena nilai kemurnian 2,0 merupakan batas atas dari nilai kemurnian DNA yang dikategorikan murni.

Selanjutnya sampel S1 dan S4 juga terlihat adanya *smear* namun sangat tipis, nilai kemurniannya di bawah 1,8 yaitu 1,74 dan 1,60. Nilai kemurnian di bawah 1,8 kemungkinan kontaminasinya berupa protein, debris sel, dan larutan yang digunakan untuk isolasi DNA. Sampel S6 dan S8 berdasarkan nilai kemurniannya termasuk DNA dengan kemurnian yang baik yaitu 1,99 dan 1,96 terlihat dari hasil visualisasi tidak terdapat *smear*. Keberhasilan isolasi DNA genom dapat dilihat melalui visualisasi gel agarose 1 % yang memperlihatkan panjang DNA genom dari kelima isolat *E. coli* O157:H7 lebih dari 10.000 bp.

Kelima sampel memiliki pita DNA yang sama segaris. Hal demikian menunjukkan bahwa Allah SWT Maha Kuasa atas segala ciptaan-Nya sampai hal terkecilpun seperti bakteri memiliki ukuran tersendiri sesuai dengan jenis dari masing-masing bakteri. Hal tersebut telah tertuang di dalam al-Quran surat Al-qamar (54) ; 49 sebagai berikut.

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ دَرَجَةً

Artinya :

“*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya*”

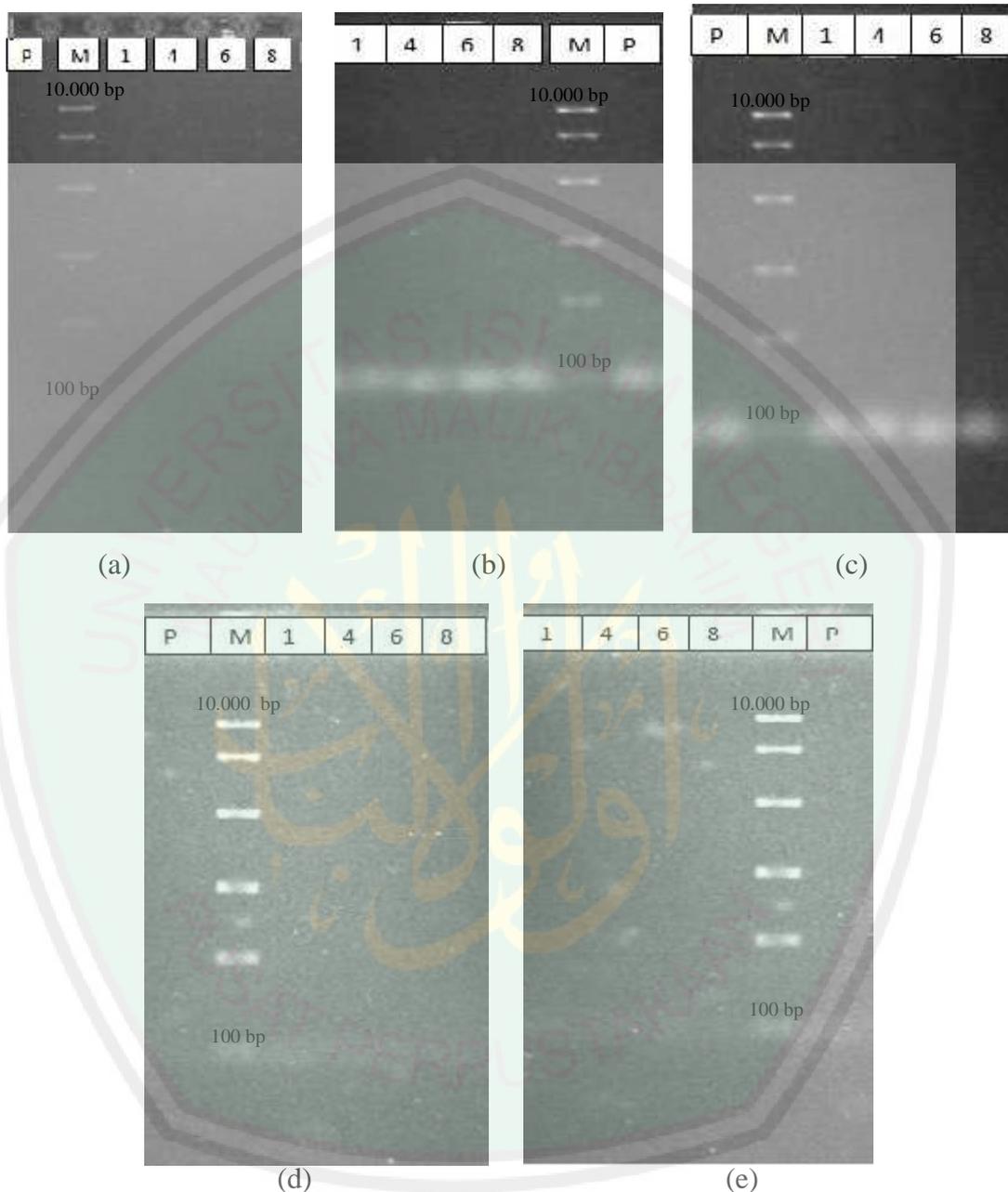
Lafad **بِقَدَرٍ** yang berarti menetapkan ukuran-ukuran (Shihab, 2002). Allah SWT menetapkan sesuatu ukuran dan memberikan petunjuk terhadap semua makhluk kepada ketetapan tersebut (Mubarakfuri, 2007). Ukuran adalah apa yang ada di alam ini dapat dinyatakan dalam dua peran, pertama sebagai bilangan dengan sifat dan ketelitian yang terkandung di dalamnya dan kedua sebagai hukum dan aturan (Qurthubi, 2008). Ukuran jika dikaitkan dengan penelitian ini maka lebih mengarah ke sifat dan ketelitian yang terkandung di dalam suatu spesies terkait dengan ukuran genom yang dimiliki oleh masing-masing spesies yang sudah menjadi ketetapan-Nya.

4.3.2. Amplifikasi DNA Menggunakan Primer Gen *rfbE*

Amplifikasi DNA dilakukan pada semua sampel isolat *E. coli* O157:H7 dari susu sapi perah dan juga kontrol positif. Primer yang digunakan merupakan primer spesifik untuk mendeteksi salah satu faktor virulensi dari *E. coli* O157:H7 yaitu gen *rfbE*. Menurut Fatchiyah (2011) sepasang primer oligonukleotida yang

spesifik digunakan untuk membuat hibrid untai DNA target dan mengamplifikasi urutan yang diinginkan. Gen *rfbE* yang merupakan gen yang digunakan sebagai target amplifikasi karena menurut Suria, *et al.* (2013), gen *rfbE* mengkode antigen O untuk serotipe O157. Abong'o dan Momba (2008) menambahkan bahwa gen *rfbE* digunakan untuk membedakan *E. coli* serotipe O157:H7 dengan *E. coli* non-O157. Antigen O merupakan bagian yang penting selain dalam penentuan serologi juga berkaitan dengan endotoksin dari Lipopolisakarida (LPS) yang ada pada membran luar bakteri Gram negatif.

Berdasarkan hasil PCR menggunakan sepasang primer untuk mengamplifikasi gen target *rfbE* tidak terlihat sama sekali pita DNA yang seharusnya mengamplifikasi gen target dengan ukuran produk PCR yaitu 239 bp. Protokol yang digunakan mengacu protokol milik Kandou (2009). Adapun hasilnya ditunjukkan pada **gambar 4.6** sebagai berikut.



Gambar 4.6. elektroforegram kelima sampel isolat *E. coli* O157:H7 dengan suhu *annealing* yang berbeda-beda

Keterangan gambar kode P=kontrol positif, M=Marker, 1=Nomor sampel susu ke-1, 4=nomor sampel susu ke-4, 6=nomor sampel susu ke-6, dan 8=nomor sampel susu ke-8. Gambar (a) suhu *annealing* 57 °C, gambar (b) suhu *annealing* 56 °C, gambar (c) suhu *annealing* 55 °C, gambar (d) suhu *annealing* 53 °C, gambar (e) suhu *annealing* 51 °C (sumber : penelitian pribadi)

Hasil pada **gambar 4.6** menunjukkan bahwa primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen target *rfbE* tidak berhasil memperlihatkan pita dengan ukuran produk PCR sebesar 239 bp. Hasil proses PCR yang telah dilakukan dapat dilihat melalui visualisasi gel agarose konsentrasi 1,5% dengan voltase 75 V selama 60 menit. Primer yang digunakan mengacu pada protokol milik Kandou (2009) bukan mendesain sendiri. Ketidakberhasilan primer mengamplifikasi gen target dapat dilihat dari kontrol positif, isolat *E. coli* O157:H7 yang didapatkan dari Universitas Airlangga yang juga tidak memperlihatkan pita DNA sebesar 239 bp. Kemungkinan tidak terlihatnya pita DNA target yang diinginkan dikarenakan ada banyak faktor yang mempengaruhi.

Faktor yang mempengaruhi keberhasilan proses amplifikasi DNA target meliputi kualitas dan kuantitas DNA sampel, keberhasilan pemeriksaan PCR menurut Sunarno, *et al.*, (2014) dipengaruhi oleh kualitas dan kuantitas DNA sampel. Kuantitas sampel dibutuhkan untuk proses amplifikasi sehingga pada akhir pemeriksaan didapatkan jumlah potongan DNA yang cukup untuk divisualisasi dengan UV-transiluminator. Kualitas sampel yang baik dibutuhkan untuk meminimalisasi adanya partikel lain yang dapat menghambat proses amplifikasi, misalnya EDTA, DNA-se, protein dan lipid yang dapat menutupi DNA target. Berdasarkan hasil penelitian, secara kuantitas kelima sampel sudah memenuhi persyaratan kuantitas DNA sampel yang dapat digunakan untuk PCR seperti yang dikatakan oleh Sunarno, *et al.*, (2014) bahwa kuantitas DNA sampel yang dapat digunakan untuk PCR sebanyak 30-300 ng/uL. Namun dari segi kualitas, tidak semua sampel kualitasnya baik. Ada 3 dari 5 sampel yang kualitas

DNA nya murni karena nilai kemurnian yang dimiliki oleh 3 sampel tersebut berkisar 1,96-2,0. Sedangkan sisanya, 2 sampel kurang murni karena nilai kemurniannya kurang dari 1,8.

Faktor yang lain berkaitan dengan pemilihan primer. Menurut Rychlic (1995) faktor penting yang mempengaruhi kualitas deteksi molekuler berbasis PCR ialah pemilihan primer yang tepat. Analisis PCR dengan primer spesifik merupakan langkah terbaik untuk kepentingan deteksi bakteri patogen karena dapat menghasilkan penentuan secara tepat keberadaan gen target. Keberhasilan teknik ini didasarkan kepada kesesuaian primer, efisiensi, dan optimasi proses PCR. Primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan 2 kemungkinan. Kemungkinan yang pertama teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau kemungkinan yang kedua tidak ada daerah genom yang teramplifikasi (Aris, *et al.*, 2013). Selain itu menurut Yuwono (2008) mengatakan bahwa primer yang baik memiliki panjang 18-28 basa nukleotida dan memiliki kandungan GC sebesar 50-60%. Selain panjang basa dalam primer dan juga kandungan GC, GC clamp juga perlu diperhatikan. GC Clamp yang dimaksud adalah ujung C, G, CG atau GC yang diyakini membuat hibridisasi lebih stabil. GC clamp yang baik jumlahnya sekitar 3 basa G/C dan tidak melebihi 5 basa G/C. Keberadaan G/C di ujung 3' primer sangat membantu terjadinya stabilitas ikatan antara primer dengan DNA cetakan yang diperlukan untuk inisiasi polimerase DNA (Yuwono, 2008).

Amplifikasi DNA dalam setiap penelitian yang baru membutuhkan optimasi karena tidak ada protokol yang sesuai untuk semua kondisi. Faktor

selanjutnya dengan proses *running* PCR terutama suhu *annealing*. Menurut Aris, *et al.* (2013) optimasi PCR diperlukan untuk menghasilkan karakter yang diinginkan. Optimasi yang dilakukan dalam penelitian ini dengan mencari suhu *annealing* yang tepat. Menurut Aris, *et al.* (2013) suhu penempelan (*annealing*) ini ditentukan berdasarkan primer yang digunakan yang dipengaruhi oleh panjang dan komposisi primer. Suhu *annealing* yang optimum merupakan salah satu faktor keberhasilan PCR (Yuwono, 2008). Suhu penempelan sebaiknya 5 °C di bawah suhu leleh. Berdasarkan pertimbangan tersebut suhu *annealing* yang digunakan di dalam penelitian ini yaitu 57 °C yang mengacu pada jurnal milik Kandou (2009). Suhu *annealing* yang dipilih berikutnya di bawah 5 °C yaitu suhu 56 °C, 55 °C, 53 °C, dan 51 °C. Adapun kombinasi suhu dan waktu yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada **tabel 4.8** sebagai berikut.

Tabel 4.8. Kombinasi Suhu dan Waktu dalam proses PCR

Kombinasi suhu dan waktu	Sampel
Pre denaturasi	94 °C
Waktu	5 menit
Denaturasi	94 °C
Waktu	1 menit
<i>Annealing</i>	57 °C, 56 °C, 55 °C, 53 °C, dan 51 °C
Waktu	1 menit 15 detik
Ekstensi	72 °C
Waktu	30 detik
Akhir Ekstensi	72 °C
Waktu	24 jam

Berdasarkan **tabel 4.8** di atas, tahapan awal dari proses PCR adalah pre denaturasi. Menurut Yuwono (2008) denaturasi awal atau predenaturasi dilakukan sebagai pemanasan untuk membantu DNA cetakan agar terdenaturasi dengan baik. Selanjutnya memasuki tahap proses inti dari PCR yang dilanjutkan dengan tahap denaturasi, menurut Hajkova, *et al.* (2006) tahap denaturasi umumnya terjadi pada suhu 92-94 °C selama 15 detik atau 2 menit. Setelah denaturasi selesai, dilanjutkan dengan tahap *annealing* pada DNA cetakan. Penelitian ini menggunakan 5 suhu *annealing* yaitu 57 °C, 56 °C, 55 °C, 53 °C, dan 51 °C. menurut Palumbi (2002) suhu *annealing* yang terlalu rendah dapat menyebabkan primer berhibridisasi tidak spesifik pada sekuen target, sedangkan suhu *annealing* yang terlalu tinggi menyebabkan primer tidak dapat berhibridisasi.

Selain suhu, pemilihan waktu juga turut mempengaruhi optimasi kondisi PCR. Penentuan waktu untuk suhu *annealing* sebesar 1 menit 15 detik berdasarkan jurnal milik Kandou (2009). Menurut Handoyo (2001) untuk panjang primer 18-22 basa cukup dengan waktu 30 detik, sedangkan untuk panjang primer yang lebih besar dari 22 basa diperlukan waktu *annealing* 60 detik. Begitu juga dengan waktu ekstensi dalam penelitian ini selama 30 detik. Hal tersebut sesuai menurut Handoyo (2001) yang mengatakan bahwa untuk mengamplifikasi setiap 1 kilo basa DNA diperlukan waktu 30-60 detik. Sedangkan untuk mengamplifikasi DNA target ukuran produk PCR di bawah 500 bp membutuhkan waktu sekitar 30 detik. Siklus PCR yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 40 siklus.

Berdasarkan evaluasi proses dan hasil PCR bahwa ada banyak faktor yang mempengaruhi teramplifikasi atau tidaknya DNA *template* seperti pembahasan yang telah dipaparkan di atas. Faktor lain di luar komponen dan proses running PCR, pemilihan kontrol positif yang digunakan sebagai pembanding dalam penelitian ini berbeda dengan kontrol positif yang dipakai disetiap penelitian. Beberapa peneliti menggunakan kontrol positif isolat *E. coli* O157:H7 dari instansi yang terstandarisasi dan memiliki kode strain seperti ATCC (*American Type Culture Collection*). Hal tersebut dikarenakan kontrol positif yang telah terstandarisasi memiliki *complete genome* yang telah melalui tahapan sekuensing dan memiliki kode gene di database *gene bank* sehingga memudahkan terkait penelusuran sekuens yang dituju.

Ketidakberhasilan amplifikasi produk PCR bukan berarti hasil identifikasi secara konvensional tidak berhasil dan bukan berarti juga pada isolat *E. coli* O157:H7 tidak memiliki gen *rfbE*. Menurut Nugroho (2015) mengatakan bahwa amplifikasi PCR pada tingkatan serotipe ataupun varietas memiliki tingkat kesulitan yang cukup tinggi dikarenakan spesies tersebut telah mengalami mutan. Amplifikasi gen *hemolysin* telah dilaporkan sebelumnya oleh Zhang, *et al.* (2001), yaitu dari berbagai strain bakteri *Vibrio harveyi* yang berasal dari lokasi geografi yang berbeda, dan menghasilkan produk amplifikasi 1,3 Kbp menggunakan primer yang disebut IFO 15634. Namun dari sebelas sampel yang diuji hanya sembilan strain yang berhasil teramplifikasi. Berdasarkan analisa oleh Zhang, *et al.* (2001), bahwa untuk dua strain sampel yang tidak berhasil teramplifikasi diduga bakteri uji tidak memiliki gen tersebut atau kemungkinan adanya variasi

genetik, sehingga proses annealing tidak berhasil dilakukan karena adanya satu atau lebih basa primer yang ada, tidak memiliki kecocokan dengan sekuen gen target. Hal yang sama juga dapat terjadi pada penelitian ini, ketidakberhasilan amplifikasi gen target dikarenakan spesies yang langsung diisolasi dari bahan alam memiliki variasi genetik yang berbeda antara satu dengan lainnya.

Penelitian lain juga banyak yang mendeteksi salah satu faktor virulensi dengan gen target *rfbE* namun terkait ukuran produk PCR yang dihasilkan berbeda-beda dikarenakan menggunakan sekuen primer yang berbeda satu dengan yang lain dan juga terkait dengan sampel. Berikut tabel 4.9 tentang beberapa penelitian yang menggunakan gen target *rfbE* dengan sekuens primer, jumlah GC, jenis sampel yang berbeda-beda.

Tabel 4.9. Primer gen *rfbE* dari beberapa penelitian

No.	Nama dan tahun Peneliti	Jenis Sampel	Gen target	Sekuens primer 5'-3'		Jumlah GC	Ukuran Produk PCR
				Forward	Reverse		
1	Kandou (2009) Sebagai jurnal yang diacu dalam penelitian ini	Air	<i>rfbE</i>	GTG CTT TTG ATA TTT TTC CGA GTA CAT TGG	TTT ATA TCA CGA AAA CGT GAA ATT GCT GAT	Forward : 30 % Reverse : 36 %	239 bp
2	Paton dan Paton (1998)	Feses Pasien penderita diare HUS		CGG ACA TCC ATG TGA TAT GG	TTG CCT ATG TAC AGC TAA TCC	Forward : 50 % Reverse : 50 %	259 bp
3	Hu (1999)	Isolat <i>E. coli</i> O157 : H7		GTG TCC ATT TAT ACG GAC ATC CAT G	CCT ATA ACG TCA TGC CAA TAT TGC C	Forward : 44 % Reverse : 44 %	292 bp
4	Wang (2006)	Feses sapi dan feses manusia		CTA CAG GTG AAG GTG GAA TGG	ATT CCT CTC TTT CCT CTG CGG	Forward : 52 % Reverse : 52 %	327 bp
5	Al-Ajmi (2006)	Feses sapi		AAG ATT GCG CTG AAG CCT TGG	CAT TGG CAT CGT GTG GAC AG	Forward : 47 % Reverse : 55 %	497 bp
6	Bai (2010)	STEC strain		CAG GTG AAG GTG GAA TGG TTG TC	TTA GAA TTG AGA CCA TCC AAT AAG	Forward : 52 % Reverse : 33 %	296 bp

Berdasarkan **tabel 4.9** di atas, ukuran produk PCR yang dihasilkan berbeda-beda. Hal tersebut dikarenakan daerah atau wilayah yang menjadi target primer berbeda-beda bagian yang diambil oleh peneliti namun masih dalam satu lokus gen *rfbE* dengan panjang gen sebesar 13,7 kb (Iguchi, 2011). Berdasarkan hasil dari beberapa peneliti yang menggunakan gen *rfbE* sebagai gen target, sampel yang digunakan berbeda-beda. Ketidakhadiran *band* pita dari isolat *E. coli* O157:H7 dapat juga dikarenakan isolat *E. coli* O157:H7 yang berasal dari bahan alam yang diisolasi telah mengalami mutasi yang disebabkan oleh faktor lingkungan atau internal dari bakteri tersebut sehingga menyebabkan satu atau beberapa basa yang ada di dalam susunan bakteri tersebut telah mengalami beberapa hal seperti delesi, insersi, ataupun pola mutasi gen yang lainnya mengingat bakteri yang menjadi target dalam penelitian ini merupakan bakteri *E. coli* mutan patogen.

Selain sampel yang berbeda, kandungan GC di dalam penelitian ini juga berbeda-beda. Menurut Dale dan Schantz (2002) mengatakan bahwa pasangan G-C menjadi hal yang penting dipertimbangkan dalam pemilihan primer dikarenakan pasangan G-C lebih kuat dengan memiliki 3 ikatan hidrogen daripada A-T yang hanya memiliki 2 ikatan hidrogen dan semakin banyak kandungan G-C di dalam primer, primer tersebut akan berikatan lebih kuat dengan komplemennya (lebih stabil terhadap peningkatan suhu). Namun menurut Paton dan Paton (1998) mengatakan bahwa kelompok gen yang mensintesis antigen O pada serotipe *E. coli* O157 memiliki kandungan GC yang rendah berkisar 30-40 %.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti terkait gen target *rfbE* pada setiap sampel yang berbeda-beda, hal tersebut menunjukkan bahwa Allah SWT Maha Kuasa atas segala ciptaanNya. Allah SWT menciptakan makhluk dengan karakteristik fenotip yang sama namun terkait genotipnya berbeda-beda. Melalui genotip yang berbeda tersebut yang menjadi pembeda dari setiap organisme. Hal tersebut tertuang didalam al-Quran surat Fussilat (41) ; 53.

سُنُرِيهِمْ آيَاتِنَا فِي الْآفَاقِ وَفِي أَنْفُسِهِمْ حَتَّىٰ يَتَبَيَّنَ لَهُمْ أَنَّهُ الْحَقُّ ۗ أَوَلَمْ يَكْفِ بِرَبِّكَ أَنَّهُ عَلَىٰ كُلِّ شَيْءٍ شَهِيدٌ

Artinya :

Kami akan memperlihatkan kepada mereka tanda-tanda (kekuasaan) Kami di segala wilayah bumi dan pada diri mereka sendiri, hingga jelas bagi mereka bahwa al-Quran itu adalah benar. Tiadakah cukup bahwa sesungguhnya Tuhanmu menjadi saksi atas segala sesuatu ?

Lafad *أَنْفُسِهِمْ* yang berarti diri mereka sendiri (Shihab, 2002). Allah SWT menunjukkan kepada hambaNya bukti-bukti kekuasaanNya melalui benda-benda yang ada di belahan langit dan bumi maupun yang ada dalam diri mereka. Ibnu Katsir (Mubarakfuri, 2007) menambahkan bahwa makna yang dimaksud dari ayat tersebut ialah tanda-tanda kekuasaan Allah yang ada dalam diri manusia ataupun makhluk lainnya, seperti bentuk tubuh, organ-organ tubuh, dan segala sesuatu yang ada dalam diri manusia dan makhluk lainnya. Makhluk lainnya yang dimaksud juga dapat berarti mikroorganisme. Tanda kekuasaan Allah SWT dapat diketahui melalui penelitian ini bahwa meskipun secara morfologi koloni (fenotip) *E. coli* O157:H7 di media selektif diferensial *Mac Conkey* agar dengan sorbitol menunjukkan koloni yang seragam tidak berwarna namun secara genotip bisa jadi tidak sama sekalipun masih dalam satu spesies. Perbedaan tersebut dapat

disebabkan karena faktor mutasi mengingat sampel yang digunakan dalam penelitian ini termasuk *E. coli* mutan patogen.



BAB V

PENUTUP

5.1. Simpulan

Berdasarkan pembahasan yang telah dipaparkan sebelumnya dapat ditarik suatu simpulan sebagai berikut.

1. Enam sampel susu sapi perah dari 2 lokasi peternakan Desa Petungsewu dan Desa Pujon Kulon tercemar bakteri *E. coli*.
2. Empat sampel susu sapi perah dari lokasi peternakan Desa Petugsewu tercemar bakteri *E. coli* O157:H7.
3. Aplikasi metode konvensional melalui media selektif diferensial mampu mendeteksi cemaran bakteri patogen *E. coli* O157:H7. Hasil uji konfirmasi metode konvensional melalui pendekatan molekuler dengan teknik PCR dan mengamplifikasi salah satu faktor virulen yang dimiliki oleh isolat *E. coli* O157:H7 yang dilakukan pada isolat yang didapat dan hasilnya tidak terlihat pita DNA dengan ukuran produk PCR 239 bp.

5.2. Saran

Saran dan perbaikan yang dapat dilakukan kedepannya dari penelitian ini dapat dilakukan beberapa hal sebagai berikut

1. Untuk mengetahui gen target spesifik spesies yang belum pernah dilakukan PCR sebelumnya sebaiknya dilakukan amplifikasi menggunakan primer universal seperti 16S rRNA kemudian dilanjutkan dengan teknik sekuensing

untuk mendapatkan urutan sekuens sebagai bahan pertimbangan nantinya dalam pemilihan primer dengan target gen spesifik spesies

2. Diperlukan kontrol positif yang terstandar dan memiliki kode strain



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., dan Lichtman A. H. 2001. *Basic Immunology, Function and Disorders of the Immune System*. Philadelphia: W. B. Saunders Co. <http://www.scribd.com/doc/47176191/imunitas> (diunduh pada tanggal 16 September 2016)
- Abong'o B.O., Momba M. N. B. 2008. Prevalence and Potential Link Between *E. coli* O157:H7 Isolated from Drinking Water, Meat, and Vegetables and Stools of Diarrheic Confirmed and 13 Non-Confirmed HIV/AIDS Patients In The Amathole District–South Africa. *J. Appl. Microbiol.* No. 105
- Agrawal, S., Sachdev A., Gupta D., dan Chugh K. 2008. Platelet Counts and Outcome In The Pediatric Intensive Care Unit. *Indian J Crit Care Med.* Vol. 12. No. 3
- Al-Ajmi, D., Padmanabha J., Denman S.E., Gilbert R.A., Al Jassim R.A., McSweeney C.S. 2006. Evaluation of A PCR Detection Method for *Escherichia coli* O157:H7/H- Bovine Faecal Samples. *Lett. Appl. Microbiol.* Vol. 42
- Andriani. 2006. *Escherichia coli* O157:H7 Sebagai Penyebab Penyakit Zoonosis. *Prosiding Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan
- Anggreini, Rahayu. 2015. *Analisis Cemaran Bakteri Escherichia coli (E. coli) O157:H7 Pada Daging Sapi Kota Makassar*. Skripsi Tidak Diterbitkan. Makassar: Jurusan Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin
- Aprijani, Dwi Astuti dan M Abdush shomad El Faizi. 2004. Bioinformatika, Perkembangan, Disiplin Ilmu dan Penerapannya di Indonesia. <http://www.gnu.org/copyleft/fdl/html> (diakses pada tanggal 10 Maret 2016)
- Aris, M., Sukenda, Harris E, Sukadi MF, Yuhana M. 2013. Identifikasi Molekuler Bakteri Patogen dan Desain Primer PCR. *Jurnal Budidaya Perairan*. Vol.1. No. 4
- Arocha, M., M. McVey, S. D. Loder, J. H. Rupnow, dan L. B. Bullerman. 1992. Behavior of Hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 During The Manufacture of Cottage Cheese. *J. Food Prot.* Vol. 55. No. 5
- Arista, Moh Syafiq. 2013. *Efektivitas Antibakteri Infusa Biji Papaya (Carica papaya Linn) Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus, E. coli, dan*

Pseudomonas aeruginosa Secara In Vitro. Skripsi Tidak Diterbitkan.
Semarang : Universitas Muhammadiyah Semarang

- Arthur, Sutikno. 2009. *Cara Menghitung Nilai MPN Uji Coliform*.
<http://sutikno.Blog.Uns.ac.id>. (diakses tanggal 16 September 2016)
- Ausubel, FM. 2003. Preparation of Genomic DNA From Bacteria. pp 213-217 in
Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K
(eds). *Current Protocols in Molecular Biology*. Cambridge: John Wiley &
Sons, Inc
- Badan Standarisasi Nasional. 2011. *Standarisasi Nasional Indonesia SNI Susu
Segar-bagian I: Sapi*. Jakarta : Badan Standarisasi Nasional
- Bai, Jianfa, Xiaorong Shi, T. G. Nagaraja. 2010. A Multiplex PCR Procedure for
The Detection of Six Major Virulence Genes In *Escherichia coli* O157:H7.
Journal of Microbiological Method. No. 82
- Bakri, Zakia. 2014. *Deteksi keberadaan Bakteri Escherichia coli O157:H7 Pada
Feses Penderita Diare Dengan Metode Kultur dan PCR*. Tesis Tidak
Diterbitkan. Makasaar: Jurusan Biomedik Universitas Hasanuddin
- Bali, O. S., Lajnef R., Felfoul I., Attia, H., dan Ayadi, M.A. 2013. Detection of
Escherichia coli in Unpasteurized Raw Milk. *International Journal of
Agriculture and Food Science*. Vol. 3. No. 2
- Balia, R.L., E. Harlia, dan D. Suryanto. 2008. *Jumlah Bakteri Total dan Koliform
pada Susu Segar Peternakan Sapi Perah Rakyat dan Susu Pasteurisasi
Tanpa Kemasan di Pedagang Kaki Lima*. Prosiding. Bandung: Fakultas
Peternakan Universitas Padjadjaran
- Berg, Howard C. 2004. *E. coli in Motion, Biological, and Medical Physics
Biomedical Engineering*. New York: Springer Verlag AIP Press
- BETTELHEIM, K.A. 2000. Role of non O157 VTEC. *J. Appl. Symp. Microbiol.
Suppl.* Vol. 88
- [BPS] Biro Pusat Statistik. 2014. *Produksi Susu Perusahaan Sapi Perah Tahun
2000 – 2012*. Biro Pusat Statistik. Jakarta. <http://www.BPS.go.id>
- Breidt, F. Jr., J. S. Hayes and R. F. Mc Feeters. 2004. The Independent Effects of
Acetic Acid and pH On The Survival of *Escherichia coli* O157:H7 In
Simulated Acidified Pickle Products. *J. Food Prot.* Vol. 67. No. 1
- BYRNE, CM, D.J. BOLTON, J.J. SHERIDAN, D.A. MCDOWELL and I.S.
BLAIR. 2000. The effects of preslaughter washing on the reduction of

Escherichia coli O157:H7 transfer from cattle hides to carcasses during slaughter. *Letter Appl. Microbiol.* Vol. 30

BSN 7388. 2009. *Batas Maksimum Cemaran Mikroba Dalam Pangan*. Badan Standardisasi Nasional

Brooks, G. F., J. S. Butel SA Murse. 2004. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Salemba Medika

Buckle, K. A., R. A Edwards, Fleet dan M. Wooton. 2009. *Ilmu Pangan*. Jakarta: UI Press

Campbell, N. A. 1999. *Biology, fifth edition*. USA: Addison Wesley Langman, Inc

Carter, GR., Wise DJ. 2004. *Veterinary Bacteriology and Micology*. USA: Iowa State Press

Cempirkova, R. 2006. Factors Negatively Influencing Microbial Contamination of Milk. *J. Agric. Trop. Et Subtrop.* Vol. 39

Clark, M. 2007. *Escherichia coli* O157:H7 (on line). <http://www.about-ecdi.com> (diakses 10 Mei 2016)

Cooley, M., Carychao D., Crawford-Miksza L., Jay M.T., Myers C., Rose C., Keys C., Farrar J., and Mandrell R.E. 2007. Incidence and Tracking of *Escherichia coli* O157:H7 In A Major Produce Production Region In California. *PLoS ONE* 2

Damayanti, Alia, Yudha Prasetyawan, Christova H. W., Eka Rahma P. 2014. *Peningkatan Nilai Bisnis Susu Sapi Dalam Kerangka Penguatan Sistem Inovasi Daerah Di Kabupaten Malang*. Simposium Nasional RAPI XIII. FT UMS

Dale, W.J., dan Schantz, V.M. 2003. *From Genes to Genomes (concepts and application of DNA Technology)*. England : Jhon Wiley & Son Ltd

Dieffenbach, W. C., and Gabriella, S. D. 1995. *PCR Primer : A Laboratory Manual*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press

DESMARCHELLIER, P. M. 1989. *Vibrio cholerae* and Other *Vibrios* In Foodborne Microorganisms of Public Health Significance. *Australian Institute of Food Science and Technology Ltd*

- Elmoslemay, A. M., Keefe GP, Dohoo IR, and Dingwell RT. 2009. Microbiological Quality of Bulk Tank Raw Milk In Prince Edward Island Dairy Herds. *J.Dairy Sci.* No. 92
- Entjang, I. 2003. *Mikrobiologi dan Parasitologi untuk Akademi Keperawatan dan Sekolah Tenaga Kesehatan yang Sederajat*. Bandung: Citra Adhya Bakti
- Erlich, H. A. 1989. *PCR Technology : Principles and Application for DNA Amplification*. USA
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pengolahan Pangan Lanjutan*. Bogor: PAU Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor
- FAO dan IDF. 2011. An Update On Transboundary Animal Diseases In The Near East. The 30th FAO Regional Conference Report. *Sudan*. Vol. 8
- Faqih, Kamal Alamah. 2006. *Tafsir Nurul Qur'an*. Jakarta: Al-Hud
- Fatchiyah, Estri Laras A., Sri Widyarti, dan Sri Rahayu. 2011. *Biologi Molekular ; Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga
- Feder, I., Wallace F.M., Gray J.T., Fratamico P., Fedorka-Cray P.J., Pearce R.A., Call J.E., Perrine R., and Luchansky J.B. 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 From Intact Colon Fecal Samples of Swine. *Emerg. Infect. Dis.* Vol. 9
- Fitriya, Riya, Muslimin Ibrahim, dan Lisa Lisdiana. 2015. Keefektifan Metode Isolasi DNA kit dan CTAB/NaCl yang Dimodifikasi pada *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*. *Lentera Bio*. Vol. 4. No. 1
- Former O, M., Black W., Hoeh R., Lutz, and R. Vrijenhoek. 1994. DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome COxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. Vol. 3. No. 5
- Forsythe, S. J and P. R. Hayes. 1998. *HACCP and product quality in Food Hygiene, Microbiology and HACCP*. Gaithersburg: Aspen Publishers
- FRANK, J.F., Hassan A. F. 2001. *Applied Dairy Microbiology*. New York: Marcel Dekker, Inc
- Fratamico, P. M., Bagi L. K., Pepe T. 2000. A Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Detection and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 In Foods and Bovine Feces. *J. Food Prot.* Vol. 63

- Gannon, V.P., D'Souza S., Graham T., King R.K., Rahn K., Read S. 1997. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 35
- Geno Technology Inc. USA. 2009. Proteinase K. On line at www.gbiosciencest.com/protease-k.aspx (diakses pada tanggal 15 September 2016)
- Giacometti, A., Cirioni O., Ghiselli R., Mocchegiani F., Del Prete M.S., Viticchi C., Kamysz W., Lempicka E.B., Saba V., Scalise G. 2002. Potential Therapeutic Role of Cationic Peptides in Three Experimental Models of Septic Shock. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* Vol. 46. No. 7
- Gie, Joshua Liem Tion, dan Yatri Drastini. 2015. Identifikasi *Escherichia coli* O157:H7 Pada Susu Sapi Perah Dan Lingkungan Peternakan. *Jurnal Kedokteran Hewan.* Vol. 9. No. 2
- Guntur, A. H. 2008. *Sepsis SIRS, Sepsis, dan Syok Sepsis (Imunologi, Diagnosis, Penatalaksanaan)*. Surakarta: Sebelas Maret University Press
- Gustiani, Erni. 2009. Pengendalian Cemaran Mikroba Pada Pangan Asal Ternak (daging dan Susu) Mulai Dari Peternakan Sampai Dihidangkan. *Jurnal Litbang Pertanian.* Vol. 28. No. 3
- Hadiwiyoto, S., 1994. *Pengujian Mutu Susu dan Hasil Olahannya*. Yogyakarta : Penerbit Liberty
- Hajkova, P., B. Zemanova, J. Bryja, B. Hajek, and K. Roch. 2006. Factor Affecting Success of PCR Amplification of Microsatellite Loci from Otter Faeces. *Molecular Ecology Notes.* Vol. 6
- Handoyo, D dan Rudiretna A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Jurnal Unitas.* Vol. 9. No. 1
- Hanif, SKS. 2003. *Prevalensi Analisis Faktor-faktor Kontaminasi Escherichia coli O157:H7 pada Sumber Air Peternakan Sapi Perah Rakyat di Kabupaten Sleman*. Tesis. Yogyakarta: Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada
- Hardiningsih, riani, dkk. 2006. Isolasi dan Uji Resistensi Beberapa Isolat *Lactobacillus* pada pH rendah. *Biodiversitas.* Vol. 7. No. 1
- Heijnen, Leo, Gertjan Medema. 2009. Method for Rapid Detection of Viable *Escherichia coli* In Water Using real-time NASBA. *Water Research.* Vol. 43

- Horvarth, R. S., and M. E. ROPP. 1974. Mechanism of Action of Eosin Methylene Blue agar In The Differentiation of *E. coli* and *Enterobacter aerogenes*. *International journal of systematic bacteriology*. Vol. 24. No. 2
- Hu, Y., Zhang Q., and Meitzler J.C., 1999. Rapid and Sensitive Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* Vol. 87
- Iqbal, M. 2007. Teknik Isolasi DNA. *On line at* <http://www.mochammadiqbal.wordpress.com/2007/04/15/5/> (diakses pada tanggal 16 November 2016)
- Iguchi, Atsushi, Hiroki shirai, Kazuko Seto, Tadasuke Ooka, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Kayo Osawa, Ro Osawa. 2011. Wide Distribution of O157-Antigen Biosynthesis Gene Clusters in *Escherichia coli*. *Evolution of E. coli Serogroup*. Vol. 6
- Jay, JM. 2000. *Modern Food Microbiology 6th Ed.* New York: Van Nostrand Reinhold Company
- Jamaluddin, Mahran dan 'Abdul 'Azhim Hafna Mubasyir. 2010. *Al Qur'an Bertutur Tentang Makanan & Obat-Obatan*. Yogyakarta : Mitra Pustaka
- Jawetz, E., J. L. Melnick, E. A. Adelberg, G. F. Brooks, J. S. Butel, and L. N. Ornston, 2005. *Mikrobiologi Kedokteran ed. 20*. San Francisco: University of California
- Jessen, K. M., Lindboe1 S. B., Petersen A. L., Olsen J. E., Benfield T. 2007. Common TNF- , IL-1 , PAI-1, uPA, CD14 and TLR4 Polymorphisms are Not Associated with Disease Severity or Outcome from Gram Negative Sepsis. *BMC Infectious Diseases*. Vol. 7
- Kandou, Febby Ester Fany. 2009. *Analisis Kualitatif Escherichia coli Serotype O157:H7 Pada Air Minum Dalam Kemasan dan Isi Ulang Dengan Teknik PCR di Makassar*. Tesis Tidak Diterbitkan. Makassar: Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin
- Kaneko M., Akiyama Y., Takimoto H., Kumagawa Y. 2005. Mechanism of UpRegulation of Immunoglobulin A Production in the Intestine of Mice Unresponsive to Lipopolysaccharide. *Immunology*. Vol. 116
- Kayser, F., Bienz K., Eckert J. 2005. *Medical Microbiology*. New York : Thieme Stuttgart

- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2011. Buku Pedoman Pengendalian Penyakit Diare. Direktorat Jenderal Pengendalian dan Penyehatan Lingkungan. *Kementrian Kesehatan Republik Indonesia*. Jakarta
- Kusumaningsih, Annin, dan Tati Ariyanti. 2013. Cemaran bakteri patogenik pada susu sapi segar dan resistensinya terhadap antibiotika. *Berita Biologi*. Vol. 12. No. 1
- Kumalasari. L.O.R. 2009. Pemanfaatan Obat Tradisional dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol. III. No. 1
- Lefebvre, B., Diarra, M.S., Giguere, K., Roy, G., Michaud, S., Malouin, F., 2005. Antibiotic resistance and hypermutability of *Escherichia coli* O157 from feedlot cattle treated with growth-promoting agents. *J. Food Prot.* Vol. 68
- Lehninger AL. 1982. *Dasar-dasar Biokimia* Jilid 1. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Lingathurai, S. and Vellathurai, P. (2010) Bacteriological Quality and Safety of Raw Cow Milk In Madurai, South India. *Web. Med. Central. Microb.* Vol. 1
- Lisdayanti, P. 1997. *Polymerase Chain Reaction: Cara Mudah Memperbanyak DNA*. *Warta Biotek*
- Loeffelholz, M., and H. Deng. 'PCR and Its Variations'. Dalam Tang, Y.W. and C.W Stratton (ed.). 2006. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. New York : Springer Science+Business Media LLC
- Maksum R, P Anglia, S Atiek. 2010. Deteksi Cepat Bakteri *Escherichia Coli* Dalam Sampel Air Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* Menggunakan Primer 16e1 Dan 16e2. *Makara Sains*. Vo. 14, No. 1
- Maksum, Radji dan Harmita. 2008. *Analisis Hayati Edisi 3*. Jakarta : EGC
- Malaka, Ratmawati. 2010. *Pengantar Teknologi Susu*. Makassar: Masagena Press
- March, S.B., dan Ratnam, S. 1986. Sorbitol-MacConkey Medium for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 Associated with Hemorrhagic Colitis. *J. Clin. Microbiol.* 23 (5) : 869 – 872
- Masturotul, Anna. 2009. *Development Method of Detection Contaminant Bacterial Pathogen Escherichia coli in Milk with Real-Time Polymerase Chain Reaction (RTiPCR)*. Tesis Tidak Diterbitkan. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada

- Maurer, J.J., Schmidt D., Petrosko P., Sanchez S., Bolton L., Lee M.D. 1999. Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 65
- McPherson, M.J., and MØller S.G. 2006. *PCR, 2nd edition.* United Kingdom: Taylor & Francis Group
- Meryandini A *et al.* 2009. Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. *Makara Sains.* Vol. 13
- Monem, Eman.,*et al.* (2014). Multiplex PCR as emerging technique for diagnosis of enterotoxigenic *E. coli* isolates from pediatric watery diarrhea. *Journal of American Science.* Vol. 10. No. 10
- Morin, N.J., Gong, Z., and Xing-Fang, L. 2004. Reverse Transcription-Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* O1, and *Salmonella* Typhi. *Clinical Chemistry.* Vol. 50. No. 11
- Mubarakfuri, Shafiyurrahman. 2007. Tafsir Ibnu Katsir. Bogor : Pustaka Ibnu Katsir
- Muhammad. 2002. *Ilmu ternak dan Pengolahan Pangan edisi 1.* Yogyakarta: Gramedia Pustaka
- Muhammad. 2003. *Ilmu ternak edisi dan Pengolahan Pangan edisi 2.* Yogyakarta: Gramedia Pustaka
- Muladno. 2001. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika.* Bogor: Pustaka Wirausaha Muda
- Murray, J. A. and Wilton, J. M. A. 2002. LPS from Periodontal Pathogen P. Gingivalis Prevents Apoptosis of HL60-Derived Neutrophils In Vitro, *Infect Immun.* Vol. 71. No. 12
- Murray, RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry Ed ke-26.* San Francisco: McGraw-Hil
- Mustajib, M.I. 2010. Susu pasteurisasi dan mikrobiologi susu. *Jurnal Teknik Industri.* Vol. 12. No. 2
- Nugroho, Fitra Arya Dwi. 2015. *Identifikasi Pola Haplotipe DNA Mitokondria Udang Jari (Metapenaeus elegans) Segara Anakan Kabupaten Cilacap Jawa Tengah Menggunakan Enzim Restriksi HindIII.* Skripsi Tidak Diterbitkan. Malang : Biologi UIN Maliki Malang

- Octaviantris, F.A. 2007. *Deteksi Bakteri Staphylococcus aureus Pada Susu Bubuk Skim (Skim Milk Powder) Impor*. Skripsi Tidak Diterbitkan. Bogor : Institut Pertanian Bogor
- Ooka, T., Terajima J., Kusumoto M., Iguchi A., Kurokawa K., Ogura Y., Asadulghani M., Nakayama K., Murase K., Ohnishi M., Iyoda S., Watanabe H., Hayashi T. 2009. Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 47
- PATON, J.C. dan PATON, A. W. 1998. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Review.* Vol. 11. No. 3
- Paton, A.W., Paton, J.C., 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 36
- Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Indonesia Press
- Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S. 2008. *Dasar-dasar Mikrobiologi 1*. Jakarta: Universitas Indonesia Press
- Petridis, H., Kidder, G., Ogram, A. 2002. *Escherichia coli O157:H7 a Potential Health Concern*. Gainesville: Institute of Food and Agricultural Sciences
- Pracoyo NE. 2006. Penelitian bakteriologi air minum isi ulang di wilayah Jabodetabek. *Cermin Dunia Kedokteran*. Vol. 15. No. 2
- Pratiwi, S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga
- Price SB, Wright JC, DeGraves FJ, Castanine-Cornet MP, Foster JW. 2004. Acid resistance system required for survival of *E. coli* O157:H7 in the bovine gastrointestinal tract and in apple cider are different. *App Environ Microbio*
- PRUIMBOOM-BRESS, I., T. MORGAN, M.R. ACHERMANN, H.W. MOON. 2000. *Cattle lack vascular receptors for E. coli O157:H7 shiga toxin*. USA: Proc.Natl. Acad. Sci
- Puspaningrum, A. 2008. *Penerapan metode Polymerase chain reaction menggunakan primer 16E2 untuk mendeteksi Escherichia coli dalam berbagai sampel*. Skripsi. Jakarta: Universitas Indonesia

- Qiagen. 1997. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. 2nd Ed. Sample & Assay Technologies.
- Quinn, P. J., B. K. Markey, M. E. Carter, W. J. Donnelly, F. C. Leonard. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. USA : Blackwell Publishing
- Qurthubi, Syekh Imam. 2008. *Tafsir al Qurthubi jilid 15*. Jakarta: Pustaka Azzam
- Radji, Maksum. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: EGC
- Raharja, Zulfikar Tria. 2015. *Identifikasi Escherichia coli pada air minum isi ulang dari depot di kelurahan pisangang dan cirendeu tahun 2015*. Skripsi. Jakarta : Uin Syarif Hidayatullah
- Rahman. 2013. *Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review*. Dhaka: AAKMMCJ. Vol. 4. No. 1
- Rombaut, R. 2005. *Dairy Microbiology and Starter Cultures*. Laboratory of Food Technology and Engineering. Belgium: Gent University
- Rychlic, W. 1995. Selection of primer for polymerase chain reaction. *Mol biotechnol*. Vol. 3
- Sadikin, M. 2002. *Biokimia Enzim*. Jakarta: Penerbit Widya Medika
- Saleh, Eniza. 2004. *Dasar Pengolahan Susu Dan Hasil Ikutan Ternak*. Sumatera Utara: Universitas Sumatera Utara Press
- Sambrook, J., dan Russell DW. 2001. *Molecular cloning a laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sari, Riza Febriana. 2010. *Optimasi aktivitas selulase ekstraseluler dari isolate bakteri RF-10*. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Sartika, Indrawani, dan Sudiarti. 2005. Analisis Mikrobiologi *Escherichia coli* O157:H7 Pada Hasil Olahan Hewan Sapi Dalam Proses Produksinya. *Jurnal Makara Kesehatan*. Vol. 9. No. 1
- Shahin G., Ole Græsbøll K., Court P., and Svend S.P. 2006. Procalcitonin, lipopolysaccharide-binding protein, interleukin-6 and C-reactive protein in community-acquired infections and sepsis: a prospective study. *Critical Care*. Vol. 10

Shihab, M.Quraish. 2002. *Tafsir Al-Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al Qur`an Vol.8*. Jakarta: Lentera Hati

SNI No. 01-3141-20011. Mutu susu segar [http://agribisnis.deptan.go.id/explore/files/MUTStandar nasional/SNI Te_nak/Produk%20dan%20Olahan/SNI%2001-3141-2011](http://agribisnis.deptan.go.id/explore/files/MUTStandar_nasional/SNI_Te_nak/Produk%20dan%20Olahan/SNI%2001-3141-2011) (Diakses tanggal 17 Juli 2016)

Suardana, I wayan, Wayan Tunas Artama, Widya Asmara, dan Budi Setiadi Dryono. 2011. Studi Epidemiologi Agen Zoonosis *Escherichia coli* O157:H7 melalui Analisis Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD). *Jurnal Kesehatan Hewan Ternak*

Sugitha, I. M., dan Djalil. 1989. *Susu, Penanganan dan Teknologinya*. Makassar : Fakultas Peternakan Universitas Andalas

Sulistyaningsih, E. 2007. Polymerase Chain Reaction (PCR) ; Era Baru Diagnosis dan Manajemen Penyakit Infeksi. *Jurnal Biomedis*. Vol 1. No. 1

Sumarmi, S., Guntur A.H. 2008. *Sepsis in Eldery*. Kumpulan Karya Ilmiah A. Guntur H. Surakarta : Sebelas Maret University Press

Sunarno, dkk. 2014. Metode cepat ekstraksi DNA *Corynebacterium diphtheria* untuk pemeriksaan PCR. *Bul. Penelit, Kesehatan*. Vol. 42. No. 2

Supardi, Imam dan Sukamto. 1999. *Mikrobiologi Dalam Pengolahan Dan Keamanan Pangan*. Bandung: Penerbit Alumni

Suprihatin, B dan Adriyani, R. 2009. Higiene Sanitasi Depot Air Minum Isi Ulang Di Kecamatan Tanjung Redep Kabupaten Berau Kalimantan Timur. *Jurnal Kesehatan Lingkungan*. Vol. 4. No. 2

Suria, M. S. 2013. Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) efficiency in detection of pathogenic *Escherichia coli* O157:H7. *International Food Research Journal*. Vol. 20. No. 6

Suwito, W. 2009. *Escherichia coli* Verotoksigenik (VTEC) yang Diisolasi Dari Susu Sapi. *JITV*.14 (3) : 237 – 243

Suwito, W., Andriani. 2012. Teknologi penanganan susu yang baik dengan mencermati profil mikroba susu sapi di berbagai daerah. *J. Pascapanen*. Vol. 9. No. 1

Tambunan, T., Trihono P.P., dan Paredede S.O. 2001. Sindrom Hemolitik Uremik di Bagian Ilmu Kesehatan Anak FKUI-RSCM Jakarta. *Bul. Penelit. Kesehatan*. Vol. 29. No. 2

- Tan dan Raharja K. 2001. *Obat-Obat Penting edisi V*. Jakarta: Penerbit Gramedia
- Taylor, G. R, M. J. McPherson, B. D. Hames. 1995. *PCR 2: A Practical Approach*. New York : Oxford University Press
- Todar, K. 2004. *Online Textbook's Todar of Bacteriology* / University of Wisconsin-Madison, Dept. of Bacteriology. University of Wisconsin Madison, Departemen of Bacteriology
- Volk dan Wheeler. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Erlangga
- Waluyo, Lud. 2005. *Mikrobiologi Umum*. Malang: UMM Press
- Waluyo, Lud. 2007. *Mikrobiologi Umum*. Malang: UPT
- Wang, Lei, Peter R. Reeves. 1998. Organization of *E. coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes. *Infection and immunity*
- Wang, G., Clark, C.G., Rodgers, F.G., 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 40
- Yaron, S. dan Matthews, K.R. 2002. A Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Viable *Escherichia coli* O157:H7: Investigation of Specific Target Genes. *Journal of Applied Microbiology*. 92:633-640
- Yusuf, K. Zuhriana. 2010. *Polymerase Chain reaction (PCR)*. *Saintek*. Vol. 5. No. 6
- Yusuf, Ahmad. 2011. *Tingkat Kontaminasi Escherichia coli Pada Susu Segar Di Kawasan Gunung Perak, Kabupaten Sinjai*. Skripsi Tidak Diterbitkan. Makassar: Universitas Hasanuddin
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi; Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta: Erlangga
- Zhao, S., C. H. Sandt, G. Feulner, D. A. Vlazny, J. A. Gray, and C. W. Hill. 1994. *rhs* elements of *Escherichia coli* K-12: complex composites of shared and unique components that have different evolutionary histories. *J. Bacteriol.* Vol. 175

LAMPIRAN 1

1. Persyaratan Susu Sapi Perah

No.	Cemaran bakteri maksimum	SNI No. 01-3141-1998 dan SNI No. 7388-2009
1.	Total bakteri (TPC)	1.0×10^6 CFU/mL
2.	MPN Coliform	20/mL
3.	MPN <i>E. coli</i>	<3/mL
4.	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.0×10^2 /mL
5.	<i>E. coli</i> (patogen)	Negatif
6.	<i>Salmonella</i>	Negatif
7.	<i>Streptococcus</i> Grup B	Negatif

2. Daftar peternak yang berada di 2 Desa (kota Batu)

Peternak	Nomor Sampel Susu	Lokasi Peternakan
Peternak A	1	Desa Petungsewu
Peternak B	2	Desa Petungsewu
Peternak C	3	Desa Petungsewu
Peternak D	4	Desa Petungsewu
Peternak E	5	Desa Petungsewu
Peternak F	6	Desa Petungsewu
Peternak G	7	Desa Petungsewu
Peternak H	8	Desa Petungsewu
Peternak I	9	Desa Petungsewu
Peternak J	10	Desa Pujon Kulon
Peternak K	11	Desa Pujon Kulon
Peternak L	12	Desa Pujon Kulon
Peternak M	13	Desa Pujon Kulon
Peternak N	14	Desa Pujon Kulon
Peternak O	15	Desa Pujon Kulon

3. Tabel *Most Probable Number* (MPN) Koliform

No. Tube yang Diberi Perlakuan			MPN (per 100 ml)	95% Derajat Keterbatasan	
3 dari 10 ml	3 dari 1 ml	3 dari 0,1 ml		Batas bawah	Batas atas
0	0	1	3	<1	9
0	1	0	3	<1	13
0	0	0	4	<1	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	49
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	149
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	379
3	1	0	49	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	99	15	390
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

3	3	3	>2400	420	-
---	---	---	-------	-----	---

Sumber : Water Analysis 2009

4. Hasil Uji Konsentrasi DNA Menggunakan Spektrofotometer Nanodrop

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
P	254,61	5,092	2,341	2	0,62
S1	108,71	2,174	1,246	1,74	0,32
S4	64,73	1,295	1,295	1,6	0,19
S6	56,95	1,139	1,139	1,99	0,17
S8	77,67	1,553	0,793	1,96	0,23

5. *Polymerase Chain Reaction (PCR)* gradient

Sample ID	Konsentrasi DNA (ng/ul)	Suhu Annealing
P	50	50 °C
P	50	50,5 °C
P	50	51 °C
P	50	52 °C
P	50	53,2 °C
P	50	54,4 °C
P	50	55,6 °C
P	50	56,8 °C
P	50	58 °C
P	50	59 °C
P	50	59,5 °C
P	50	60 °C

LAMPIRAN 2

1. Pembuatan Medium Lactosa Broth (LB)

Ditimbang Lactosa Broth (LB) sebanyak 16,25 gr

Ditambahkan aquades sebanyak 1250 mL

Diaduk sampai homogen menggunakan pengaduk

Dipanaskan di atas hotplate sampai mendidih

Sterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit 121 °C 1 atm

2. Pembuatan Medium *Eosyn Methylene Blue* agar (EMB agar)

Ditimbang EMBA sebanyak 11,238 gr

Ditambahkan aquades sebanyak 300 mL

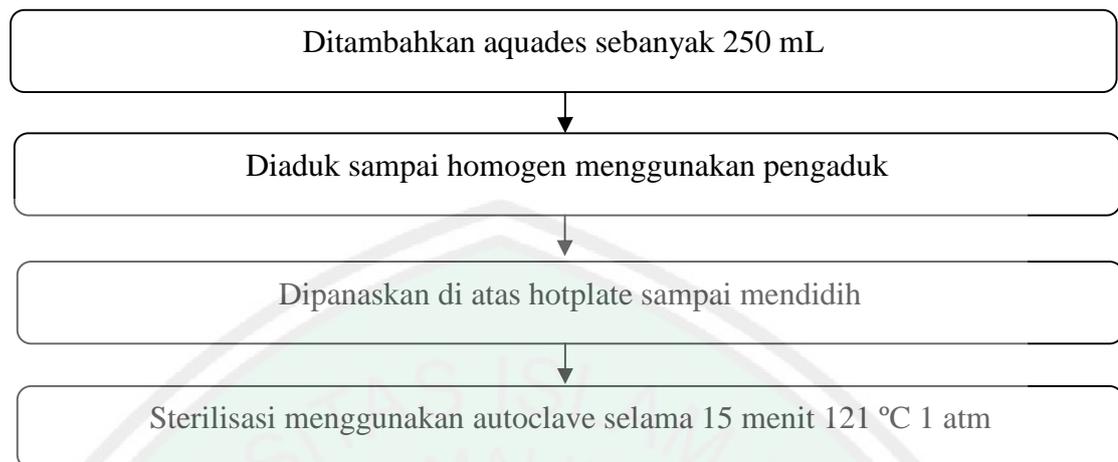
Diaduk sampai homogen menggunakan pengaduk

Dipanaskan di atas hotplate sampai mendidih

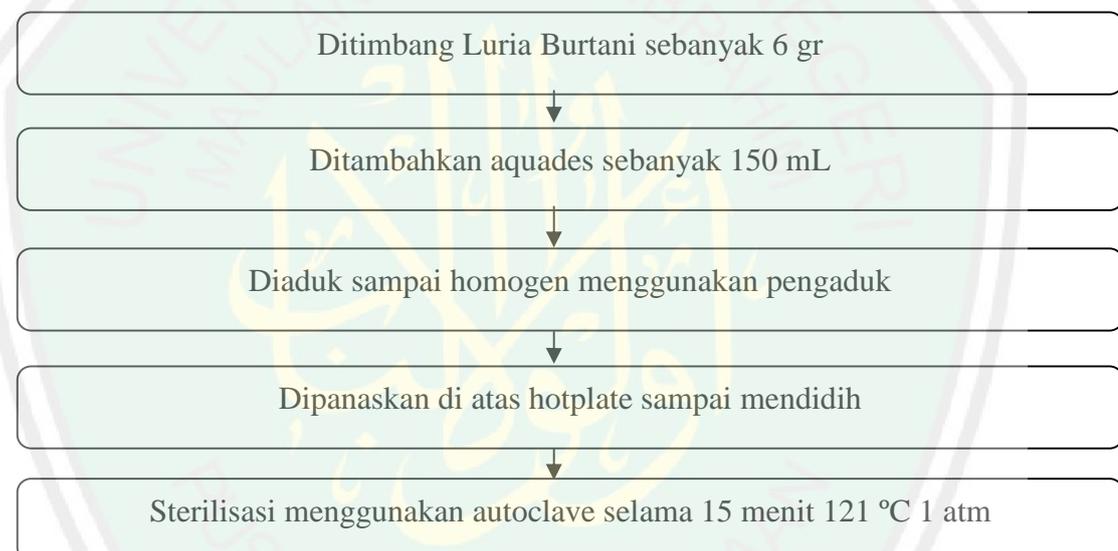
Sterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit 121 °C 1 atm

3. Pembuatan Medium *Nutrient Agar* (NA)

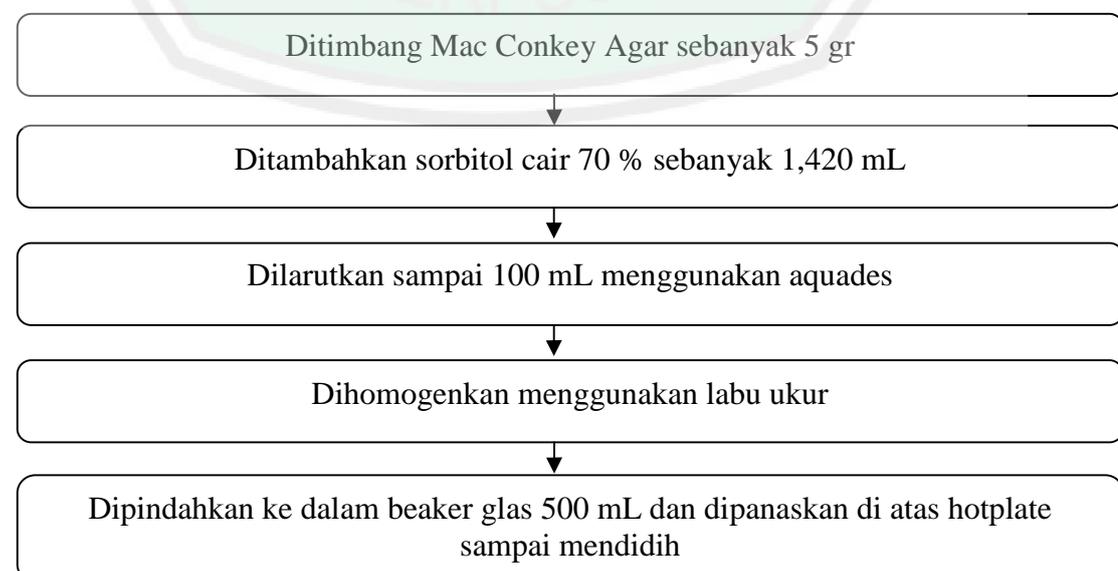
Ditimbang NA sebanyak 5 gr



4. Pembuatan Medium *Luria Burtani* (LB)



5. Pembuatan Medium *Mac Conkey* agar dengan Sorbitol



Sterilisasi menggunakan autoclave selama 15 menit 121 °C 1 atm

6. Pewarnaan Gram

Diambil 1 ose dari isolat bakteri yang telah didapat

↓
Ditetesi aquades steril 1 tetes

↓
Dikeringkan di atas bunsen

↓
Ditetesi Kristal violet 1-2 tetes

↓
Dibiarkan selama 1 menit, setelah itu dibilas menggunakan akuades steril dan dikeringkan di atas bunsen

↓
Ditetesi Iodin 1-2 tetes

↓
Dibiarkan selama 1 menit, setelah itu dibilas menggunakan akuades steril dan dikeringkan di atas bunsen

↓
Ditetesi alkohol 70% 1 tetes

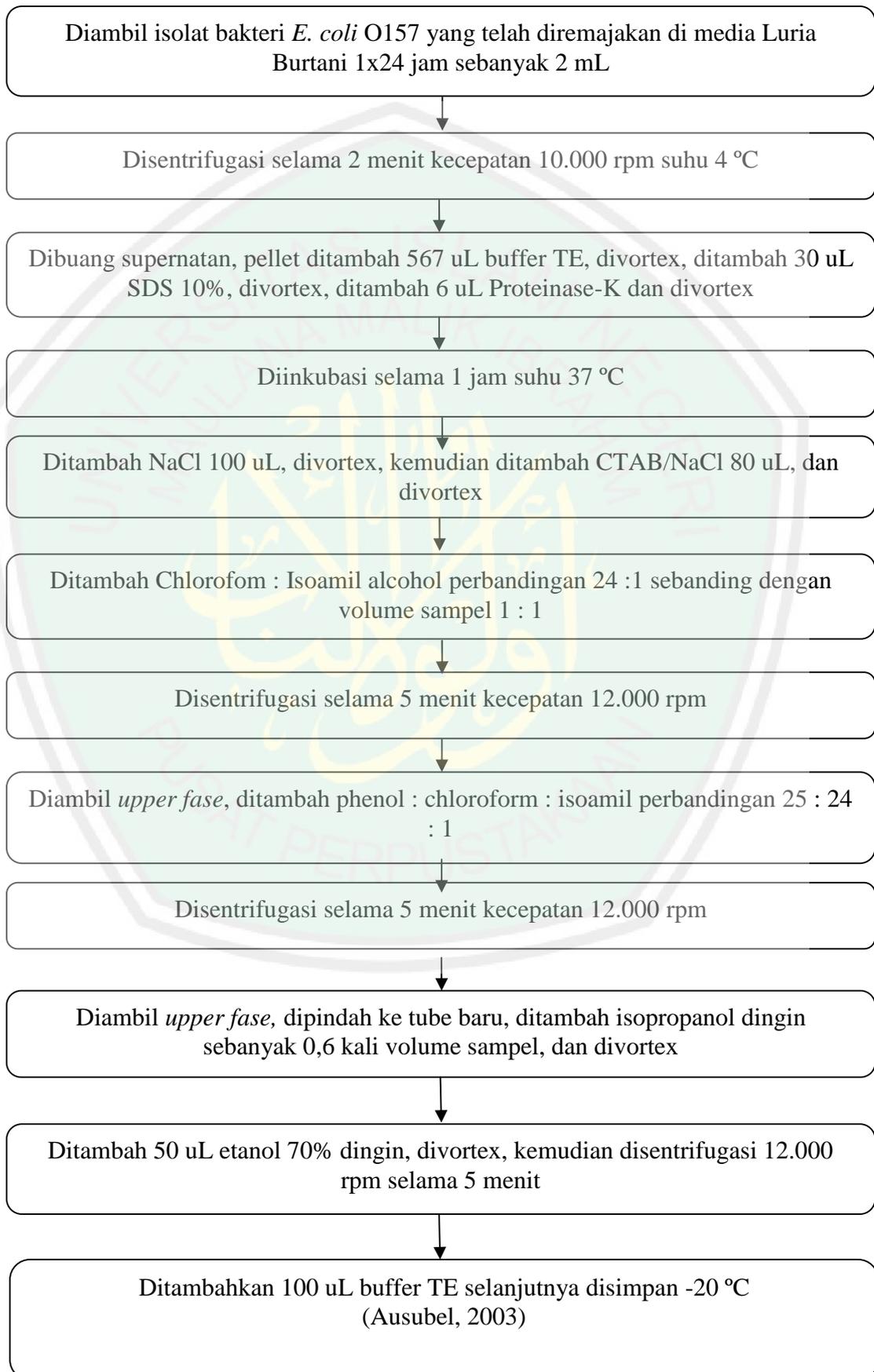
↓
Dibiarkan selama 30 detik, setelah itu dibilas menggunakan akuades steril dan dikeringkan di atas bunsen

↓
Ditetesi safranin 1 tetes

↓
Dibiarkan selama 30 detik, setelah itu dibilas menggunakan akuades steril dan dikeringkan di atas bunsen

↓
Preparat siap diamati

7. Isolasi DNA



8. Elektroforesis Hasil Isolasi DNA

Ditimbang agarose sebanyak 0,4 gr dan ditambahkan 40 mL buffer TE 1X kemudian dimasukkan *microwave*

Dituang larutan agarose di tempat pembuatan gel agarose, ditunggu selama 1-2 jam

Dimasukkan komposisi dari masing-masing well gel agarose sebagai berikut.

1. 2 uL nuclease water
2. 0,7 uL loading dye
3. 3 uL sampel hasil isolasi DNA

(Khusus marker hanya 3 uL tanpa campuran loading dye dan nuclease water)

Elektroforesis disetting selama 50 menit voltase 60 V

Setelah selesai *running*, gel agarose direndam dalam EtBr selama 15 menit

Dimasukkan gel agarose dalam alat UV-transiluminator untuk dilihat hasilnya

9. PCR

Disiapkan komponen untuk PCR per tube sebagai berikut.

1. 3 uL sampel DNA
2. 2 uL nuclease water
3. 1 uL primer forward
4. 1 uL primer reverse
5. 5 uL PCR master mix

Disetting alat *thermal cyclor* sebagai berikut.

- Predenaturasi 94 °C selama 15 menit
- Denaturasi 94 °C selama 1 menit
- Annealing 57 °C selama 1 menit 15 detik
 - Ektensi 72 °C selama 30 detik
- Final ekstensi 72 °C selama 24 jam

↓
Hasil PCR

10. Elektroforesis Hasil PCR

Ditimbang agarose sebanyak 0,6 gr dan ditambahkan 40 mL buffer TE 1X kemudian dimasukkan *microwave*

Dituang larutan agarose di tempat pembuatan gel agarose, ditunggu selama 1-2 jam

Dimasukkan komposisi dari masing-masing well gel agarose sebagai berikut.

1. 2 uL nuclease water
2. 0,7 uL loading dye
3. 3 uL sampel hasil isolasi DNA

(Khusus marker hanya 3 uL tanpa campuran loading dye dan nuclease water)

Elektroforesis disetting selama 60 menit voltase 75 V

Setelah selesai *running*, gel agarose direndam dalam EtBr selama 15 menit

Dimasukkan gel agarose dalam alat UV-transiluminator untuk dilihat hasilnya

LAMPIRAN 3

(Dokumentasi Penelitian)

A. Lokasi Pengambilan Sampel



Peternak 1



Peternak 5



Peternak 3



Peternak 4



Peternak 2



Peternak 6



Peternak 7

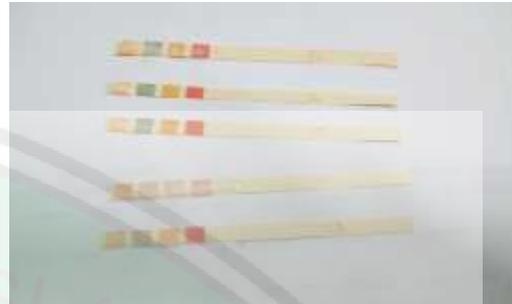


Peternak 8

B. Sampel dan Pengujian pH



Sampel nomor 1-5



Nilai pH nomor sampel 1-5



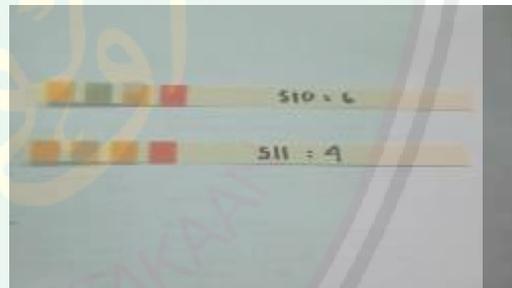
Sampel nomor 6-9



Nilai pH nomor sampel 6-9



Sampel nomor 10-11



Nilai pH nomor sampel 10-11



Nilai pH nomor sampel 12-15

C. Uji Pendugaan dengan medium Lactosa Broth



Tabung durham positif



Tabung durham negatif

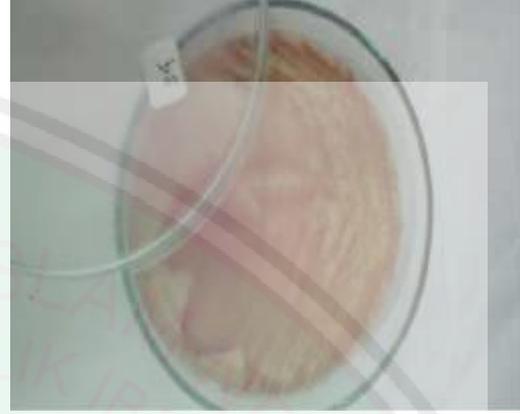
D. Uji Penegasan di Media EMB agar

Koloni *Escherichia coli* di media EMB agar



E. Inokulasi di Media Selektif Diferensial *E. coli* O157

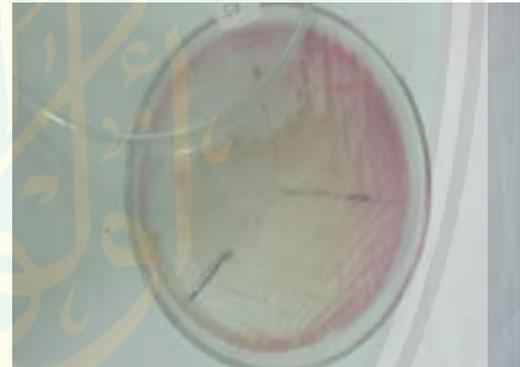
Isolat dari S1



Isolat dari S4



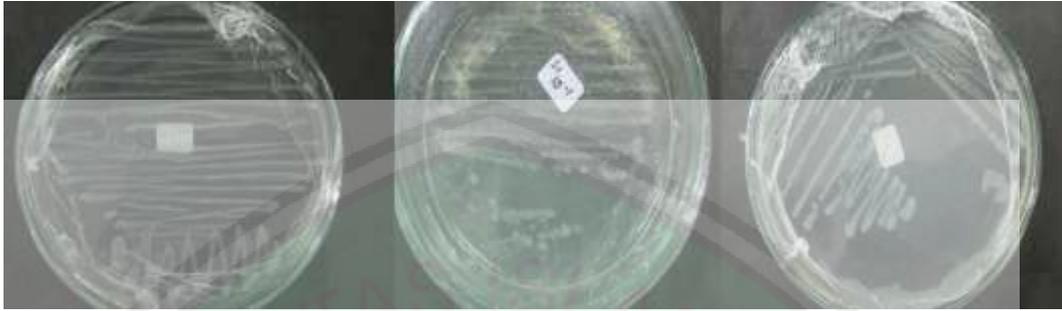
Isolat dari S6



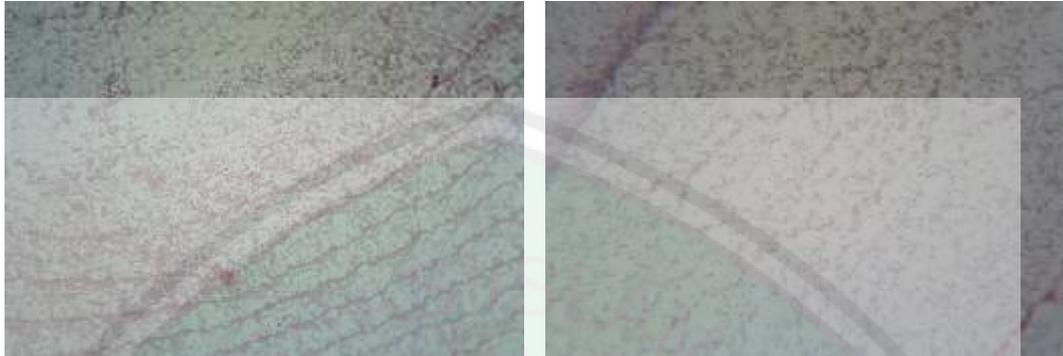
Isolat dari S8



Isolat Kontrol Positif *E. coli* O157 tidak memiliki kemampuan untuk memfermentasikan sorbitol sehingga koloninya berwarna *colourless*

F. Subkultur di Medium NA (cawan petri dan miring)

G. Pewarnaan Gram

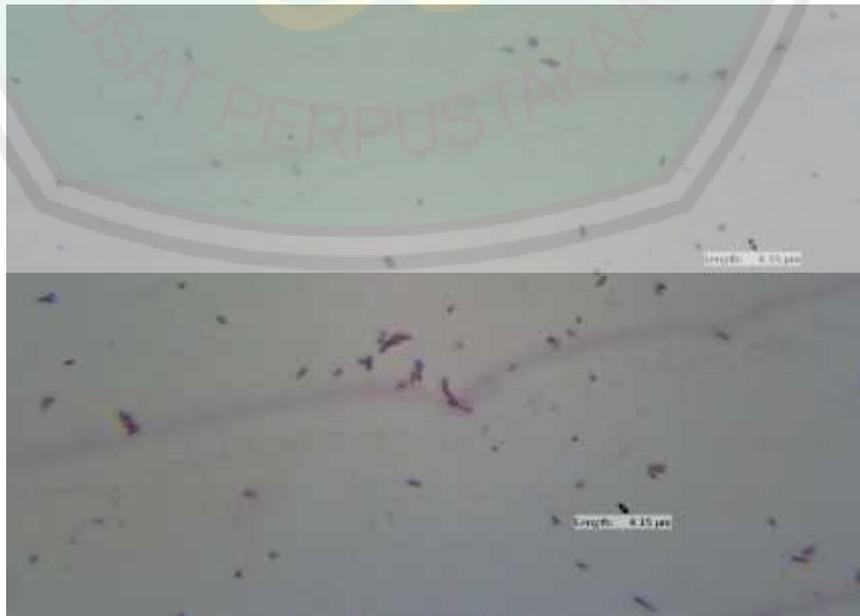


S1

S6

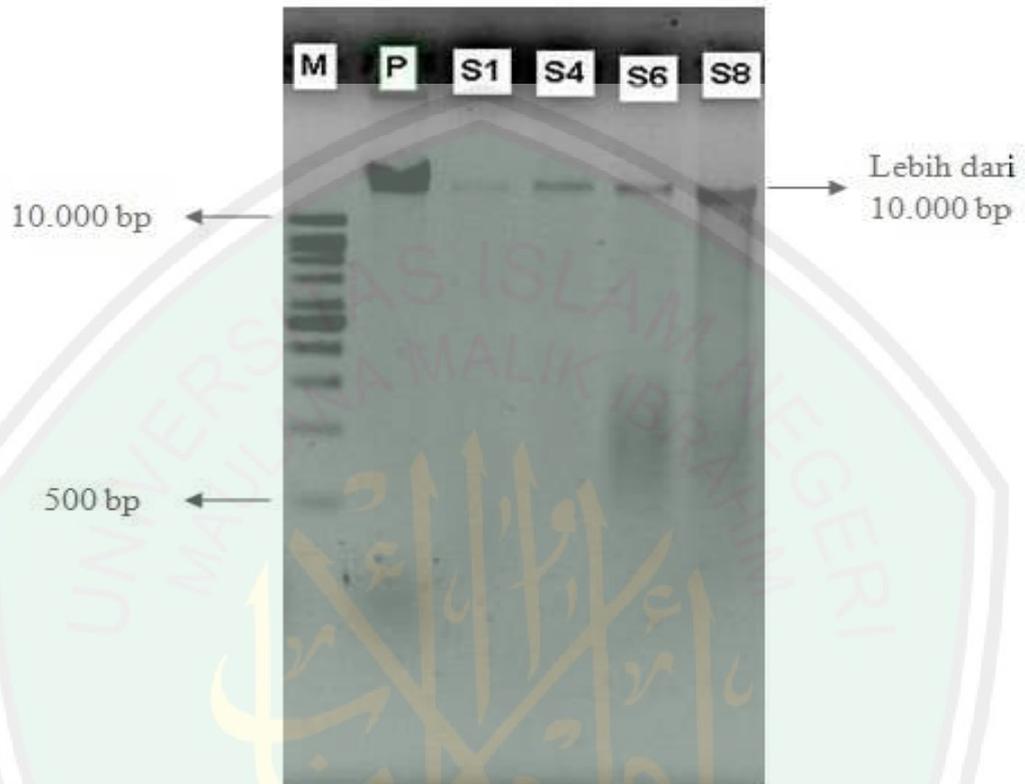


S8



S4

H. Isolasi DNA





KEMENTERIAN AGAMA RI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
 Jl.Gajayana No. 50 Malang (0341)551345 Fax.(0341)572533

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Faizatul Izza
 NIM : 12620089
 Program Studi : Biologi
 Pembimbing Biologi : Kholifah Holil, M. Si
 Judul Skripsi : Deteksi Cemaran Bakteri Patogen *Escherichia coli*
 O157:H7 pada Susu Sapi Perah secara Konvensional dan Molekuler

No	Tanggal	Hal	Tanda tangan
1	02-02-2016	Konsep Penelitian	
2	05-02-2016	Judul Penelitian	
3	19-02-2016	BAB I	
4	10-03-2016	BAB I	
5	25-03-2016	BAB I	
6	30-03-2016	BAB I	
7	13-04-2016	BAB I	
8	11-05-2016	BAB I	
9	30-05-2016	BAB I	
10	08-06-2016	BAB I	
11	22-06-2016	BAB II	
12	02-08-2016	BAB III	
13	11-11-2016	BAB IV	
14	20-11-2016	BAB IV	
15	12-12-2016	BAB IV	
16	20-12-2016	BAB IV	
17	22-12-2016	BAB IV	
18	27-12-2016	BAB IV	
19	30-12-2016	BAB V	
20	03-01-2017	BAB I,II,III,IV, dan V	

Malang, 30 Desember 2016
 Mengetahui,
 Ketua Jurusan Biologi,

Pembimbing Biologi

Kholifah Holi, M. Si
 NIP. 19751106 200912 2 002

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.
 NIP. 19741018 200312 2 002



**KEMENTERIAN AGAMA RI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**
Jl.Gajayana No. 50 Malang (0341)551345 Fax.(0341)572533

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Na Nama : Faizatul Izza
NIM : 12620089
Program Studi : Biologi
Pembimbing Agama : Umaiyyatus Syarifah, M. A
Judul Skripsi : Deteksi Cemaran Bakteri Patogen *Escherichia coli* O157:H7 pada Susu Sapi Perah secara Konvensional dan Molekuler

No	Tanggal	Hal	Tanda tangan
1	22-06-2016	BAB I,II, III	
2	22-12-2016	BAB IV	
3	30-12-2016	BAB I,II,III,IV, dan V	

Pembimbing Agama

Umaiyyatus Syarifah, M. A
NIP. 19820925 200901 2 005

Malang, 30 Desember 2016
Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi,

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002