

**RISALAH PERTEMUAN ILMIAH
PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN
TEKNOLOGI ISOTOP DAN RADIASI
1999/2000**

Jakarta, 23 - 24 Februari 2000

**Tema :
Peranan Teknologi Isotop dan Radiasi
untuk Mensejahterakan Masyarakat**



**BADAN TENAGA NUKLIR NASIONAL
PUSLITBANG TEKNOLOGI ISOTOP DAN RADIASI**

- Penyunting :
- | | |
|------------------------------------|---------------|
| 1. Dr. F. Suhadi, APU | P3TIR - BATAN |
| 2. Dr. Ir. Moch. Ismachin, APU | P3TIR - BATAN |
| 3. Ir. Simon Manurung, M.Sc | P3TIR - BATAN |
| 4. Ir. Elsje L. Sisworo, M.Si, APU | P3TIR - BATAN |
| 5. Dra. Nazly Hilmy, Ph.D, APU | P3TIR - BATAN |
| 6. Dr. Singgih Sutrisno, APU | P3TIR - BATAN |
| 7. Marga Utama, B.Sc, APU | P3TIR - BATAN |
| 8. Ir. Wandowo | P3TIR - BATAN |
| 9. Dr. Made Sumatra, M.Si | P3TIR - BATAN |
| 10. Dr. Darmawan Darwis | P3TIR - BATAN |
| 11. Hendig Winarno, M.Sc | P3TIR - BATAN |
| 12. Dr. Nelly D. Leswara | P3TIR - BATAN |
| 13. Dr. Komarudin Idris | P3TIR - BATAN |
- (Universitas Indonesia)
(Institut Pertanian Bogor)

PERTEMUAN ILMIAH PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN TEKNOLOGI ISOTOP DAN RADIASI (2000 : JAKARTA), Risalah pertemuan ilmiah penelitian dan pengembangan teknologi isotop dan radiasi, Jakarta, 23 - 24 Februari 2000 / Penyunting, F. Suhadi ... (et al) -- Jakarta : Badan Tenaga Nuklir Nasional, Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi, 2000.
1 jil. ; 30 cm

Isi jil. 1. Pertanian, peternakan, proses industri, hidrologi, dan lingkungan

ISBN 979-95709-5-6

I. Isotop - Seminar I. Judul II. Suhadi, F.

541.388

Alamat : Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi
Jl. Cinere Pasar Jumat
Kotak Pos 7002 JKSKL
Jakarta 12070
Telp. 021-7690709
Fax. 021-7691607; 7513270
E-mail pairlib@hotmail.com; sroji@batan.go.id

PENGANTAR

Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional (P3TIR-BATAN) telah menyelenggarakan Pertemuan Ilmiah Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi ke 12, di Jakarta tanggal 23 dan 24 Februari 2000. Pertemuan ilmiah ini bertujuan untuk menyebarluaskan hasil-hasil penelitian teknologi isotop dan radiasi serta sebagai sarana tukar menukar informasi diantara para peneliti serta para peneliti dan industriawan guna lebih mendayagunakan teknologi isotop dalam bidang industri dan untuk lebih memperluas wawasan para peneliti.

Pertemuan ilmiah ini dihadiri oleh 176 orang peserta (45 orang peserta undangan dan 131 orang peserta lainnya) yang terdiri dari para ilmuwan dan peneliti baik dari lingkungan Batan maupun dari berbagai instansi pemerintah seperti Menteri Negara Riset dan Teknologi, Departemen Kesehatan, Balai Penelitian Bioteknologi - Bogor (BalitBio), Balai Penelitian Veterinaria - Bogor, Pusat Veterinaria - Surabaya (Pusvetma); Perguruan tinggi yaitu Universitas Indonesia -Jakarta, Institut Pertanian Bogor, Universitas Andalas - Padang, Universitas Brawijaya - Malang dan Universitas Udayana - Bali; serta pihak swasta yaitu PT. Perkasa Sterilindo, PT. Pupuk Sriwijaya, PT. Indo Farma, PT. Ristra Indolabs, Japan Atomic Industrial Forum (JAIF), Japan Atomic Energi Research Institute, Japan.

Risalah pertemuan ilmiah ini memuat seluruh makalah yang dipresentasikan dalam pertemuan tersebut yaitu 6 makalah utama/undangan dan 39 makalah peserta. Sedangkan makalah yang tidak dipresentasikan, tidak dimuat dalam risalah ini.

Risalah pertemuan ini diharapkan dapat menambah sumber informasi dan ilmu pengetahuan yang berkaitan dengan teknologi nuklir bagi pihak yang membutuhkan untuk menunjang pembangunan nasional dimasa datang.

Penyunting,

DAFTAR ISI

Pengantar	i
Daftar Isi	iii
Laporan Ketua Panitia Pertemuan Ilmiah	vii
Sambutan Kepala Badan Tenaga Nuklir Nasional	ix
MAKALAH UTAMA	
Arah Kebijakan Riset dan Teknologi dalam Memasuki Milenium Ketiga A. AZIZ DARWIS (Asisten Menristek Bidang Pengembangan Ristek)	1
MAKALAH UNDANGAN	
Community Development by Radiation Processing of Natural Resources Keizo Makuuchi (Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment, JAERI, Japan)	9
Perkembangan Penggunaan Teknik Radioperunut dalam Industri WANDOWO (P3TIR, BATAN)	11
Arti Strategis Teknik Radiotracer dan Radioscanning dalam Industri Pupuk WIBISONO SOEYOSO DAN M. ABBAD (P.T. Pupuk Sriwijaya)	17
Langkah-langkah Strategis untuk Menjadikan Tanaman Obat Asli Indonesia Menjadi Sediaan Fitofarmaka JAMES M. SINAMBELA (P.T. Indo Farma)	21
Potensi Tumbuhan Obat Asli Indonesia Sebagai Produk Kesehatan H. M. HEMBING WIJAYAKUSUMA (Himpunan Pengobatan Tradisional dan Akupuntur Se-Indonesia)	25
MAKALAH PESERTA	
Gamma radiation induce clonal variation in <i>Catharantus roseus</i> (L) Don. SUMARYATI SYUKUR	33
Pengembangan teknik " ³² P- post labelling" untuk mendeteksi dini risiko kanker BUDIAWAN	39
Penggunaan metode <i>radioassay</i> teknik fase padat dalam reaksi fiksasi α -Kobratoksin terhadap reseptor koligernik NURLAILA Z.	45
Perbandingan dua formula radiofarmaka sidik otak ^{99m} Tc-ESD beserta karakteristiknya NANNY KARTINI, KUSTIWA, RUKMINI ILYAS, DAN ISWAHYUDI	51
Pembentukan radikal bebas pada <i>Graft</i> tulang manusia dan <i>Bovine</i> iradiasi BASRIL ABBAS, SUTJIPTO SUDIRO, DAN NAZLY HILMY	57
Pengaruh iradiasi sinar gamma pada <i>Salmonella chester</i> dan sensitivitasnya terhadap antibiotika T. HASAN BASRY	63
Pengujian isolat klinik <i>Mycobacterium tuberculosis</i> resisten terhadap beberapa antibiotika dengan metode reaksi berantai polimerase / <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) MARIA LINA R., DADANG, S., DAN F. SUHADI	69

Deteksi cepat bakteri <i>Escherichia coli</i> enterohemoragik (EHE) dengan metode PCR (Polymerase Chain Reaction) DADANG SUDRAJAT, MARIA LINA R, DAN F. SUHADI	75
Studi radikal bebas biji pulasari (<i>Alyxia reinwardtii</i> . BI) hasil radiasi gamma menggunakan <i>Electron Spin Resonance</i> (ESR) ERIZAL DAN RAHAYU CHOSDU	81
Aplikasi program database dalam seleksi galur mutan sorghum (<i>Sorghum bicolor</i> L.) SOERANTO, H.	87
Proporsi sumbangan Nitrogen oleh tanah, pupuk dan <i>Pseudomonas putida like</i> dalam tanaman sorghum pada inceptisol Sumatra Selatan A.A.I. KESUMADEWI, ISWANDI ANAS, D.A. SANTOSA, DAN ELSJE L. SISWORO	95
Analisis pemberian limbah pertanian abu sekam sebagai sumber silikat pada andisols dan oxisol terhadap pelepasan fosfor terjerap dengan teknik perunut ³² P ILYAS, SYEKHFANI, DAN SUGENG PRIJONO	103
Serapan N berasal dari sludge iradiasi yang dikombinasikan dengan pupuk N oleh tanaman terong M.M. MITROSUHARDJO, HARYANTO, S. SYAMSU, HARSOJO DAN N. HILMY	111
Tanggapan tanaman padi sawah terhadap pemadatan tanah IDAWATI DAN HARYANTO	115
Hasil gabah dan sumbangan N pupuk yang dipengaruhi oleh pemberian Zeolit dan pupuk hijau Sesbania pada tanaman padi sawah HARYANTO, IDAWATI DAN TAMSIL LAS	121
Pengamatan dinamika populasi dan penangkapan massal lalat buah <i>Bactrocera carambolae</i> (Drew & Hancock) untuk pengendalian di kebun mangga A.N. KUSWADI, M. INDARWATMI, I.A. NASUTION, D. SIKUMBANG DAN T. HIMAWAN	127
Pemanfaatan ragi produk lokal untuk substitusi ragi torula dalam formulasi makanan buatan larva lalat buah (<i>Bactrocera carambolae</i> Drew & Hancock) D. SIKUMBANG, I.A. NASUTION, M. INDARWATMI, DAN A.N. KUSWADI	133
Efisiensi N-Urea pada padi sawah yang diaplikasikan dengan <i>azolla</i> HAVID RASJID, ELSJE L. SISWORO, Y. WEMAY, DAN W.H. SISWORO	139
Uji aplikasi formulasi pelepasan terkendali insektisida karbofuran pada tanaman padi varietas cilosari M. SULISTYATI, ULFA T.S, SOFNIE M.CH., A.N. KUSWADI, DAN M. SUMATRA	145
Translokasi herbisida 2,4-D- ¹⁴ C pada tanaman gulma dan padi pada sistem persawahan SOFNIE M. CHAIRUL, MULYADI DAN IDAWATI	151
Pengaruh iradiasi terhadap infektivitas metaserkaria <i>Fasciola gigantica</i> pada kambing M. ARIFIN, BOKY J.T., DAN TARMIZI	157
Pengaruh vaksinasi dengan larva tiga <i>Haemonchus contortus</i> iradiasi terhadap respon kekebalan pada domba BERIAJAYA DAN SOEKARDJI P	163
Kultivasi jamur kuping (<i>Auricularia</i> sp.) dalam media tandan kosong kelapa sawit dan serbuk gergaji hasil iradiasi ENDRAWANTO DAN E. SUWADJI	169
Limbah agroindustri dan peternakan ayam sebagai pakan tambahan ikan nila HARSOJO, ANDINI, L.S., ROSALINA, S.H. DAN SUWIRMA, S.	175

Pengukuran serapan polutan gas NO ₂ pada tanaman tipe pohon, semak dan penutup tanah dengan menggunakan gas NO ₂ berlabel ¹⁵ N NIZAR NASRULLAH, SOERTINI GANDANEGARA, HENY SUHARSONO, MARIETJE WUNGKAR DAN ANDI GUNAWAN	181
Interaksi uap reservoir dan aquifer di sekelilingnya pada lapangan panas bumi Kamojang ZAINAL ABIDIN, WANDOWO, DJIONO, ALIP, DAN WIBAGIYO	187
Penelitian asal-usul berbagai sumber air di sekitar bendungan Ngancar Wonogiri, Jawa Tengah dengan teknik isotop alam PASTON SIDAURUK, INDROJONO, WIBAGIYO, BUNGKUS PRATIKNO, DAN EVARISTA RISTIN	195
Studi arah dan penyebaran rembesan air Danau Batur menggunakan isotop alam Oksigen-18 dan Deuterium WIBAGIYO, INDROYONO, PASTON S, ZAINAL A, EVARISTIN	201
Penentuan lokasi pembanding berdasarkan distribusi ¹³⁷ Cs lapisan tanah dari beberapa lokasi stabil NITA SUHARTINI, DARMAN, HARYANTO, DAN DJAROT AS.	207
Penentuan nilai rasio isotop Oksigen (¹⁸ O/ ¹⁶ O) dan Sulfur (³⁴ S/ ³² S) dari BaSO ₄ DIN 5033 (MERCK) untuk standar internal EVARISTA RISTIN P.I, PASTON SIDAURUK, WIBAGYO, DJIONO, DAN SATRIO	217
Scanning kolom proses dengan teknik serapan sinar gamma di UP-IV Pertamina Cilacap SIGIT BUDI SANTOSO, KUSHARTONO, BISANA, DAN EKO MULYANTO	225
Pengukuran tebal pipa terselubung dengan teknik radiografi tangensial menggunakan sumber Iridium-192 SOEDARDJO	229
Pelapisan permukaan pelepah batang pisang batu (<i>Musa brachycarpa</i>) dengan radiasi sinar-UV SUGIARTO DANU, AGUS NURHADI, RITA PUSPITA, DAN ANIK SUNARNI	237
Sifat mekanik komposit campuran Zeolit-PVA yang diiradiasi sinar-γ ⁶⁰ Co DARSONO, SUGIARTO DANU, DAN TAMZIL LAS	245
Pengaruh radiasi sinar-γ dan penambahan kalsium karbonat pada sifat fisika dan mekanik kompon karet alam SUDRADJAT ISKANDAR, ISNI MARLIYANTI, KADARIJAH, DAN MADE SUMARTI KARDHA	251
Studi perbandingan degradasi secara enzimatik campuran CPP/Bionolle dan CPP/PCL dengan modic NIKHAM, FUMIO YOSHII DAN K. MAKUUCHI	259
Sintesis dan karakterisasi Wolfram - Ftalosianin untuk bahan sasaran radioisotop Wolfram-188 (¹⁸⁸ W) aktivitas jenis tinggi DUYEH SETIAWAN	269
Uji aktivitas mikrofungsi asal lingkungan tangki reaktor Triga Mark II terhadap korosi Almunium ROSMIARTY A. WAHID, LUKMAN UMAR DAN YANI YESTIANI	275
Pemisahan uranium dari hasil belah Zr dan Ru dengan menggunakan TBP 30% - dodekan dalam medium asam nitrat sebagai bahan ekstraktor R. DIDIEK HERHADY, BUSRON MASDUKI, DAN SIGIT	283

DETEKSI CEPAT BAKTERI *Escherichia coli* ENTEROHEMORAGIK (EHEK) DENGAN METODE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Dadang Sudrajat, Maria Lina R, dan F. Suhadi

Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi, BATAN, Jakarta

ABSTRAK

DETEKSI CEPAT BAKTERI *Escherichia coli* ENTEROHEMORAGIK (EHEK) DENGAN METODE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION). Telah dilakukan uji Reaksi polimerisasi berantai (PCR) untuk mendeteksi adanya bakteri *Escherichia coli* enterohemoragik O157:H7. DNA dari sel bakteri dengan metode CTAB-fenol-kloroform dan diendapkan dengan isopropanol. Untuk menguji sensitivitas dari reaksi amplifikasi PCR, dibuat seri pengenceran dari larutan DNA *E.coli* O157:H7 antara 1 µg -- 1 pg/µl. Pasangan oligonukleotida primer yang digunakan untuk reaksi amplifikasi adalah *shiga like toxin 1-forward* (SLTI-F) & *shiga like toxin 1-reverse* (SLTI-R) yang diperoleh dari gen *Shiga-Like-Toxin*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa DNA *E.coli* pada konsentrasi 1 ng/µl masih bisa dideteksi menggunakan primer SLTI-F & SLTI-R dengan fragmen DNA pada posisi 140 bp.

ABSTRACT

RAPID DETECTION OF *Escherichia coli* ENTEROHEMORRAGIC (EHEC) BACTERIA BY PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) METHODS. A Polymerase Chain Reaction (PCR) assays for detect presence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 was carried out. DNA was extracted from bacterial cells with CTAB-phenol-chloroform and precipitated with isopropanol. To test sensitivity of PCR amplified reaction, serial dilutions of *E.coli* DNA solution were prepared between 1 µg--1ng/µl. A single pair oligonucleotide primer SLTI-F & SLTI-R derived from Shiga-Like-Toxin genes was used in amplification method. The results shows that 1 ng/µl of *E.coli* DNA could be detected using the primers SLTI-F & SLTI-R with the position of 140 bp DNA fragment.

PENDAHULUAN

Escherichia coli enterohemoragik (EHEK) adalah salah satu bakteri usus patogen yang dapat menyebabkan diare hemoragik colitis (HC), hemolytic-uremic syndrome (HUS) (1). Menurut Meng dan Doyle (2), EHEK O157:H7 menyebabkan diare berdarah dan HUS.

Mengingat masih rendahnya tingkat sanitasi lingkungan di negara berkembang, penyakit diare yang disebabkan oleh bakteri *E.coli* patogen menjadi masalah penting apabila terjadi wabah. Makanan yang terkontaminasi bakteri *E.coli* khususnya EHEK menyebabkan diare yang disertai pendarahan, karena toksin SLT (Shiga like toxin) yang dihasilkannya. Penyakit ini biasanya dikaitkan dengan daging sapi dan susu yang terkontaminasi. Infeksi ini dapat dicegah dengan mengidentifikasi sumbernya antara lain makanan yang terkontaminasi (2).

Selama ini ada beberapa metode konvensional yang digunakan untuk menentukan adanya *E.coli* O157:7 enterohemoragik dari sampel makanan antara lain metode biakan (kultur), uji biokimiawi, dan uji serologis (2). Cara-cara tersebut mempunyai kelemahan dan keterbatasan, selain memerlukan waktu lama juga tidak spesifik. Cara biakan yaitu dengan mengisolasi bakteri dalam media selektif seperti yang dikembangkan oleh Doyle dan Schoeni (3). Metode ini tidak sensitif karena sampel harus mengandung $10^3 - 10^4$ sel/gram, selain itu juga memerlukan waktu lama dan mahal karena harus dilakukan uji tahap selanjutnya meliputi uji biokimia, serologis, dan verotoksisitas. Metode serologis dengan

teknik ELISA sangat cepat dan sensitif serta praktis penggunaannya dalam klinik. Cara ini didasarkan pada reaksi antara antibodi monoklonal spesifik *E. coli* dengan antigen *E.coli* O157:H7 (4). Dengan cara ini dapat dideteksi 1,5 sel/gram. Kelemahan cara ELISA adalah kurang spesifik karena akan terjadi reaksi silang dengan antibodi dari bakteri lain seperti *E.hermanii*, *Brucella* sp dan beberapa bakteri enterik lainnya. Untuk itu perlu dikembangkan cara deteksi yang cepat dan sensitif antara lain dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) berlabel isotop ^{32}P . Metode PCR dapat mendeteksi secara tepat gen yang menyandi toksin SLT (*Shiga-Like-Toxin*) dari bakteri *E.coli* O157:H7 yang terdapat dalam makanan, susu maupun fases penderita (5, 6).

Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan cara deteksi bakteri *E.coli* patogen (EHEK) dalam sampel makanan yang terkontaminasi berdasarkan teknik diatas. Pada tahap awal akan dilakukan ekstraksi DNA dari beberapa isolat *E.coli* enterohemoragik. DNA hasil isolasi diencerkan pada beberapa konsentrasi dan selanjutnya dilakukan proses amplifikasi DNA dengan PCR menggunakan oligonukleotida primer yang spesifik. Deteksi hasil amplifikasi dilakukan dengan elektroforesis gel agarose.

BAHAN DAN METODE

Bahan. Isolat bakteri *E.coli* EHEK yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain *E.coli* O157:H7 hasil

isolasi dari daging ayam yaitu isolat dengan no kode 719, 741, 743, 745, HCW, dan HCl-1 yang diperoleh dari Balitvet, Bogor. Sebagai pembandingan digunakan strain standar *E. coli* O157:H7 Adelaide. Isolat-isolat tersebut ditumbuhkan dalam media MacConkey Agar (DIFCO). Untuk keperluan isolasi DNA, bakteri ditumbuhkan dalam media Luria-Bertani (LB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari.

Isolasi DNA. Isolasi DNA bakteri *E. coli* O:157:H7 dilakukan dengan menggunakan metode Ausubel (6). Kultur bakteri yang telah tumbuh dalam media LB selama 2 hari, diambil sebanyak 15 ml. Panen sel dilakukan dengan cara sentrifugasi pada 7000 rpm selama 10 menit. Pelet sel disuspensikan dalam 5,6 ml larutan bufer 0,01 M Tris-EDTA pH 8 (TE), tambahkan larutan 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) sebanyak 300 µl, dan 30 µl larutan proteinase K (20 mg/ml). Campuran diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C dalam inkubator goyang. Tambahkan 1 ml larutan NaCl 5 M kocok secara sempurna. Kemudian ditambahkan 800 µl larutan CTAB, selanjutnya campuran diinkubasi selama 20 menit pada suhu 65°C. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menambahkan volume sama larutan kloroform/isoamilalkohol (24:1). Campuran disentrifugasi selama 10 menit pada 10.000 rpm sampai terbentuk 2 fase. Pindahkan fase air ke dalam tabung baru kemudian tambahkan volume sama larutan fenol/kloroform/isoamil alkohol dan disentrifugasi kembali selama 15 menit pada 10.000 rpm. Fase atas yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung baru kemudian ditambahkan 0,6 volume larutan isopropanol dingin untuk mengendapkan DNA. Endapan DNA dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 15 menit, kemudian dicuci dengan larutan 70% ethanol dingin. Pelet DNA murni dikeringkan dalam desikator vakum untuk selanjutnya dilarutkan dalam larutan bufer TE. Konsentrasi DNA diukur dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Konsentrasi DNA hasil isolasi kemudian dibuat pengenceran dengan larutan TE sampai 1 µg/ml untuk pengujian amplifikasi DNA.

Amplifikasi DNA. Amplifikasi DNA dengan teknik PCR dari *E. coli* EHEK menggunakan metode Gannon *et al.* (7). Reaksi PCR dikerjakan dengan total volume campuran yang mengandung 2 µg DNA target (10 µl); 10 mM tris-HCl (pH 8,3); 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂, masing-masing 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan 2,5 Unit enzim Taq DNA polimerase (Perkin Elmer Cetus). Primer yang digunakan adalah pasangan oligonukleotida SLT1-F (5'-ACACTGGATGATCTCA-GTGG-3') dan SLT1-R (5'-CTGAATCCCCCTCCAT-TATG-3') yang diperoleh dari sekuens spesifik EHEK sebanyak 2 mM. Permukaan campuran reaksi dilapisi dengan mineral oil. Reaksi PCR dilakukan dengan alat DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) menggunakan 40 siklus, yang tiap siklus terdiri dari: (1) Denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, (2) Annealing pada suhu 60°C selama 1 menit, (3) Extension pada suhu 72°C selama 2 menit. Sesudah amplifikasi campuran disentrifugasi 12.000 rpm.

Analisis Amplifikasi DNA. Hasil amplifikasi DNA *E. coli* EHEK dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarose. Lempeng gel agarose dibuat

dengan menggunakan 1% (b/v) agarose yang dilarutkan dengan larutan bufer 0,09 M Tris-Borate-0,2mM EDTA (TBE). Sejumlah 20 µl larutan DNA dimasukkan ke dalam sumuran yang terdapat dalam lempeng agarose. Sebagai gel loading bufer dipakai larutan yang terdiri dari 50% gliserol dan 0.025% bromfenolblue. Marker DNA yang digunakan adalah φ 174 Hae III (BRL). Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan tegangan listrik 100 volt selama 60 menit. Selanjutnya lempeng agar diwarnai dengan ethidium bromide. Pengambilan gambar dilakukan dengan kamera Polaroid MP-4, dibawah penyinaran sinar ultraviolet diatas Transilluminator.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi DNA *E. coli* EHEK hasil isolasi dari 7 isolat dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil rata-rata dari 3 kali percobaan isolasi DNA, mempunyai konsentrasi berkisar antara 577,00 µg/ml - 1039,5 µg/ml dengan rasio $A_{260}/A_{280} = 1,76 - 1,83$.

Nilai perbandingan hasil pembacaan pada panjang gelombang A_{260}/A_{280} adalah untuk mengetahui tingkat kemurnian DNA. Menurut Maniatis (9) nilai rasio yang paling baik antara 1,8 - 2,0. Secara umum tingkat kemurnian DNA *E. coli* EHEK hasil isolasi dalam penelitian ini cukup baik. Hasil ini juga sesuai dari gambaran pola elektrogram genomik DNA *E. coli* EHEK pada hasil analisis dengan elektroforesis gel agarose yang memperlihatkan 1 pita DNA (Gambar 1).

Pada percobaan deteksi DNA *E. coli* EHEK dengan reaksi PCR digunakan konsentrasi DNA dari hasil pengenceran sebesar 10 ng/µl dengan bantuan pasangan primer SLT1-F dan SLT1-R, menunjukkan reaksi positif untuk semua isolat yang diuji yaitu isolat 719, 741, 743, 745, HCW 157, HCl, dan strain O 157:H7 Adelaide dengan produk amplifikasi terletak pada posisi 140 bp pada lempeng elektroforesis gel agarose (Gambar 2). Pita DNA produk PCR pada isolat 719 kurang terlihat nyata, sedangkan pada isolat 741, 745, dan strain O157:H7 Adelaide pita DNA terlihat jelas. Hasil amplifikasi DNA *E. coli* EHEK dengan konsentrasi 1 ng/µl dengan menggunakan pasangan primer SLTIR dan SLTIF, masih memberikan hasil positif, untuk 6 isolat yang diuji, kecuali untuk isolat 719 sudah tidak menunjukkan adanya amplifikasi DNA (tidak terdeteksi). Hasil percobaan yang dilakukan oleh Gannon *et al.* (8) menggunakan pasangan primer yang sama untuk amplifikasi DNA *E. coli* O157:H7 yang diisolasi dari daging sapi menunjukkan hasil positif dengan fragmen PCR terletak pada posisi 600 bp pada lempeng elektroforesis agarose. Perbedaan posisi produk PCR dengan penelitian ini kemungkinan disebabkan adanya perbedaan lokasi sekuens sasaran dalam gen Shiga Toxin untuk primer SLTI.

Posisi fragmen DNA produk PCR pada penelitian ini sesuai dengan percobaan penelitian yang dilakukan Polard dkk (10) menggunakan primer yang diperoleh dari gen SLTI yaitu pada posisi 140 bp. Sensitivitas dari percobaan tersebut adalah 20 µg/µl. Sensitivitas pada penelitian ini lebih rendah yaitu sekitar 1 ng/µl.

Perbedaan sensitivitas PCR ini kemungkinan juga disebabkan oleh perbedaan banyaknya kopi sekwens DNA spesifik yang terdapat secara alami dalam DNA isolat bakteri. Selain itu sensitivitas PCR juga dipengaruhi oleh adanya kontaminan dalam proses isolasi DNA sampel, dan juga kondisi reaksi PCR seperti banyaknya siklus yang digunakan (9).

Penggunaan pasangan primer SLTI-F dan SLTI-R mempunyai prospek bila digunakan dalam deteksi dini *E.coli* O157:H7 enterohemoragik untuk galur lokal (Indonesia) karena mempunyai spesifisitas yang cukup tinggi.

KESIMPULAN

1. Amplifikasi DNA dari 7 isolat *E.coli* O157:H7 dengan teknik PCR, semua isolat menunjukkan reaksi positif dengan menggunakan pasangan primer SLTI-F dan SLTI-R dengan produk PCR terletak pada posisi 140 bp. Sensitivitas dari pasangan primer ini adalah dapat mengamplifikasi DNA *E.coli* O157:H7 dengan konsentrasi 1 ng/ul.
2. Waktu deteksi lebih cepat bila dibandingkan dengan metode konvensional yaitu 13 jam.

UCAPAN TERIMA KASIH

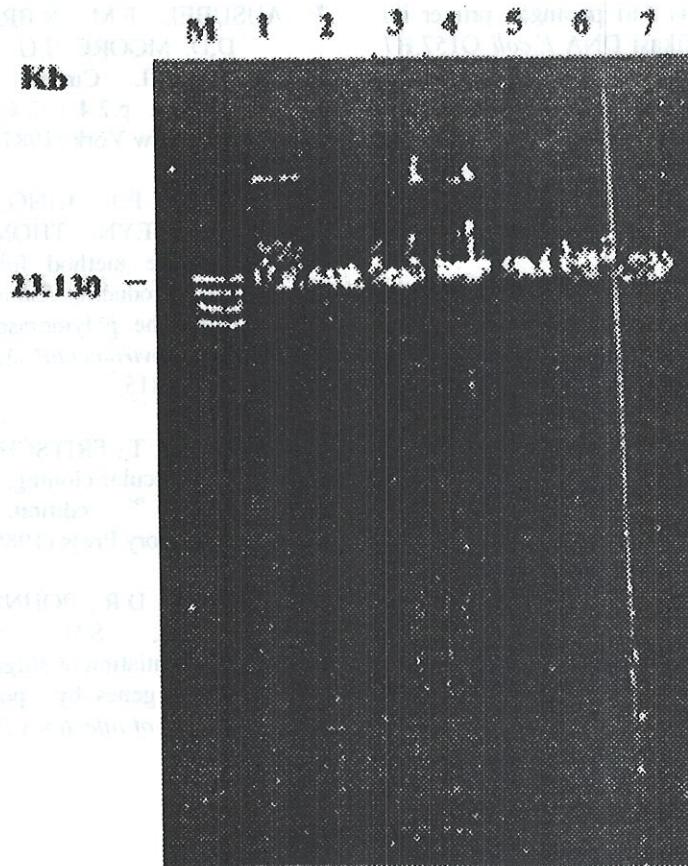
Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ny. Suheni Sulaeman, Ny. Almada, dan Sdri. Rika Heryani yang telah banyak membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

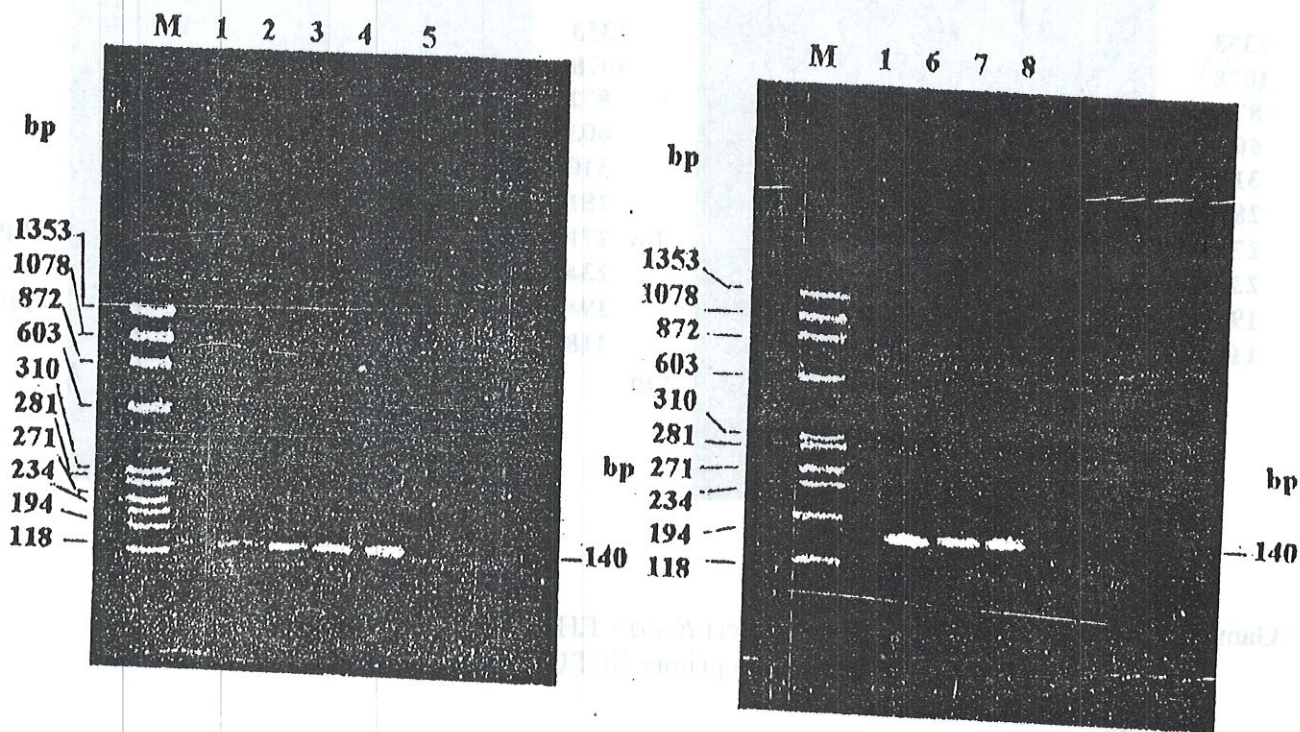
1. DOYLE, M.P., *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int. J. Food. Microbiol.* 12 (1991) 289-302.
2. MENG, J., DOYLE, M.P., ZHAO, T., and ZHAO, S., Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Trend in Food Science & Technology* 5 (1994) 179-184.
3. DOYLE, M.P., and SCHOENI, J.L., Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 2394-2396.
4. PADHYE, N.V., and DOYLE, M.P., Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 2693-2698.
5. BRIAN, M.J., FROSOLONO, M., MURAY, B.E., MIRANDA, A., LOPEZ, E.L., GOMEZ, HF., and CLEARLY, T.G., Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 30 (1992) 1801-1806.
6. BEGUM., STROCBINE, N.A., SOWERS, E.G., and JACKSON., M.P., Evaluation of technique for identification of shiga like toxin producing *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction and digoxigenin-labelled probes. *J. Clin. Microbiol.* 31 (1993) 3153-3156.
7. AUSUBEL, F.M., R.BRENT, R.E. KINGSTON, D.D. MOORE, J.G. SEDMAN, J.A., and K. STRUHL. Current protocols in molecular biology, p.2.4.1.-2.4.2. John Wiley & Sons, Inc., New York (1987).
8. GANNON, P.J., KING, R.K., KIM, J.Y, and GOLSTEYN THOMAS, E.J. Rapid and sensitive method for detection of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (1992) 3809-3815.
9. MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., and SAMBROOK, J., Molecular cloning, Laboratory Manual Book, 3A, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
10. POLLARD, D.R., JOHNSON, W.M., LIOR, H., TYLER, S.D., and ROZEE, K.R., Differentiation of shiga toxin and vero cytotoxin type 1 genes by polymerase chain reaction. *Journal of Infectious Diseases* 162 (1990) 1195-1199.

Tabel 1. Hasil analisis konsentrasi dan nilai kemurnian DNA isolat *E.coli* EHEK O157:H7

Isolat	Konsentrasi DNA (µg/ml)	Rasio A ₂₆₀ /A ₂₈₀
719	577,00	1,80
741	934,50	1,81
743	816,00	1,78
745	1039,5	1,83
HCW 157	960,00	1,83
HCI-1	753,00	1,76
Adelaide 157	685,5	1,78



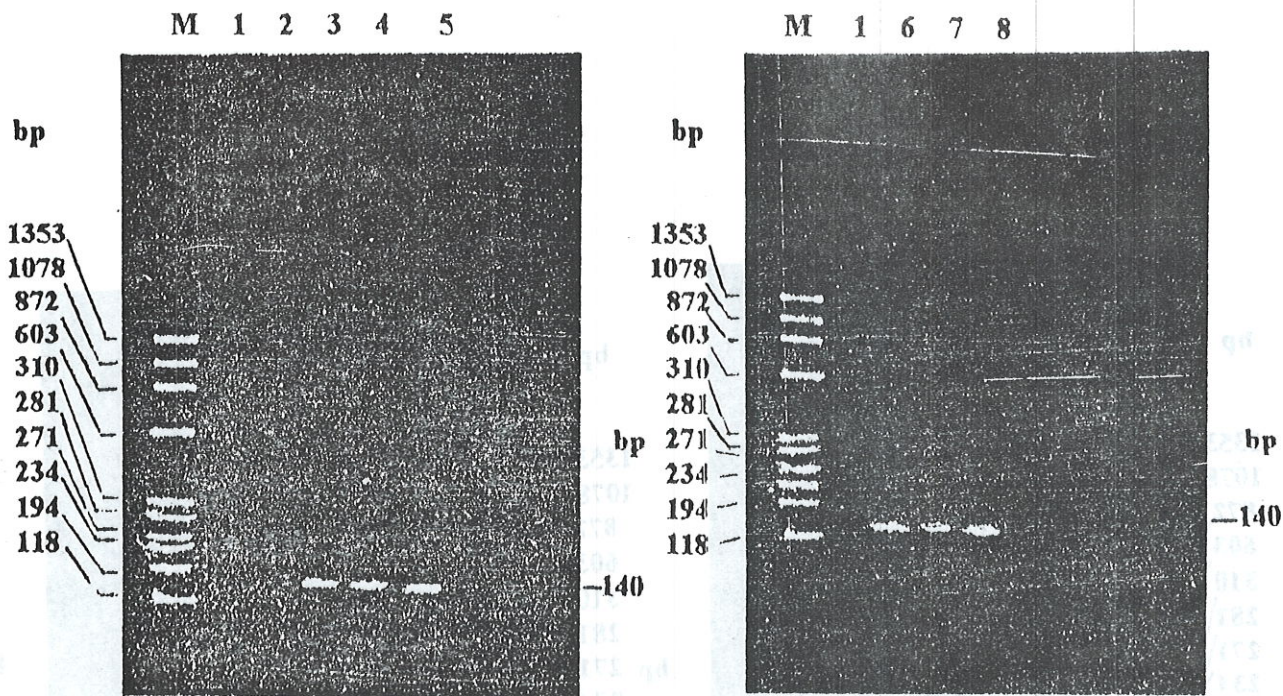
Gambar 1. Pola elektrogram genomik DNA *E.coli* EHEK dengan elektroforesis gel agarose.
 (1). DNA Marker λ Hind III, (2). Isolat 719, (3). Isolat 741, (4) Isolat 743, (5). Isolat 745, (6) Isolat HCW 157, (7) Isolat HCI-I, (8) Isolat Adelaide 157.



Gambar 2. Amplifikasi DNA isolat bakteri *E. coli* EHEK O157:H7 dengan konsentrasi 10 ng/ml menggunakan pasangan primer SLT1-F dan SLT1-R pada elektroforesis gel agarose.

Keterangan :

- M: Marker DNA ϕ 174 Hae III (BRL)
- 1 : Kontrol negatif
- 2 : Isolat 719
- 3 : Isolat 741
- 4 : Isolat 743
- 5 : Isolat 745
- 6 : Isolat HCW 157
- 7 : Isolat HCl-1
- 8 : Isolat Adelaide 157



Gambar 3. Amplifikasi DNA isolat bakteri *E. coli* EHEK O157:H7 dengan konsentrasi 1 ng/ml menggunakan pasangan primer SLT1-F dan SLT1-R pada elektroforesis gel agarose.

Keterangan :

M: Marker DNA ϕ 174 Hae III (BRL)

1 : Kontrol negatif

2 : Isolat 719

3 : Isolat 741

4 : Isolat 743

5 : Isolat 745

6 : Isolat HCW 157

7 : Isolat HC1-1

8 : Isolat Adelaide 157

DISKUSI

BASRIL

Dari beberapa metode yang disebutkan terdahulu (kultur, ELISA dan PCR), mana yang paling ekonomis ?

DADANG

Metode PCR yang lebih ekonomis, dibandingkan dengan metode konvensional (kultur, ELISA) karena selain cepat, sensitif dan spesifik.

SUDRADJAT ISKANDAR

1. Untuk mendeteksi DNA *E. coli* pada konsentrasi rendah 1 mg/ml, apakah ada cara lain yang lebih sederhana dan murah ?
2. Kalau ada, apa perbedaan dengan yang diteliti (metode PCR) ?

DADANG

1. Tidak ada, hanya dengan metode PCR yang dapat mendeteksi adanya *E. coli*, dengan menguji DNA yang pada konsentrasi dibawah 1 mg.
2. Tidak ada.