

**GAMBARAN KEPEKAAN BERBAGAI ANTIBIOTIK DAN
PROFIL PLASMID *Escherichia coli* ISOLAT AIR
SUMUR GALI KABUPATEN DEMAK**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat menyelesaikan
Pendidikan Diploma IV Kesehatan
Program Studi Analisis Kesehatan



Diajukan Oleh :

Anggita Kusumawardani

G1C012015

**PROGRAM STUDI D IV ANALIS KESEHATAN
FAKULTAS ILMU KEPERAWATAN DAN KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SEMARANG**

2016

HALAMAM PERSETUJUAN

Skripsi dengan judul “Gambaran Kepekaan berbagai Antibiotik dan Profil Plasmid *Escherichia coli* Isolat Air Sumur Gali Kabupaten Demak” oleh Anggita Kusumawardani(G1C012015).

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan D IV Kesehatan Bidang Analis Kesehatan.

Telah disetujui oleh :

Pembimbing I



Dr. Sri Darmawati, M.Si

NIK. 28.6.1026.040

Tanggal, 27 September 2016

Pembimbing II



M. Evy Prastiyanto, M.Sc

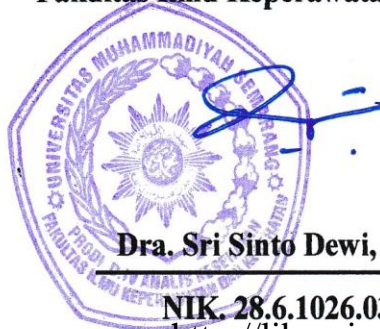
NIK. 28.6.1026.297

Tanggal, 27 September 2016

Mengetahui,

Ketua Program Studi D IV Analis Kesehatan

Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan



Dra. Sri Sinto Dewi, M.Si, Med

NIK. 28.6.1026.034




<http://lib.unimus.ac.id>

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini telah diajukan pada sidang Ujian Jenjang Pendidikan Tinggi Diploma IV Kesehatan Bidang Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang.

Tanggal Sidang : 16 September 2016

Susunan Tim Penguji :

No	Nama	Nara Sumber	Tanda Tangan	Tanggal TTD
1	Dr. Budi Santosa, M.Si. Med	Penguji I		27/09/2016
2	Dr. Sri Darmawati, M.Si	Penguji II		27/09/2016
3	M. Evy Prastiyanto, M. Sc	Penguji III		27/09/2016

**GAMBARAN SENSITIVITAS BERBAGAI ANTIBIOTIK DAN
PROFIL PLASMID *Escherichia coli* ISOLAT AIR
SUMUR GALI KABUPATEN DEMAK**

Anggita Kusumawardani¹, Sri Darmawati², M. Evy Prastiyanto³

1. Program Studi DIV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang.
- 2,3. Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang.

ABSTRAK

Sifat sensitivitas *Escherichia coli* terhadap suatu antibiotik berbeda-beda. Uji sensitivitas *E. coli* dilakukan untuk mengetahui perkembangan resistensi bakteri terhadap antibiotik. Sensitivitas *E. coli* terhadap suatu antibiotik dapat dilihat melalui DNA plasmid, karena resistensi bakteri salah satunya dikode plasmid. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui sensitivitas berbagai antibiotik (gentamisin, siprofloksasin, kloramfenikol dan ampisilin) dan profil plasmid *E. coli* isolat air sumur gali di Kabupaten Demak. Penelitian ini merupakan studi deskriptif. Populasi penelitian ini adalah air sumur gali yang terdapat di Kabupaten Demak yang letaknya dekat dengan *septic tank* yang memiliki jarak kurang dari 10 meter. Hasil uji kepekaan antibiotik 17 strain bakteri *E. coli* adalah dua dari tujuh belas strain bakteri resistensi terhadap gentamisin, dua strain yaitu SG 1A dan SG 14B resisten terhadap siprofloksasin, dua strain bakteri SG 15B dan SG 16A resisten terhadap kloramfenikol dan sebelas strain bakteri resisten terhadap ampisilin. Hasil elektroforesis plasmid isolat *E. coli* teramati memiliki dua plasmid dengan ukuran yang berbeda. Satu jenis plasmid berukuran 1000bp dan plasmid lainnya berukuran 1200 bp. Terdapat perbedaan profil plasmid dan kepekaan terhadap berbagai macam antibiotik pada setiap strain *E.coli* yang diisolasi dari air sumur gali di Kabupaten Demak.

Kata Kunci : *Escherichia coli*, kepekaan, antibiotik, plasmid, elektroforesis.

**DESCRIPTION OF VARIOUS ANTIBIOTIC SENSITIVITY AND
PROFILE PLASMID OF *Escherichia coli* ISOLATE DUG
WELL WATER AT DEMAK REGENCY**

Anggita Kusumawardani¹, Sri Darmawati², M. Evy Prastiyanto³

1. Medical Laboratory Study Program of Health and Nursing Faculty
Muhammadiyah University of Semarang.
- 2,3. Molecular Biology Laboratory at Health and Nursing Faculty
Muhammadiyah University of Semarang.

ABSTRACT

Escherichia coli has the different sensitivity characteristic to antibiotic. *E. coli* sensitivity test was conducted to determine the development of bacterial resistance to antibiotics. The sensitivity of *E. coli* to an antibiotic could be seen through a DNA plasmid, because of bacterial resistance plasmid encoded one of which. The purpose of this research was to determine the sensitivity of various antibiotics (gentamicin, ciprofloxacin, chloramphenicol and ampicillin) and the plasmid profiles of *E. coli* isolates dug wells water in Demak. The research was an descriptive study. The population in this research was dug well water found in Demak regency that located close by a septic tank has a distance of less than 10 meters. Results of antibiotic susceptibility test 17 strains of the bacterium *E. coli* was two of the seventeen strains that were SG 1A and SG 14B resistant to ciprofloxacin, two bacterials strain SG 15B and SG 16A resistant to chloramphenicol and eleven strains of bacteria resistant to ampicillin. Results of electrophoresis plasmid *E. coli* isolate was observed to have two plasmids with different sizes. One type of plasmid size of 1000bp and the other plasmid size of 1200 bp. There are differences in the plasmid profile and sensitivity to different antibiotics on any *E. coli* strains isolated from water dug wells in Demak.

Keywords : *Escherichia coli*, susceptible, antibiotic, plasmid, electrophoresis.

HALAMAN PERNYATAAN ORIGINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa :

1. Skripsi ini asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik (sarjana), baik di Universitas Muhammadiyah Semarang maupun di perguruan tinggi lain.
2. Skripsi ini murni gagasan, rumusan, dan penelitian saya sendiri, tanpa bantuan pihak lain, kecuali arahan Tim Pembimbing dan masukan Tim Penguji.
3. Dalam skripsi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas di cantumkan sebagai sumber acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila dikemudian hari, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh, serta sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi.

Semarang, 16 September 2016

Yang membuat pernyataan,



Anggita Kusumawardani

NIM. G1C012015

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat, hidayah dan Inayah-Nya, Sholawat dan salam kepada junjungan kita Baginda Rasulullah SAW beserta keluarga dan para Sahabat-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul “Gambaran Sensitivitas Berbagai Antibiotik dan Profil Plasmid *Escherichia coli* Isolat Air Sumur Gali Kabupaten Demak”.

Penyusunan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan Diploma IV Analis Kesehatan di Universitas Muhammadiyah Semarang 2016.

Penulis menyadari bahwa terselesaikannya Tugas Akhir ini tidak lepas dari bimbingan, dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dr. Sri Darmawati, M.Si Selaku Pembimbing Pertama.
2. Muhammad Evy Prastiyanto, M.Sc Selaku Pembimbing Kedua.
3. Dr. Budi Santoso, SKM, M.Si.Med Selaku Dosen Penguji.
4. Dra Sri Sinto Dewi, M.Si Med Selaku Ketua Program Studi.
5. Segenap dosen dan staf karyawan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Program Studi D IV Analis Kesehatan yang secara langsung maupun tidak telah memberikan petunjuk kepada penulis dalam penyusunan skripsi.
6. Kepada kedua orang tua tercinta yang selalu mendoakan, serta kakak yang sangat kebanggakan.
7. Kepada teman-teman DIV Analis Kesehatan angkatan 2012 yang memberikan semangat.

Penulis menyadari masih banyak ketidak sempurnaan dan kekurangan dalam penulisan tugas akhir ini. Kritik dan saran yang membangun. Semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi para pembaca.

Semarang, September 2016

Penyusun

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
SURAT PERNYATAAN ORIGINALITAS	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.5 Originalitas Penelitian.....	5
BAB II KAJIAN PUSTAKA	
2.1 Air.....	7
2.1.1 Kualitas air.....	8
2.1.2 Air sumur gali di desa Wonosalam.....	8
2.1.3 Bakteri <i>Coliform</i>	9
2.2 Bakteri <i>Escherichia coli</i>	10
2.3 Patogenesis.....	12
2.4 Antibiotik dan resistensi <i>Escherichia coli</i>	12
2.5 Plasmid bakteri.....	15
2.6 Isolasi DNA plasmid.....	16
2.7 Electrophoresis gel agarose.....	17
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Desain penelitian.....	20
3.2 Populasi dan Sampel penelitian.....	20
3.3 Variabel penelitian.....	20
3.4 Definisi operasional.....	20
3.5 Alat dan bahan.....	21
3.5.1 Bahan.....	21
3.5.2 Alat.....	21
3.6 Prosedur penelitian.....	21
3.6.1 Sterilisasi alat.....	21
3.6.2 Kultivasi bakteri.....	22
3.6.3 Uji kepekaan antibiotik.....	23
3.6.4 Isolasi plasmid.....	24
3.6.5 Separasi profil plasmid dengan gel agarosa.....	24
3.7 Alur penelitian.....	24
3.8 Teknik pengumpulan data.....	25

3.9 Pengolahan data dan analisis data	25
3.10 Tempat dan waktu penelitian.....	25
3.10.1 Tempat penelitian	25
3.10.2 Waktu penelitian.....	25
3.11 Skema prosedur penelitian	26
3.11.1 Uji sensitivitas antibiotik.....	26
3.11.2 Isolasi DNA plasmid	27
3.11.3 Separasi plasmid <i>E. coli</i> dengan gel agarosa.....	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil penelitian	29
4.1.1 Hasil uji kepekaan antibiotik	29
4.1.2 Hasil elektroforesis plasmid bakteri <i>E. coli</i>	31
4.2 Pembahasan	32
BAB V SIMPULAN	
5.1 Simpulan.....	36
5.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN-LAMPIRAN	



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Originalitas penelitian	5
Tabel 2. Definisi operasional.....	20
Tabel 3. Data uji kepekaan 17 strain bakteri E.coli terhadap antibiotik gentamisin dan siprofloksasin	31
Tabel 4. Data uji kepekaan 17 strain bakteri E.coli terhadap antibiotik kloramfenikol dan ampisilin	31



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur sel bakteri <i>E.coli</i> dengan mikrograf elektron.....	10
Gambar 2. Penggabungan faktor F pada kromosom bakteri	15
Gambar 3. Kerangka teori	18
Gambar 4. Kerangka konsep	19
Gambar 5. Alur penelitian gambaran kepekaan berbagai antibiotik dan profil plasmid <i>E.coli</i> isolat air sumur gali kabupaten Demak	24
Gambar 6. Uji kepekaan antibiotik <i>E.coli</i> isolat air sumur gali Kabupaten Demak.....	26
Gambar 7. Skema isolasi DNA plasmid <i>E.coli</i> yang diisolasi dari berbagai air sumur gali Kabupaten Demak	27
Gambar 8. Skema pemeriksaan plasmid <i>E.coli</i> dengan metode gel agarosa....	28

LAMPIRAN-LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Hasil uji kepekaan berbagai antibiotik.....	40
Lampiran 2. Pembuatan media	41
Lampiran 3. Dokumentasi penelitian.....	44



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Air merupakan kebutuhan mutlak makhluk hidup baik manusia, hewan maupun tumbuhan dan memiliki peranan penting dalam kehidupan sehari-hari. Kebutuhan manusia akan air tidak lepas dari air bersih. Seiring dengan meningkatnya jumlah penduduk, maka kebutuhan air bersih juga mengalami peningkatan. Kesadaran masyarakat terhadap ketersediaan air bersih cenderung menurun, sehingga masalah yang sering terjadi adalah pencemaran air yang digunakan untuk pemenuhan kebutuhan harian, untuk itu perlu dilakukan upaya penyediaan air bersih (Bambang et al. 2014). Penyediaan air bersih yang memenuhi standar sangat diperlukan (Hardyanti & Fitri 2006). Adanya penyediaan air yang sesuai dengan standar kualitas air dapat meminimalisir penyakit yang disebabkan oleh pencemaran air.

Menurut Kementerian Kesehatan Republik Indonesia Nomor 492/MENKES/PER/IV/2010 tentang persyaratan kualitas air minum menyatakan bahwa ada beberapa jenis parameter yang ditetapkan sebagai parameter standar kualitas air yang baik. Parameter yang tidak berhubungan langsung dengan kesehatan dan parameter yang berhubungan langsung dengan kesehatan. Parameter yang tidak berhubungan langsung dengan kesehatan dibagi menjadi dua, yaitu parameter fisika (bau, warna, total zat padat terlarut (TDS), kekeruhan, rasa dan suhu) dan parameter

kimiaawi (aluminium, besi, kesadahan, klorida, mangan, pH, *zink*, sulfat, tembaga dan amonia). Parameter yang berhubungan langsung dengan kesehatan adalah parameter mikrobiologi. Salah satu parameter mikrobiologi yang digunakan untuk indikator kualitas air adalah *Escherichia coli* dan total *Coliform*. Sumber air bersih dapat berasal dari berbagai sumber, salah satunya air sumur gali.

Air sumur galian merupakan salah satu cara penyediaan air bersih yang masih digunakan masyarakat di desa maupun kota. Air sumur galian berasal dari bawah tanah, sehingga dikhawatirkan memiliki potensi kontaminasi yang besar. Kontaminasi yang sering terjadi karena adanya cemaran air dari pembuangan kotoran atau *septic tank* yang kurang baik (Marwati et al. 2008). Masyarakat di kabupaten Demak kecamatan Wonosalam, khususnya desa Wonosalam masih menggunakan sumur gali sebagai pemenuhan ketersediaan air bersih. Berdasarkan observasi, sekitar 255 sumur yang berada di daerah Demak memiliki jarak sanitasi yang kurang baik yaitu kurang dari 10 meter dari jarak *septic tank*, sehingga dikhawatirkan air yang digunakan untuk memenuhi kebutuhan harian menjadi tercemar oleh *E. coli*.

Bakteri *E. coli* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang yang resisten terhadap panas dan tumbuh optimum pada suhu 30-37°C (Kepel et al. 2015). Sifat kepekaan *E.coli* terhadap suatu antibiotik berbeda-beda. Uji kepekaan *E. coli* dilakukan untuk mengetahui

perkembangan resistensi bakteri terhadap antibiotik (Krisnaningsih et al. 2005).

Sel bakteri *E. coli* terdapat kromosom pembawa informasi genetik. Selain kromosom, bahan genetik lain yang ditemukan adalah plasmid (Fery 2006). Plasmid merupakan molekul DNA stabil dari kromosom bakteri yang dapat diturunkan dan bereplikasi secara independen (Wibowo et al. 2011). Kepekaan *E. coli* terhadap suatu antibiotik dapat dilihat melalui DNA plasmid yang dimiliki, karena sifat resistensi bakteri dipindahkan melalui plasmid (Yenny & Herwana 2007).

Berdasarkan uji pendahuluan, telah diisolasi sebanyak 17 strain *E. coli* yang berasal dari 20 sumur gali di desa Wonosalam dan setiap sumur gali tersebut memiliki jarak kurang dari 10 meter dari *septic tank*. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang pola kepekaan *E. coli* isolat air sumur gali terhadap macam-macam antibiotik dan profil plasmidnya.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, dapat dirumuskan permasalahan yaitu bagaimanakah gambaran kepekaan berbagai antibiotik dan profil plasmid *E. coli* isolat air sumur gali Kabupaten Demak ?.

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menganalisis kepekaan *E. coli* terhadap antibiotik Ampisilin, Kloramfenikol, Siprofloksasin dan Gentamisin.
2. Menganalisis profil plasmid *E. coli* isolat air sumur gali di Kabupaten Demak.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Penulis

Sebagai penambah ilmu pengetahuan khususnya dibidang biologi molekuler tentang profil plasmid dan pola kepekaan *E. coli* isolat air sumur gali di Kabupaten Demak terhadap antibiotik.

1.4.2 Bagi Instansi

Sebagai informasi dan bahan masukan mengenai profil plasmid khususnya *E. coli* pada air sumur gali di Kabupaten Demak.

1.4.3 Bagi Pembaca

Sebagai bahan referensi dan kepustakaan khususnya pada bidang biologi molekuler.



1.5 Originalitas Penelitian

Tabel 1. Tabel originalitas penelitian

NO	Nama/Tahun /Jurnal	Judul	Metode	Hasil
1	Krisnaningsih, F, Widya Asmara, M.H. Wibowo/ 2005/ <i>Journal Sains</i>	Uji Sensitivitas Isolat <i>Escherichia coli</i> Patogen Pada Ayam Terhadap Beberapa Jenis Antibiotik	Metode didasarkan pada metode Bauer-Kirby	Adanya variasi reaksi masing-masing isolat terhadap beberapa jenis antibiotik yang digunakan yaitu <i>ampicilin</i> , <i>amoxylin</i> , <i>sterptomycin</i> , <i>doxycycline</i> , <i>erythromycin</i> , <i>lincomycin</i> dan <i>danofloxacin</i> .
2	Bhaskara, Ketut Budiasa, Ketut Tono P.G / 2012/ <i>Indonesia Medicus Veterinus</i>	Uji Kepekaan <i>Escherichia coli</i> sebagai Penyebab Kolibasilosis pada Babi Muda terhadap Antibiotika Oksitetrasiklin, Streptomisin, Kanamisin dan Gentamisin	Metode didasarkan pada metode Bauer-Kirby	<i>E. coli</i> sebagai penyebab kolibasilosis pada babi muda di Desa Sudimara menunjukkan 100 % resisten terhadap antibiotik oksitetrasiklin dan streptomisin. Kuman <i>E. coli</i> sebagai penyebab kolibasilosis pada babi muda di Desa Sudimara menunjukkan 60 % intermediate, 10 % resisten dan 30 % sensitif terhadap antibiotik kanamisin. Kuman <i>E. coli</i> sebagai penyebab kolibasilosis pada babi muda di Desa Sudimara menunjukkan 80 % sensitif dan 20 % resisten terhadap antibiotik gentamisin.
3	Odeyemi, A T, Ajayi, A O, Igbalajobi, O A / 2013/ <i>Journal of Microbiology Research</i>	Profil plasmid bakteri yang terisolasi dari Air terjun Arinta di Ipole-Iloro Ekiti	Metode Elektroforesis Gel Agarosa	Delapan puluh persen (80%) berbagai macam plasmid, antara lain <i>Salmonella</i> spp. mengandung plasmid dengan berat molekul 23.1kb, 2.51 kb dan 2.71kb, <i>Klebsiella</i> spp. dan <i>Aeromonas</i> spp. membawa tiga plasmid dengan berat molekul yang sama 23.1kb, 2.58kb dan 2.95kb, <i>Citrobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp. <i>E.coli</i> masing-masing mengandung dua plasmid dengan berat molekul yang sama 23.1kb dan 2.62kb, juga <i>Pseudomonas</i> spp. dan <i>Micrococcus</i> spp. memiliki 1 plasmid masing-masing dengan berat molekul 23.1kb, sementara plasmid yang tidak terdeteksi terdapat pada <i>Bacillus</i> spp. dan <i>Klebsiella</i> spp.

Berdasarkan data Originalitas Penelitian di atas, dapat dilihat perbedaan penelitian yang akan dilakukan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Krisnaningsih et al (2005) dengan judul Uji Sensitivitas Isolat *E. coli* Patogen Pada Ayam Terhadap Beberapa Jenis Antibiotik, begitu pula dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Baskara et al (2012) tentang Uji Kepekaan *E. coli* sebagai Penyebab Kolibasilosis pada Babi Muda terhadap Antibiotika Oksitetrasiklin, Streptomisin, Kanamisin dan Gentamisin dan juga penelitian yang telah dilakukan oleh Odeyemi et al (2013) tentang Profil plasmid bakteri yang terisolasi dari Air terjun Arinta di Ipole-Iloro Ekiti. Perbedaan penelitian ini dapat dilihat dari isolat bakteri dan sampel yang di teliti. Penelitian yang akan dilaksanakan menggunakan isolat bakteri yang berasal dari air sumur gali desa Wonosalam kecamatan Wonosalam, Kabupaten Demak.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Air

Air merupakan kebutuhan mutlak makhluk hidup baik manusia, hewan maupun tumbuhan dan memiliki peranan penting dalam kehidupan sehari-hari. Sekitar 90% berat manusia terdiri dari air (Odeyemi et al. 2013). Kebutuhan manusia akan air tidak lepas dari air bersih. Seiring dengan meningkatnya jumlah penduduk, maka kebutuhan air bersih juga mengalami peningkatan. Akan tetapi, kesadaran masyarakat terhadap ketersediaan air bersih cenderung menurun, sehingga masalah yang sering terjadi adalah pencemaran air yang digunakan untuk pemenuhan kebutuhan harian (Radji et al. 2008).

Air bersih adalah air yang dipergunakan untuk memenuhi kebutuhan sehari-hari dan memiliki kualitas persyaratan air yang telah diatur undang-undang (Parera & Rumampuk 2013). Sekitar 1,1 miliar penduduk dunia masih kekurangan air bersih dan 2,5 miliar penduduk belum mendapatkan akses sarana sanitasi. Data ini dikutip dari Global Water Supply and Sanitation yang dikeluarkan oleh WHO/UNICEF pada tahun 2000. Adanya penyediaan air yang sesuai dengan standar kualitas air dapat meminimalisir penyakit yang disebabkan oleh pencemaran air.

2.1.1 Kualitas Air

Menurut Kementerian Kesehatan Republik Indonesia Nomor 492/MENKES/PER/IV/2010 tentang persyaratan kualitas air minum menyatakan bahwa ada beberapa jenis parameter yang ditetapkan sebagai parameter standar kualitas air yang baik, antara lain parameter yang tidak berhubungan langsung dengan kesehatan dan parameter yang berhubungan langsung dengan kesehatan.

Parameter yang tidak berhubungan langsung dengan kesehatan dibagi menjadi dua, yaitu parameter fisika (bau, warna, total zat padat terlarut (TDS), kekeruhan, rasa dan suhu) dan parameter kimiawi (aluminium, besi, kesadahan, klorida, mangan, pH, seng, sulfat, tembaga dan amonia), sedangkan parameter yang berhubungan langsung dengan kesehatan adalah parameter mikrobiologi. Parameter mikrobiologi yang digunakan adalah *E.coli* dan total *Coliform*. Banyak sumber air yang bisa dimanfaatkan untuk pemenuhan kebutuhan harian. Salah satu sumber air bersih yang masih digunakan oleh masyarakat kota maupun desa adalah air yang berasal dari sumur gali.

2.1.2 Air Sumur Gali di desa Wonosalam

Air sumur galian merupakan salah satu cara penyediaan air bersih yang masih digunakan masyarakat di desa maupun kota. Air sumur galian berasal dari bawah tanah, sehingga dikhawatirkan memiliki potensi kontaminasi yang besar. Kontaminasi yang sering terjadi dikarenakan adanya limpasan air dari pembuangan kotoran atau septic tank yang kurang baik (Marwati et al. 2008). Desa Wonosalam merupakan desa dengan luas wilayah 277,70 ha, memiliki

jumlah penduduk 4.273 jiwa yang terdiri dari 2.147 laki-laki dan 2.126 perempuan dengan jumlah KK sebanyak 1.300. Sebagian besar penduduk desa Wonosalam bermata pencaharian sebagai petani dan pedagang.

Dari data yang diperoleh, masyarakat desa Wonosalam masih menggunakan sumur gali sebagai pemenuhan ketersediaan air bersih seperti mencuci, memasak, minum dan mandi. Sekitar 255 sumur yang berada di daerah Demak, khususnya desa Wonosalam memiliki jarak sanitasi yang bervariasi. Sebagian besar jarak sanitasi antara sumur dan septic tank yang dimiliki masyarakat desa Wonosalam kurang dari 10 meter, sehingga dikhawatirkan air yang digunakan untuk memenuhi kebutuhan harian menjadi tercemar oleh *Coliform*.

2.1.3 Bakteri *Coliform*

Coliform adalah kelompok bakteri flora normal yang terdapat pada pencernaan manusia atau hewan. *Coliform* digunakan sebagai indikator untuk mengetahui ada atau tidaknya cemaran pada air (Suarjana 2009). Standart kualitas air berdasarkan jumlah *Coliform* pada setiap negara berbeda. Semakin tinggi jumlah *Coliform*, semakin tinggi pula risiko adanya bakteri-bakteri patogen lain yang normalnya ada pada kotoran manusia dan hewan (Bambang et al. 2014).

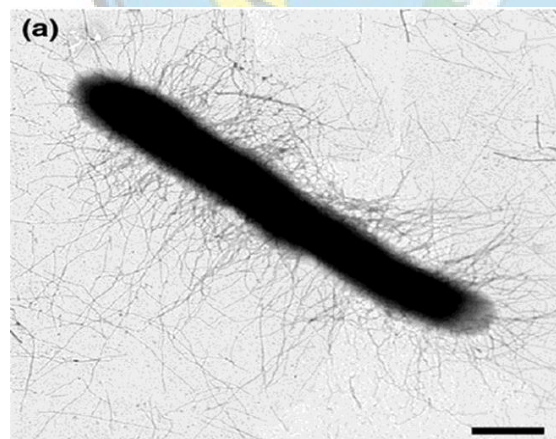
Coliform termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae* berbentuk batang, gram negatif, bersifat fakultatif anaerob dan dapat menfermentasi lakotasa (Suarjana 2009). Famili *Enterobactericeae* memiliki banyak genus antara lain

Escherechia, Shigela, Salmonella, Klebsiella, Enterobacter, Serrtia dan *Proteus* (Hadi et al. 2014).

Berbagai mikroba patogen dapat menularkan penyakit pada manusia atau hewan melalui air yang tercemar (Suarjana 2009). Salah satu *Coliform* yang banyak mencemari air adalah *E.coli*.

2.2 Bakteri *E. coli*

Bakteri *E. coli* merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang pendek yang memiliki panjang sekitar 2 μm , diameter 0,7 μm dan lebar 0,4-0,7 μm , bersifat motil dengan flagel peritrika, mempunyai kapsul dan bersifat anaerob fakultatif. Bakteri *E. coli* dapat menfermentasi karbohidrat dan menghasilkan gas dari glukosa. Pada biakan *E. coli* akan membentuk koloni yang sirkular, konveks dan halus dengan tepi tegas (Amanda 2014). Fermentasi laktosa cepat merupakan karakteristik yang banyak dimiliki oleh *E. coli* (Gillespie 2006). *E. coli* juga tidak memakai asam sitrat dan garam dari asam sitrat tidak dapat sebagai satu-satunya sumber karbon (Melliawati 2009).



Gambar 1. Struktur sel bakteri *E. coli* dengan mikrograf elektron (Thanassi et al. 2012)

Taksonomi bakteri *E. coli* dalam *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology* sebagai berikut (Brenner et al. 1923) :

Domain : Bacteria
Kingdom : Bacteria
Phylum : Proteobacteria
Class : Gamma Proteobacteria
Order : Enterobacteriales
Family : Enterobacteriaceae
Genus : *Escherichia*
Spesies : *Escherichia coli*

Banyak media yang dapat digunakan untuk mengisolasi *E. coli*, salah satunya dengan media *Chromocult Coliform Agar* (CCA). Media CCA digunakan untuk mempermudah membedakan pertumbuhan antara *E. coli* dan *Coliform* yang lain. Deteksi total *Coliform* dan *E. coli* menggunakan media CCA bergantung pada produksi warna koloni yang spesifik. Warna koloni yang dihasilkan untuk *Coliform* adalah merah (reaksi Salmon-GAL), sedangkan untuk *E. coli* biasanya berwarna biru gelap sampai ungu [reaksi Salmon-GAL dan X-glukuronida] (Atlas 2010).

Menurut *Standart Unit, Microbiology Services* strain bakteri anggota famili *Enterobacteriaceae* yang paling banyak dipelajari. Strain anggota famili *Enterobacteriaceae* memiliki distribusi di seluruh dunia. Strain anggota famili *Enterobacteriaceae* dapat ditemukan di dalam tanah, air, produk susu, tanaman dan di usus hewan maupun manusia.

Menurut *Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory* famili *Enterobacteriaceae* memiliki karakteristik gram negatif, berbentuk batang lurus, fakultatif anaerob, sebagian bersifat motil, tumbuh baik pada suhu 37°C, akan tetapi ada beberapa bakteri yang tumbuh baik pada suhu 25-30°C, oksidase negatif dan katalase positif.

2.3 Pathogenesis

Sebagian besar strain *E. coli* memang tidak berbahaya, namun banyak juga yang telah berevolusi menjadi patogen dan dapat menyebabkan penyakit pada manusia maupun hewan (Gillespie 2006). Bakteri *E. coli* merupakan bakteri flora normal pada usus, namun dapat menjadi patogen apabila jumlahnya meningkat dalam saluran pencernaan atau berada diluar saluran pencernaan yang normal (Amanda 2014).

Bakteri *E. coli* juga dapat menyebar melalui peredaran darah, sehingga menyebabkan kerusakan pada berbagai organ. Untuk menghindari terjadinya kerugian, maka sebagian besar masyarakat mengobati infeksi bakteri dengan menggunakan beberapa antibiotika (Bhaskara et al. 2012). Penggunaan antibiotik yang tidak sesuai dengan kebutuhan dapat menimbulkan resistensi terhadap bakteri.

2.4 Antibiotik dan Resistensi *Escherichia coli*

Antibiotik merupakan sekelompok senyawa yang memiliki cara kerja menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) atau menyebabkan kematian bakteri (bakterisidal) (Iswara 2015). Definisi lain menyebutkan antibiotik adalah senyawa atau obat yang digunakan untuk membasmi infeksi mikroba pada

manusia dan harus memiliki sifat toksisitas yang selektif (Sulistiyaningsih 2007). Antibiotik biasanya diberikan pada manusia dan hewan untuk pengobatan dan kontrol atas infeksi yang disebabkan oleh bakteri (Tabatabaei et al. 2010). Pemberian antibiotik dalam pengobatan, dapat menimbulkan resistensi bakteri terhadap antibiotik.

Resistensi bakteri terhadap antibiotik sudah terbukti jauh sebelum ‘era-antibiotik’. Penggunaan antibiotika yang berlebihan dapat menimbulkan tekanan dan mendorong perkembangbiakan mikroorganisme yang resistensi (Yenny & Herwana 2007). *E. coli* sangat resisten terhadap beberapa jenis antibiotik, diantaranya ampisilin, amoksisilin, tetrasiklin dan sulfametoksazol trimethoprim (Idia et al. 2006). Penggunaan antibiotik yang relatif tinggi dapat menjadi suatu ancaman atau permasalahan bagi kesehatan masyarakat secara global.

Pada peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 2406/MENKES/PER/XII/2011 dijelaskan hasil penelitian *Antimicrobial Resistant in Indonesia* (AMRIN Study) terbukti dari 2494 individu di masyarakat, 43% *E.coli* resisten terhadap berbagai jenis antibiotik antara lain ampisilin (34%), kotrimoksazol (29%) dan kloramfenikol (25%). Hasil penelitian yang dilakukan terhadap pasien rawat inap dirumah sakit didapatkan 81% *E. coli* resisten terhadap berbagai jenis antibiotik, yaitu ampisilin (73%), kotrimoksazol (56%), kloramfenikol (43%), siprofloksasin (22%) dan gentamisin (18%).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Bello et al (2013) mengatakan bahwa strain *E. coli* yang diperoleh dari masyarakat di negara Nigeria memiliki

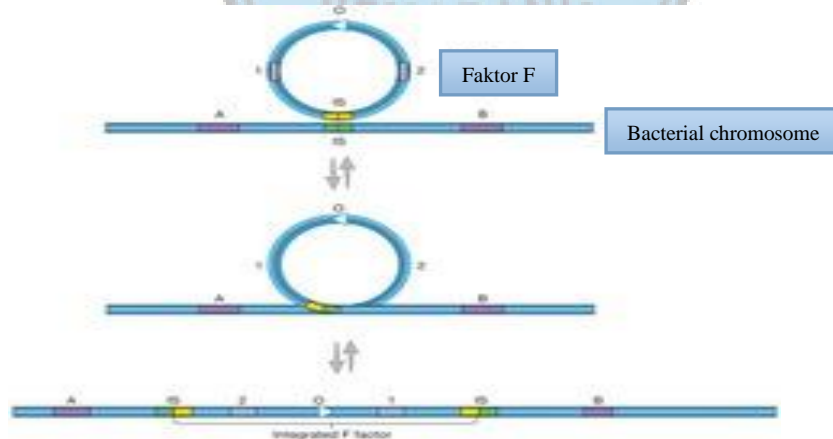
prevalensi resistensi tertinggi terhadap antibiotik Sulphamethoxazole (SXT) 30µg, Kloramfenikol (CH) 30µg, Sparfloxacin (SP) 10µg, Ciprofloxacin (CPX) 10µg, Amoksisilin (AM) 30µg, Augmentin (AU) 30µg, Gentamisin (CN) 10µg, Pefloxacin (PEF) 30µg, Trivid (OFX) 10µg dan Streptomisin (S) 30µg. Dari berbagai penelitian yang telah dilakukan, peneliti termotivasi untuk melakukan penelitian lebih lanjut terhadap strain *E. coli* yang diisolasi dari berbagai air sumur gali desa Wonosalam terhadap sensitivitas antibiotiknya. Antibiotik yang akan digunakan adalah Kloramfenikol, Gentamisin, Ampisilin, Siprofloksasin dan Kotrimoksazol.

Gen resistensi terhadap antibiotik dapat ditemukan pada elemen genetik salah satunya plasmid (Willey et al. 2009). Resistensi bakteri terhadap antibiotik dapat dilihat melalui plasmid bakteri, karena plasmid berperan penting dalam penyebaran gen resistensi. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa banyak bakteri patogen yang tahan terhadap pengobatan antibiotik. Resistensi bakteri terhadap antibiotik dikarenakan adanya gen resistensi antibiotik yang mengkode plasmid (Adzitey et al. 2013). Jadi, plasmid pada bakteri mempermudah untuk melihat sensitivitas bakteri terhadap berbagai jenis antibiotik.

2.5 Plasmid Bakteri

Plasmid merupakan molekul DNA yang berbentuk sirkuler yang berada bebas pada sitoplasma bakteri atau ekstra kromosom dan berukuran kecil. Penamaan plasmid biasanya disesuaikan sifat yang dimiliki oleh plasmid tersebut, misalnya plasmid resistensi, plasmid virulensi, plasmid degradatif, seks-plasmid dan Kol-plasmid (Wibowo et al. 2011).

Setiap plasmid bakteri yang resisten terhadap antibiotik akan membawa satu atau lebih gen resistensi. Plasmid bakteri merupakan unsur-unsur yang dapat memindahkan banyak gen bakteri dari satu sel bakteri ke sel bakteri yang lain, dan sering disebut dengan transfer atau konjugasi gen horisontal (Bennett 2008). Komponen yang memiliki peran utama dalam konjugasi pada bakteri adalah faktor F. Faktor F memiliki panjang sekitar 100.000 basis, faktor F ini bertanggung jawab dalam mentransfer plasmid tertentu pada bakteri. Informasi yang diperlukan untuk mentransfer plasmid pada bakteri berada di traoperon (Willey et al. 2009).



Gambar 2. Penggabungan Faktor F pada kromosom bakteri (Willey et al. 2009)

Gambar diatas menjelaskan bagaimana penggabungan faktor F dengan kromosom bakteri. Plasmid bertanggung jawab terhadap penyebaran dan munculnya resistensi terhadap antibiotik (Garcill et al. 2011). Guna melihat atau menguji plasmid bakteri yang resisten terhadap antibiotik dapat dilakukan isolasi DNA plasmid bakteri. Isolasi DNA plasmid dilakukan untuk mendapatkan DNA plasmid yang murni.

2.6 Isolasi DNA Plasmid

DNA memiliki komponen yang terdiri dari gula pentosa (deoksiribosa), gugus fosfat dan pasangan basa. Pasangan basa pada DNA terdiri dari basa purin dan pirimidin. Basa purin terdiri atas Adenin (A) dan Guanin (G) yang keduanya memiliki struktur cincin ganda, sedangkan basa pirimidin terdiri atas sitosin (C) dan timin (T) yang memiliki struktur cincin-tunggal (Fatih 2009).

Isolasi DNA merupakan teknik terpenting dalam perkembangan ilmu ini. Kemurnian DNA yang dihasilkan sangat mempengaruhi hasil yang akan diperoleh nantinya (Yulianti 2006). Pada prinsipnya cara isolasi DNA memiliki tahapan yang sama, yaitu penumbuhan dan pembiakan sel bakteri pembawa plasmid, pemisahan sel bakteri dari mediumnya, pemecahan sel (lysis), pemisahan debris dari larutannya dan pemurnian DNA plasmid (Fery 2006). DNA plasmid yang telah murni dapat diuji dengan menggunakan metode Elektroforesis Gel Agarosa.

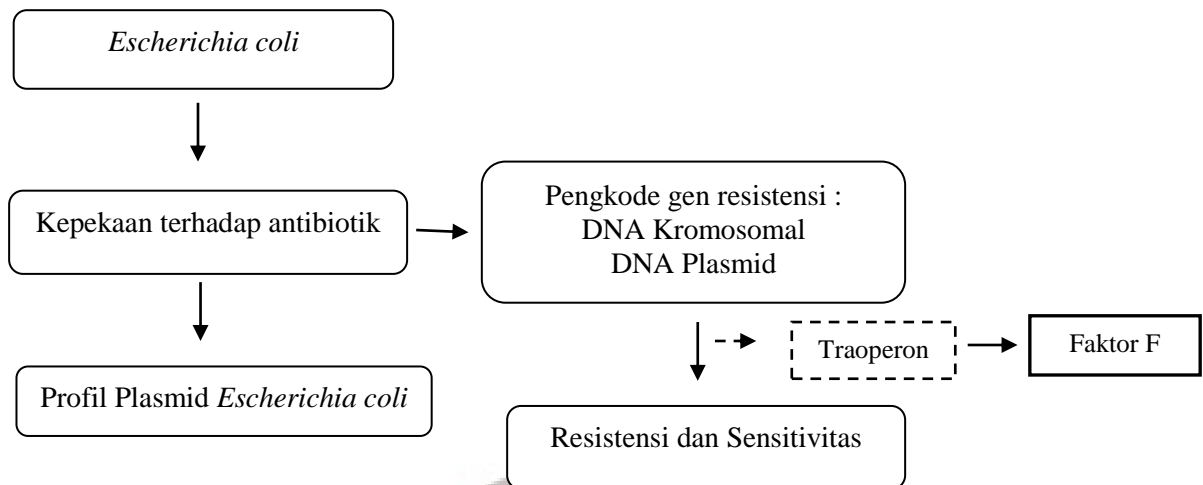
2.7 Electrophoresis Gel Agarose

Gel elektroforesis dikenal sebagai teknik untuk memisahkan dan mengidentifikasi makromolekul seperti DNA, RNA dan protein berdasarkan ukuran, berat atau titik isoelektriknya. Pemisahan antara molekul dengan elektroforesis ini berdasarkan atas muatan molekul yang bermigrasi melalui matriks gel (García-descalzo et al. 1995).

Elektroforesis gel agarosa adalah teknik yang digunakan secara rutin di laboratorium klinis untuk skrining kelainan protein dalam berbagai cairan biologis (serum, urin, CSF). Hal ini didasarkan pada prinsip-prinsip zona elektroforesis. Protein sebagai molekul bermuatan bermigrasi dalam medium padat direndam dengan penyangga di bawah pengaruh medan listrik. Migrasi tergantung pada muatan listrik bersih, titik isoelektrik dan massa molekul protein (Giot 2010).

Agarosa adalah polisakarida yang sangat murni yang berasal dari ekstrak rumput laut. Agarosa dapat digunakan untuk pemusatan isoelektrik dan pemisahan protein yang berukuran besar atau protein kompleks. Ukuran pori yang dimiliki agarosa sesuai untuk memisahkan polimer asam nukleat yang tersusun dari ratusan nukleotida (Langga et al. 2012). Gel agarosa dapat memisahkan fragmen yang lebih besar dari DNA (lebih besar dari 200 bp). Jarak antara dua fragmen DNA yang berbeda ukuran dapat ditentukan berdasarkan konsentrasi matriks agarosa (Lee & Bahaman 2010). Kerangka teori dan konsep dari penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.

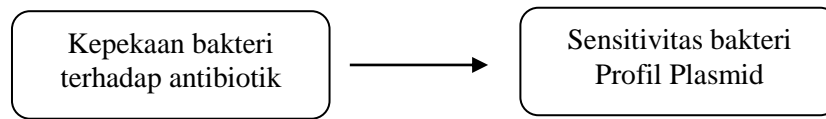
2.7 Kerangka Teori



Gambar 3. Kerangka Teori Gambaran Kepekaan berbagai Antibiotik dan Profil Plasmid *E.coli* Isolat Air Sumur Gali di Kabupaten Demak



2.7 Kerangka Konsep



Gambar 4. Kerangka Konsep Gambaran Kepekaan berbagai Antibiotik dan Profil Plasmid *E.coli* Isolat Air Sumur Gali di Kabupaten Demak



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian deskriptif.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian adalah air sumur gali yang terdapat di Kabupaten Demak yang letaknya dekat dengan *septic tank*. Sampel penelitian adalah 20 air sumur gali di kabupaten Demak. Spesimen dari penelitian ini adalah 17 strain *E. coli* isolat sumur gali di desa Wonosalam yang memiliki jarak kurang dari 10 meter dari *septic tank*.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati adalah gambaran kepekaan berbagai antibiotik dan profil plasmid *E. coli* isolat air sumur gali di kabupaten Demak.

3.4 Definisi Operasional

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini dapat didefinisikan sebagai berikut :

Tabel 2. Tabel Definisi operasional

Variabel	Pengertian
Sensitivitas bakteri terhadap antibiotik	Kemampuan bakteri dalam melawan antibiotik yang disebut dengan resistensi (Yenny & Herwana 2007).
DNA Plasmid	DNA ekstra kromosom yang berbentuk sirkuler yang diisolasi dengan metode <i>lysis buffer</i> , memiliki ukuran yang kecil dan dapat dilihat dengan Elektroforesis Gel Agarosa 1% (Wibowo et al. 2011).

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Bahan

Bahan penelitian yang digunakan adalah isolat *E. coli* yang berasal dari sumur gali di Kabupaten Demak, BHI cair, media *Chromocolt Coliform Agar* (CCA, Merck®), media *Mueller Hinton Agar* (MHA, OXOID®), NaCl fisiologis, disk Antibiotik (Ampisilin, gentamisin, kloramfenikol dan siprofloksasin), media *Heart Infusion Agar* (HIA, OXOID®) miring, media LB, TAE, *Chloroform*, TE, *Lysing solution I* (50 mM Glukosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris), *Lysing solution II* (0,4 M NaOH, 2% SDS), *Lysing solution III* (5 M Kalium asetat (pH 4,8), Asam asetat), Ethanol 70%, Ethanol absolut, Aquades (steril), *Loading buffer*, RNase, *Ethidium Bromide*.

3.5.2 Alat

Chamber elektroforesis (*Cleaver Scientific Ltd*), tabung ependorft 15 ml, mikrotube, *Power Supply*, vortex, sentrifuga, *water bath*, *shaker*, UV Transilluminator, autoklaf dan jangka sorong.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Sterilisasi Alat

Semua alat yang dimungkinkan untuk disterilisasi seperti bahan-bahan yang terbuat dari gelas dan cawan petri disterilisasikan dalam autoclave 121°C dengan tekanan 2 atm selama 30 menit, setelah itu dikeringkan dalam oven suhu 60°C selama 30 menit.

3.6.2 Kultivasi Bakteri

Prosedur kultivasi ini diambil dari penelitian (Darmawati et al, 2010) yang telah dimodifikasi. Kultivasi *E. coli* menggunakan media HIA miring, ditanaman pada media CCA satu koloni bakteri diinokulasikan ke dalam 5 ml media BHI cair, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur siap untuk uji sensitivitas dan isolasi plasmid.

3.6.3 Uji Kepekaan Antibiotik

Sebanyak 17 strain *E. coli* isolat sumur gali di Kabupaten Demak diuji sensitivitas dengan menggunakan metode *Kirbby-Bauer* yang telah dimodifikasi. Kultur bakteri yang telah 24 jam, kekeruhannya disetarakan dengan standart Mc.Farland 0,5. 100 µl suspensi bakteri diinokulasikan ke permukaan media MHA hingga merata, didiamkan beberapa saat agar inokulasi benar-benar meresap pada media, selanjutnya disk antibiotik ditempelkan pada permukaan media, diberi jarak \pm 2cm antara disk satu dengan yang lain. Diinkubasi selama 18 sampai 24 jam dengan suhu 37°C. Diamati dan di ukur diameter zona hambatnya, kemudian untuk menentukan sensitivitasnya digunakan standart *Clinical and Laboratory Standarts Institute* (CLSI).

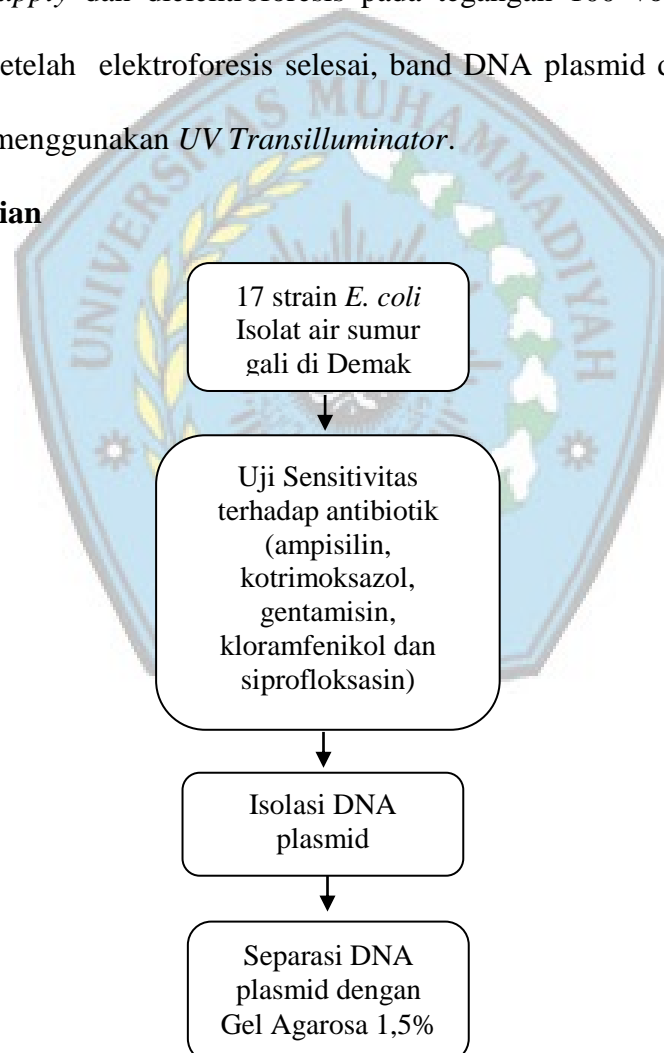
3.6.4 Isolasi Plasmid

Diambil 1 koloni bakteri dari lempeng agar, dipindahkan kedalam tabung yang telah berisi 5 ml media LB. Digojog kuat-kuat dalam shaker inkubator 37°C selama semalam. Disentrifus 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, pelet disuspensikan dengan 100 µl *lysing solution* I (diamkan dalam es selama 5 menit). Ditambahkan 200 µl *lysing solution* II (baru), dicampur dengan membolak-balik tabung (diamkan dalam es selama 5 menit). Ditambahkan 150 µl *lysing solution* III, dicampur dengan membolak-balik tabung (diamkan dalam es selama 5 menit). Disentrifus kembali 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan diambil dan dipindah pada tube baru, ditambahkan *chloroform* 1:1 dengan volume supernatan, kemudian dicampur dengan shaker selama 15 menit. Disentrifus 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Lapisan atas diambil dan dipindah pada tube baru, ditambah *ethanol* absolut dingin 1:1, disimpan dalam freezer (-20°C) selama 1 jam. Disentrifus 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet dicuci dengan *ethanol* 70% dan disentrifus kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Pelet dikeringkan, ditambahkan TE 50 µl, kemudian ditambah 10 µl RNase dan diinkubasi dalam waterbath selama 60 menit. DNA plasmid siap di elektroforesis gel Agarosa 1,5%.

3.6.5 Separasi Profil Plasmid dengan Gel Agarosa 1,5%

Ditimbang sebanyak 1,5 gram Agarose dan dilarutkan dalam TAE 150 ml (dipanaskan), kemudian ditambahkan 4 μ l *Ethidium Bromide* dan dituang dalam cetakan, dipasang sisiran pada cetakan, setelah Agarosa memadat, sisiran dilepaskan, dimasukkan larutan TAE sebagai larutan penyangga. Sumuran diisi dengan 10 μ l sampel (3 μ l loading buffer + 15 μ l sampel). Setelah semua sumuran terisi, kemudian dihubungkan dengan *power supply* dan dielektroforesis pada tegangan 100 volt selama 60 menit. Setelah elektroforesis selesai, band DNA plasmid dapat diamati dengan menggunakan *UV Transilluminator*.

3.7 Alur Penelitian



Gambar 5. Alur penelitian gambaran kepekaan berbagai antibiotik dan profil plasmid *E.coli* Isolat Air Sumur Gali Kabupaten Demak

3.8 Teknik Pengumpulan Data

Data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data primer dan hasil penelitian disajikan dalam bentuk narasi.

3.9 Pengolahan Data dan Analisis Data

Data diolah dan dianalisis secara deskriptif.

3.10 Tempat dan Waktu Penelitian

3.10.1 Tempat Penelitian

Penelitian gambaran sensitivitas berbagai antibiotik dan profil plasmid *E. coli* isolat sumur gali di Kabupaten Demak dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler Analisis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang dan laboratorium Bioteknologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

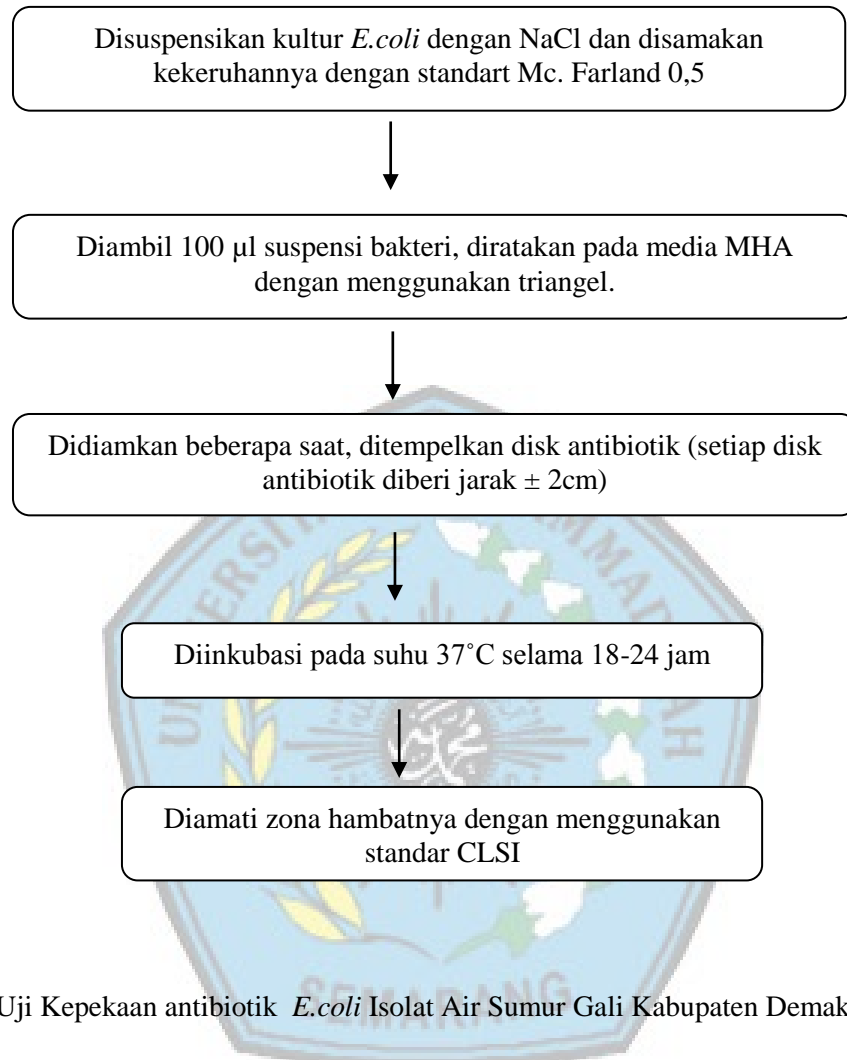
3.10.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan mulai bulan Maret 2016 sampai dengan bulan Juni 2016.



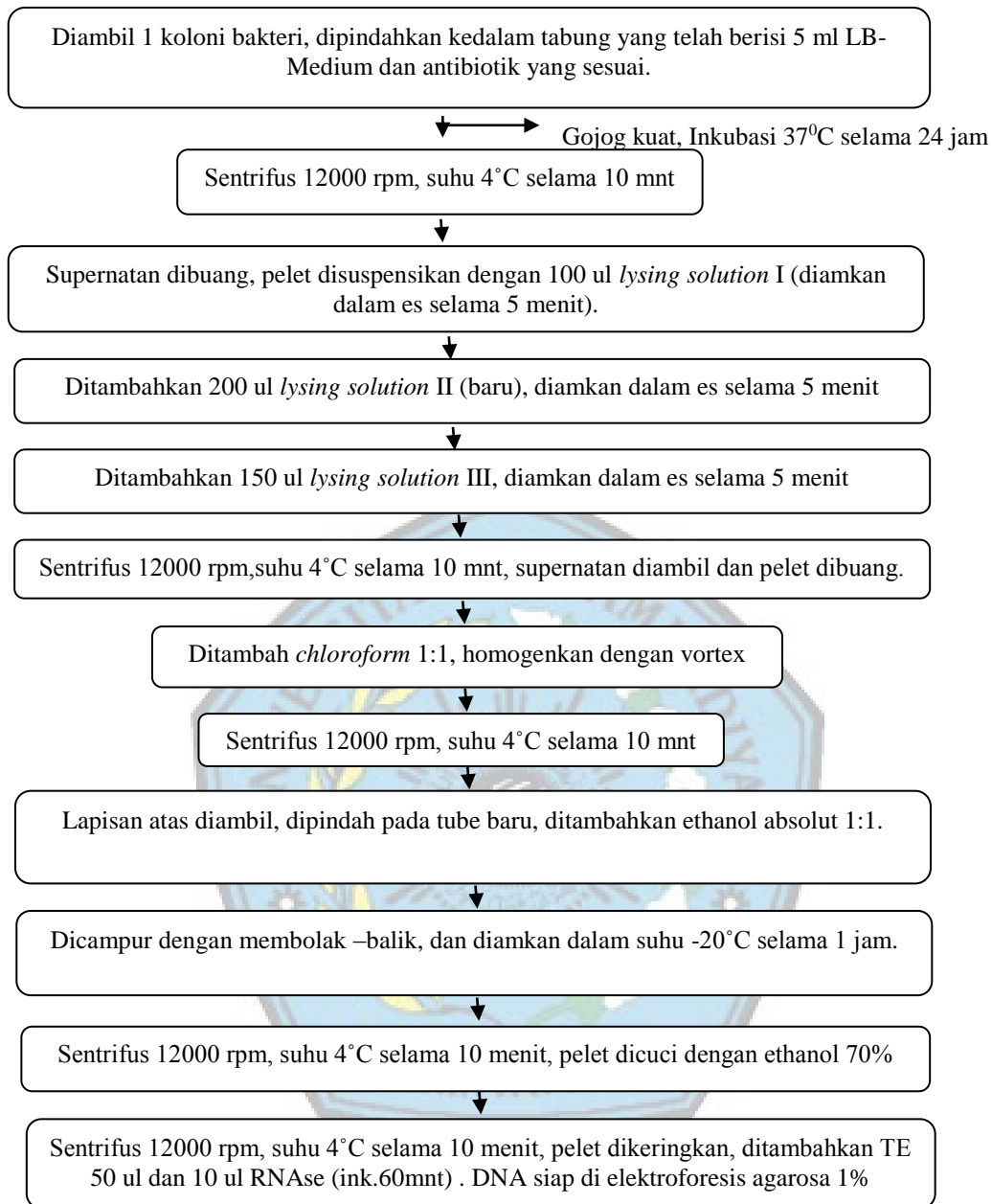
3.11 Skema Prosedur Penelitian

3.11.1 Uji Kepekaan Antibiotik



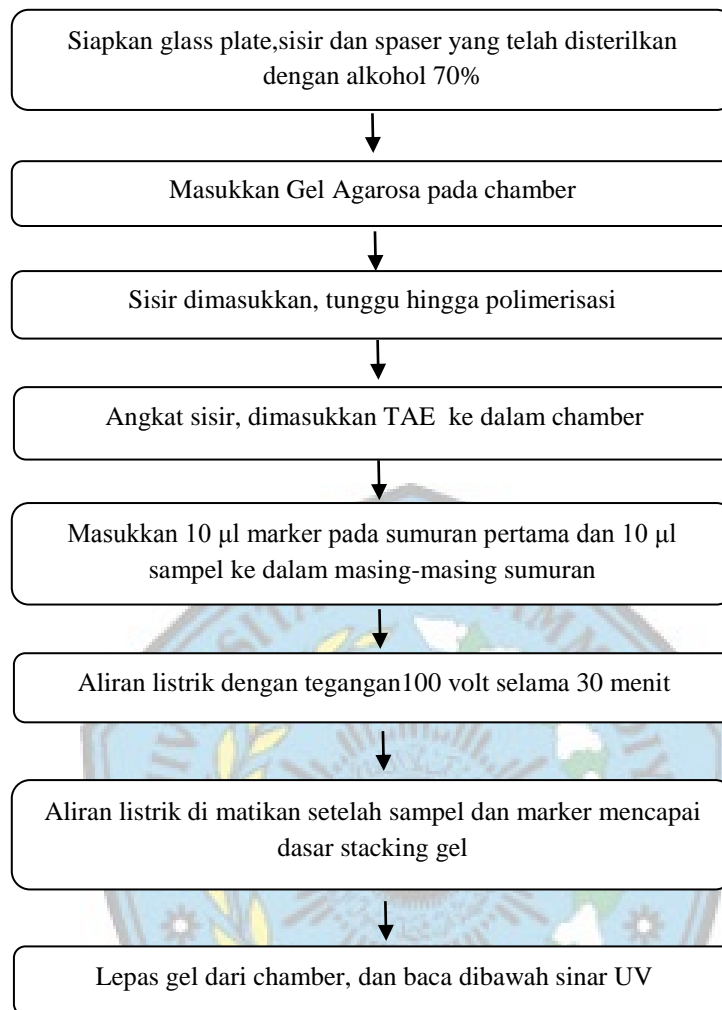
Gambar 6. Uji Kepekaan antibiotik *E.coli* Isolat Air Sumur Gali Kabupaten Demak

3.11.2 Isolasi DNA plasmid



Gambar 7. Skema isolasi DNA plasmid *E.coli* yang diisolasi dari berbagai air sumur Gali Kabupaten Demak

3.11.3 Separasi Plasmid *E.coli* dengan Agarosa 1,5%



Gambar 8. Skema pemeriksaan plasmid *E.coli* dengan metode Gel Agarosa 1,5%

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Hasil Uji Kepekaan bakteri *E. coli*

Didapat 17 strain *E. coli* yang diisolasi dari 20 sumur gali di desa Wonosalam Kabupaten Demak. Hasil uji kepekaan 17 strain *E. coli* terhadap berbagai macam antibiotik disajikan pada tabel 1 dan 2.

Tabel 3. Data Uji Kepekaan 17 strain bakteri *E.coli* terhadap berbagai antibiotik

No	Sampel	Gentamisin	Siprofloksasin	Kloramfenikol	Ampisilin
1	SG 1A	R	I	S	R
2	SG 3C	S	S	R	R
3	SG 4A1	S	S	S	R
4	SG 4A2	I	S	S	R
5	SG 5C	S	S	S	R
6	SG 7C	I	S	S	R
7	SG 8A1	S	S	S	R
8	SG 9B	S	S	R	R
9	SG 10B	S	S	S	R
10	SG 11C	S	S	S	I
11	SG 12A	S	S	S	S
12	SG 14B	R	I	S	R
13	SG 15B	I	R	I	R
14	SG 16A	I	R	S	S
15	SG 18A	I	S	I	S
16	SG 19A	I	S	S	S
17	SG 20B	I	S	I	I

*R:resisten,I:intermediet,S:sensitiv

Hasil uji kepekaan 17 strain terhadap antibiotik gentamisin, siprofloksasin, kloramfenikol dan ampisilin menunjukkan bahwa ke 17 strain bakteri *E. coli* tersebut memiliki respon kepekaan yang berbeda-beda terhadap antibiotik. Hal ini menunjukkan adanya variasi yang berbeda-beda dalam spesies *E. coli*. Hal ini juga dapat dilihat dari antibiotik gentamisin, dari 17 strain bakteri *E. coli*, 2 strain yaitu SG 1A dan SG 14B menunjukkan resistensi, kemudian pada

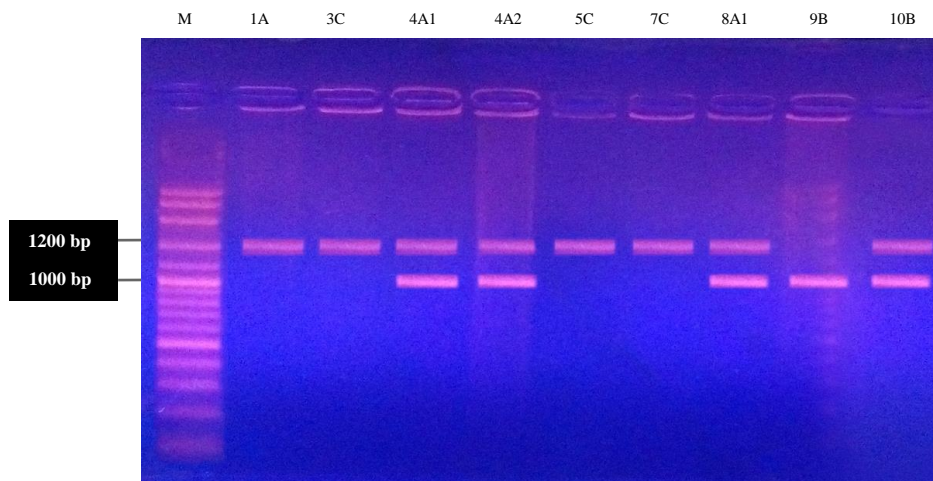
antibiotik siprofloksasin, 2 dari 17 strain bakteri *E. coli* yaitu SG 15B dan SG 16A juga menunjukkan resistensi. Hasil uji sensitivitas terhadap antibiotik kloramfenikol, dari 17 strain *E. coli*, 2 strain yaitu SG 3C dan SG 9B menunjukkan pula resistensi terhadap antibiotik yang di ujikan. Lima belas strain bakteri lainnya menunjukkan sensitif.

Sebelas dari tujuh belas strain bakteri *E. coli* yaitu SG 1A, SG 3C, SG 4A1, SG 4A2, SG 5C, SG 7C, SG 8A1, SG 9B dan SG 10B menunjukkan resistensi terhadap antibiotik ampisilin. Dari data tersebut dapat dilihat dari 4 antibiotik yang diujikan, antibiotik ampisilin menduduki peringkat pertama dalam resistensi bakteri terhadap antibiotik.

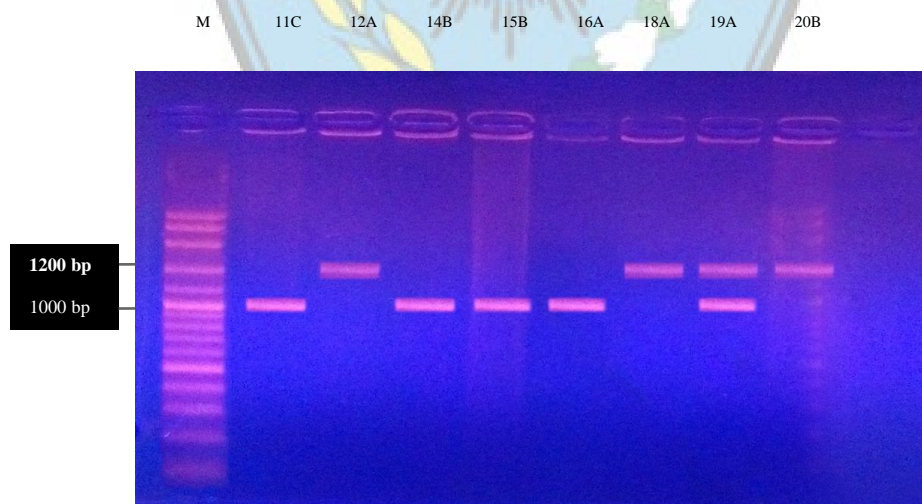
Menurut *Clinical and Laboratory Standarts Institute* (CLSI) antibiotik gentamisin menunjukkan resistensi bila diameter zona hambat ≤ 12 mm, intermediet 13-14 mm dan sensitive ≥ 15 mm, antibiotik siprofloksasin menunjukkan resistensi bila diameter zona hambat ≤ 15 mm, intermediet 16-20 mm dan sensitive ≥ 21 mm, begitu pula dengan antibiotik kloramfenikol, jika diameter zona hambat ≤ 12 mm menunjukkan resisten, 13-17 mm menunjukkan intermediet dan ≥ 18 mm menunjukkan sensitive, untuk antibiotik ampisilin yang menunjukkan resistensi memiliki zona hambat ≤ 13 mm, intermediet 14-16 mm dan sensitive ≥ 17 mm.

4.1.2 Hasil Elektroforesis Plasmid bakteri *E. coli*

Bakteri yang telah diuji kepekaan terhadap berbagai macam antibiotik selanjutnya dilakukan isolasi DNA plasmid. Hasil dari isolasi plasmid tersebut dilakukan dengan elektroforesis pada gel agarosa. Hasil elektroforesis profil plasmid terhadap 17 strain *E.coli* dapat dilihat pada gambar 7 dan 8.



Gambar 7. Hasil elektroforesis plasmid *E. coli* resisten antibiotika (SG 1A, SG 3C, SG 4A1, SG4A2, SG 5C, SG 7C, SG 8A1, SG 9B dan SG 10 B)



Gambar 8. Hasil elektroforesis plasmid *E. coli* resisten antibiotika (SG 11C, SG 12A, SG 14B, SG 15 B, SG 16 A, SG 18A, SG 19A dan SG 20B)

Plasmid *E.coli* isolat SG 4A1, SG 4A2, SG 8A1, SG 10B dan SG 18 A masing-masing teramati memiliki 2 jenis plasmid. Satu berukuran 1000 bp dan plasmid lain berukuran 1200 bp. Isolat *E.coli* SG 1A, SG 3C, SG 5C, SG 7C, SG 12 A, SG 18 A dan SG 20B memiliki 1 jenis plasmid berukuran 1200 bp, dan sisanya yaitu isolat *E.coli* SG 9B, SG 11C, SG 14B, SG 15B dan SG 16 A juga memiliki 1 jenis plasmid yang berukuran 1000 bp. Marker yang digunakan dalam elektroforesis gel agarosa tersebut memiliki ukuran 1Kbp. Marker ini digunakan sebagai penanda berat atau ukuran plasmid yang terisolasi. Secara umum dapat dilihat bahwa plasmid *E. coli* yang berhasil diisolasi memiliki ukuran berkisar 1000-1200 bp.

4.2 Pembahasan

Berdasarkan data hasil uji kepekaan 17 strain bakteri *E. coli* dapat dilihat bahwa sifat kepekaan bakteri terhadap antibiotik berbeda-beda. Hal ini menunjukkan adanya variasi di dalam anggota spesies *E. coli*, meskipun dalam satu spesies akan tetapi memiliki respon yang berbeda-beda terhadap berbagai antibiotik. Berdasarkan pemikiran *population thinking* Ariew (2008) yang memandang variasi antar anggota dari spesies tersebut adalah nyata, maka strain-strain yang resisten terhadap antibiotik menjadi bukti nyata adanya variasi kepekaan terhadap antibiotik.

Antibiotik gentamisin bekerja dengan cara penghambatan dinding sel. Peptidoglikan yang dimiliki dinding sel bakteri akan mempertahankan bentuk sel dan tekanan osmotik di dalam sel bakteri, sehingga kerusakan pada lapisan tersebut akan menyebabkan hilangnya kekakuan dinding sel dan mengakibatkan

kematian pada bakteri (Rahmah 2014). Hal tersebut menjadi bukti adanya sensitivitas bakteri terhadap gentamisin. Dua strain dari ke tujuh belas strain bakteri *E.coli* menunjukkan resistensi terhadap antibiotik gentamisin. Resistensi bakteri terhadap gentamisin disebabkan karena adanya ikatan silang dimana asam amino menempel pada rantai peptida, sehingga dapat mempertahankan kekakuan dinding sel dan menghalangi terjadinya lisis (Katzung 2007).

Antibiotik siprofloksasin termasuk golongan fluorokuinolon yang bekerja dengan mempengaruhi asam deoksiribonukleat (DNA) girase pada bakteri, sehingga menghambat sintesis DNA (Febiana 2012). DNA girase merupakan enzim yang terdapat pada bakteri dan dapat menyebabkan terbukanya dan terbentuknya superheliks pada DNA sehingga menghambat replikasi DNA (Sudigdoadi 2007). Antibiotik golongan fluoroquinolon ini memiliki peranan dalam menghambat kerja enzim DNA girase pada bakteri dan bersifat bakterisidal, sehingga dapat menyebabkan kematian pada bakteri. Berdasarkan pernyataan diatas, dua dari ke tujuh belas strain bakteri *E. coli* yang diuji kepekaan dengan menggunakan antibiotik siprofloksasin tidak dapat menghambat kerja enzim DNA girase yang ada, sehingga menunjukkan resistensi terhadap antibiotik tersebut. Resistensi terhadap antibiotik ini adalah hasil mutasi subunit *gyrA* dari girase atau subunit *GrlA* dari topoisomerase IV yang mengurangi kemampuan antibiotik untuk mengikat target (Reygaert 2013).

Antibiotik kloramfenikol memiliki sifat bakterioastatik dan bekerja dengan cara menghambat sintesis protein (Sudigdoadi 2007). Mekanisme kerja kloramfenikol tersebut adalah dengan cara mengikat asam amino baru pada rantai peptida yang sedang dibentuk tanpa mengganggu sel-sel normal lainnya (Febiana 2012). Strain bakteri *E. coli* yang menunjukkan resistensi terhadap antibiotik kloramfenikol disebabkan adanya enzim kloramfenikol asetiltransferase yang dimiliki oleh bakteri, sehingga dapat menghancurkan aktivitas antibiotik (Safitri 2010). Hal tersebut menunjukkan bahwa strain *E. coli* yang sensitiv terhadap kloramfenikol tidak memiliki enzim kloramfenikol asetiltransferase, sehingga dapat menyebabkan kematian pada bakteri.

Hasil uji kepekaan dari 4 antibiotik yang digunakan, sebelas dari 17 strain bakteri *E. coli* menunjukkan resistensi yang lebih terhadap antibiotik ampisilin. Ampisilin merupakan antibiotik golongan penisilin yang mekanisme kerjanya menghambat pembentukan dinding dan permeabilitas membran sel (Wasitaningrum 2009). Resistensi intrinsik ampisilin disebabkan oleh gen β -laktamase yang berlokasi di plasmid. Gen yang berlokasi pada plasmid ini lebih mudah berpindah jika dibandingkan dengan gen yang ada pada kromosom, sehingga gen resistensi yang ada pada plasmid dapat dipindahkan dari satu bakteri ke bakteri lainnya (Kusuma 2010). Resistensi terhadap antibiotik golongan penisilin disebabkan karena pembentukan enzim yang merusak antibiotik yaitu enzim β -laktamase yang menyebabkan terbukanya cincin β -laktam antibiotik, sehingga merusak aktivitas antimikroba (Sudigdoadi 2007). Resistensi bakteri terhadap ampisilin bukan hal baru. Hal

ini menunjukkan karena adanya pemakaian antibiotik yang tidak sesuai dan dapat memicu resistensi bakteri yang sebelumnya sudah ada. Resistensi antibiotik ini juga dapat terjadi karena ada mutasi atau transfer horizontal gen yang membawa sifat resistensi. Berdasarkan data yang diperoleh dapat dilihat bahwa bakteri *E. coli* yang menunjukkan sifat resistensi terhadap antibiotik menunjukkan profil plasmid *E. coli* yang teramati sebagai pita DNA yang berpendar oleh pendadahan sinar ultraviolet (Wibowo et al. 2011).

Hasil isolasi plasmid pada 17 strain *E. coli* ditemukan memiliki 1 atau lebih plasmid pada setiap isolat. Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan Nicklin et al (1999) bahwa sel bakteri dapat memiliki lebih dari 1 jenis plasmid dengan ukuran yang bervariasi, didukung pula dengan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan bahwa didapatkan profil plasmid kelompok *enterobacter*, yaitu *Salmonella* menunjukkan sifat resistensi terhadap beberapa antibiotik. Data penelitian tersebut menunjukkan bahwa *Salmonella* yang memperlihatkan sifat resistensi terhadap antibiotika tertentu (dapat lebih dari satu jenis resistensi) terisolasi plasmid dengan ukuran yang bervariasi (Idia et al. 2006). Oleh sebab itu, jika dikaitkan dengan uji kepekaan yang telah dilakukan terhadap berbagai antibiotik dapat dilihat bahwa dalam 1 spesies ada variasi antar spesies dalam membawa gen resistensi. Hal ini dapat dibuktikan dengan hasil elektroforesis yang telah dilakukan, dimana dari 17 strain *E. coli* tersebut memiliki ukuran plasmid yang bervariasi begitu pula dengan pola kepekaan strain bakteri terhadap antibiotik yang diujikan.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik sebuah kesimpulan bahwa terdapat perbedaan profil plasmid dan sensitivitas terhadap berbagai macam antibiotik pada setiap strain *E.coli* yang diisolasi dari air sumur gali di Kabupaten Demak. Sebagian besar isolat *E.coli* yang memiliki 2 jenis plasmid yang berukuran 1000 bp dan 1200 bp memiliki sifat sensitif terhadap antibiotik yang diujikan dan adanya variasi antar satu spesies khususnya *E .coli*.

5.2 Saran

Penelitian lanjutan dapat dilakukan dengan perbedaan penggunaan antibiotik yang diujikan, jarak sumur atau sumber air yang dicurigai tercemar coliform khususnya pada *E. coli*. Selain itu penelitian dapat dikembangkan dengan melihat sensitivitas berbagai antibiotik terhadap profil plasmid bakteri *E. coli*.

DAFTAR PUSTAKA

- Adzitey, F. et al., 2013. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Escherichia coli* isolated from ducks in Penang , Malaysia. *International Food Research Journal*, 20(3), pp.1473–1478.
- Amanda, F.R., 2014. Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*.
- Ariew, A., 2008. *Population Thinking*, Di Dalam :Ruse, M (Ed), editor The Oxford Handook of Philosopy of Biology. USA: Oxford univercity press, pp. 64.
- Atlas, R.M., 2010. *Handbook of Microbiological Media Fourth Edition*,
- Bambang, A., Fatimawali & Kojong, N., 2014. Analisis Cemaran Bakteri Coliform dan Identifikasi *Escherichia coli* Pada Air Isi Ulang Dari Depot di Kota Manado. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 3(3), pp.325–334.
- Bennett, P.M., 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance : acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153, pp.347–357.
- Bhaskara, I.B., Ketut, B. & Ketut Tono, P., 2012. Uji Kepekaan *Escherichia coli* sebagai Penyebab Kolibasilosis pada Babi Muda terhadap Antibiotika Oksitetrasiklin , Streptomisin , Kanamisin dan Gentamisin. *Indonesia Medicus Veterinus*, 1(2), pp.186–201.
- Brenner, D., Krieg, N.R. & Staley, J.T., 1923. *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*,
- Fatih, M., 2009. Isolasi dan Digesti DNA Kromosom. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, 10, pp.61–67.
- Febiana, T., 2012. Kajian Rasionalitas Penggunaan Antibiotik di Bangsal Anak Rsup Dr. Kariadi Semarang Periode Agustus-Desember 2011. , pp.1–70.
- Fery, A.I., 2006. Deteksi DNA Plasmid pada *Lactobacillus* sp. dengan Metode Elektroforesis Gel Agarosa. *WARTA-WIPTEK*, 14.
- García-descalzo, L. et al., 1995. *Gel Electrophoresis of Proteins*,
- Garcill, M.P., Andre, A. & Fernando, 2011. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. , pp.936–956.
- Gillespie, S.H., 2006. *Principles and Practice of Clinical Bacteriology Editors*,
- Giot, J., 2010. Agarose Gel Electrophoresis Application in Clinical Chemistry. *JMB*, 29(1), pp.9–14.
- Hadi, B., Bahar, E. & Semiarti, R., 2014. Artikel Penelitian Uji Bakteriologis Es Batu Rumah Tangga yang digunakan Penjual Minuman di Pasar Lubuk Buaya Kota Padang. , 3(2), pp.119–122.

- Hardyanti, N. & Fitri, N.D., 2006. Studi Evaluasi Instalasi Pengolahan Air Bersih Untuk Kebutuhan Domestik dan Non Domestik (Studi Kasus Perusahaan Tekstil Bawen Kabupaten Semarang). *Jurnal Presipitasi*, 1(September), pp.37–43.
- Idia, U.P. et al., 2006. Antimicrobial Susceptibility and Plasmid Profiles of *Escherichia coli* Isolates Obtained from Different Human Clinical Specimens in Lagos – Nigeria. *Journal of American Science*, 2(4), pp.70–76.
- Iswara, A., 2015. Pola Sensitivitas *Escherichia coli* Terhadap Antibiotik. *The 2nd University Research Coloquium*, pp.273–277.
- Katzung, B.G. 2007. *Basic & Clinical Pharmacology*, Tenth Edition. United States : Lange Medical Publications.
- Kepel, L., Fatimawali & Budiarmo, F., 2015. Uji Resistensi Bakteri *Escherichia coli* Yang Diisolasi dari Plak Gigi Terhadap Merkuri dan Antibiotik Siprofloksasin. *Jurnal e-Biomedik*, 3(4).
- Krisnaningsih, F.M., Asmara, W. & Wibowo, M.H., 2005. Uji Sensitivitas Isolat *Escherichia coli* Pada Ayam Terhadap Beberapa Jenis Antibiotik. *Journal Sain*, 1, pp.13–18.
- Kusuma, S., 2010. *Escherichia coli*. , pp.1–11.
- Langga, I., Restu, M. & Tutik, K., 2012. Optimalisasi Suhu dan Lama Inkubasi Dalam Ekstraksi DNA Tanaman Bittii (*Vitex cofassus* Reinw) Serta Analisis Keragaman Genetik Dengan Teknik RAPD-PCR. , 12(3), pp.265–276.
- Lee, S.V. & Bahaman, A.R., 2010. Modified gel preparation for distinct DNA fragment analysis in agarose gel electrophoresis. , 27(2), pp.351–354.
- Marwati, N., Mardani, N. & Sundra I, K., 2008. Kualitas Air Sumur Gali Ditinjau Dai Kondisi Lingkungan dan Perilaku Masyarakat Di Wilayah Puskesmas Denpasar Selatan. , 5(1), pp.63–69.
- Melliawati, R., 2009. *Escherichia coli* dalam kehidupan manusia. *BioTrends*, 4(1), pp.10–14.
- Nicklin, J., Cook, K.G., Paget, T., Killington, R.A.1999. *Instant Notes in Microbiology*. Bios, Scientific Publisher, UK. :122-128.
- Odeyemi, A.T., Ajayi, A.O. & Igbalajobi, O.A., 2013. Plasmid Profile of isolated Bacteria from Arinta Waterfall in Ipole-Iloro Ekiti. *Journal of Microbiology Research*, 3(1), pp.32–38.
- Parera, M.J. & Rumampuk, J.F., 2013. Analisis Perbedaan Pada Uji Kualitas Air Sumur Di Kelurahan Madidir Ure Kota Bitung Berdasarkan Parameter Fisika. *Jurnal e-Biomedik*, 1(Maret), pp.466–472.
- Radji, M., Oktavia, H. & Suryadi, H., 2008. Pemeriksaan Bakteriologis Air Depo Air Minum Isi Ulang Di Srengseng Sawah Jakarta. , 5(Agustus), pp.101–109.

- Rahmah, H., 2014. Efek Vitamin C Terhadap Jumlah Spermatozoa Mencit Yang Diinduksi Gentamisin. , pp.1–39.
- Reygaert, W.C., 2013. Antimicrobial resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus*. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, pp.297–305.
- Safitri, I., 2010. Analisis Penggunaan Antibiotik Pada Pasien Demam Tifoid di Instalasi Rawat Inap Rumah Sakit PKU Muhammadiyah Surakarta Tahun 2009. , pp.1–15.
- Suarjana, I., 2009. (The Quality of Water Layer Farming at Piling Village, Penebel Distric and Tabanan Regency Based on Ammount of Coliform). , 1(2), pp.55–60.
- Sudigdoadi, S., 2007. Mekanisme Timbulnya Resistensi Antibiotik Pada Infeksi Bakteri. , pp.1–14.
- Sulistiyaniingsih, D.R., 2007. Amoksisilin Dalam Aqua Pro Injeksi Pada Variasi Suhu Penyimpanan dan Konsentari.
- Tabatabaei, M., Marashi, N.F. & Mokarizade, A., 2010. Transferable Plasmid Mediating Multi-Antibiotic Resistance in Non-Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Chicken Flocks. *Global Veterinaria*, 5(6), pp.371–375.
- Thanassi, D.G., Bliska, J.B. & Christie, P.J., 2012. Gram-negative bacteria : diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev*, 36(5), pp.1046–1082.
- Wasitaningrum, I., 2009. Uji Resistensi Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dari Isolat Susu Sapi Segar Terhadap Beberapa Antibiotik. , pp.0–29.
- Wibowo, M.H., Sri. N, W. & Asmara, W., 2011. Plasmid Profile Of Antibiotic Resistant *Escherichia coli* Isolated. , 29, pp.43–50.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M. & Woolverton, C.J., 2009. *Prescott's Principle of Microbiology*, Michelle Watnick.
- Yenny & Herwana, E., 2007. Resistensi dari bakteri enterik : aspek global terhadap antimikroba. , 26(1).
- Yulianti, E., 2006. Pengembangan Teknik Isolasi DNA Tumbuhan Menggunakan Detergen Komersial. *Seminar Nasional MIPA*.

LAMPIRAN 1

**DAFTAR HASIL UJI SENSITIVITAS ANTIBIOTIK *Escherichia coli* ISOLAT AIR SUMUR GALI
DESA WONOSALAM KABUPATEN DEMAK**

NO	SAMPel	GENTAMICIN (CN 10 µg)			CIPROFLOXACIN (CIP 5µg)			CHLORAMPHENICOL (C 30µg)			AMPICILLIN (AMP 10 µg)		
		R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
1	SG 1A	12,25 mm	✓		17,05 mm	✓		20,45 mm		✓	8,15 mm	✓	
2	SG 3C	20,15 mm		✓	29,30 mm		✓	9,05 mm	✓		0 mm	✓	
3	SG 4A1	21,45 mm		✓	33,05 mm		✓	20,10 mm		✓	0 mm	✓	
4	SG 4A2	13,15 mm		✓	24,30 mm		✓	21,30 mm		✓	3,15 mm	✓	
5	SG 5C	16,00 mm		✓	23,30 mm		✓	22,15 mm		✓	9,05 mm	✓	
6	SG 7C	14,25 mm		✓	23,15 mm		✓	25,20 mm		✓	13,25 mm	✓	
7	SG 8A1	21,00 mm		✓	32,15 mm		✓	26,35 mm		✓	12,00 mm	✓	
8	SG 9B	16,15 mm		✓	23,35 mm		✓	2,00 mm	✓		1,00 mm	✓	
9	SG 10B	18,20 mm		✓	33,45 mm		✓	18,45 mm		✓	8,35 mm	✓	
10	SG 11C	16,20 mm		✓	23,30 mm		✓	23,05 mm		✓	15,45 mm		✓
11	SG 12A	16,40 mm		✓	26,45 mm		✓	20,10 mm		✓	20,10 mm		✓
12	SG 14B	12,22 mm	✓		17,00 mm	✓		20,27 mm		✓	11,27 mm	✓	
13	SG 15B	13,15 mm		✓	14,05 mm	✓		17,35 mm		✓	0 mm	✓	
14	SG 16A	14,07 mm		✓	0 mm	✓		19,00 mm		✓	25,45 mm		✓
15	SG 18A	14,00 mm		✓	25,45 mm		✓	16,30 mm		✓	21,05 mm		✓
16	SG 19A	13,27 mm		✓	21,05 mm		✓	18,40 mm		✓	24,20 mm		✓
17	SG 20B	14,07 mm		✓	24,20 mm		✓	17,17 mm		✓	14,07 mm		✓

LAMPIRAN 2

A. Pembuatan media MHA (Muller Hinton Agar)

1. Media MHA (stok) 1 gram
2. Aquadest 2000 ml

Dihomogenkan, kemudian dimasak hingga mendidih. Setelah mendidih, dipindah pada erlenmeyer dan di autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit. Dituang pada cawan petri.

B. Pembuatan *Lysing Solution I*

1. 50 mM Glukosa (2M) dari stok 1 gram
2. 10 mM EDTA (0,5M) 0,3846 gram
3. 25 mM Tris (1M) 0,30 gram
4. Aquades 100 mL

Diambil labu ukur 100 mL, kemudian dihomogenkan semua bahan dan ditepatkan dengan aquadest hingga volume 100 mL.

C. Pembuatan *Lysing Solution II*

1. 0,4 M NaOH 1,6 gram
2. SDS 2% 1 gram
3. Aquades 50 mL

Dibuat satu per satu dengan menggunakan labu ukur 50 mL. Saat akan digunakan baru dihomogenkan keduanya.

D. Pembuatan *Lysing Solution III*

1. 5 M Kalium Asetat (pH 4,8) 60 mL
2. Asam asetat 11,5 mL
3. Aquades 100 mL

Diambil labu ukur 100 mL, kemudian dihomogenkan semua bahan dan ditepatkan dengan aquadest hingga volume 100 mL.

E. Pembuatan larutan TAE 1x sebanyak 1 L

1. TAE 5x 200 mL
2. Aquades 1000 mL

Dipipet 200 mL TAE 5x (stok), kemudian add kan dengan aquades hingga volume 100 mL.

F. Pembuatan gel agarosa 1,5%

1. Gel Agarosa 1,5 gram
2. *Ethidium Bromide* 4 μ l
3. TAE 150 mL

Ditimbang 1,5 gram gel agarosa kemudian dilarutkan dengan larutan TAE sebanyak 150 mL (larutkan didalam oven). Setelah larut, ditunggu hingga gel tidak begitu panas, kemudian ditambah 4 μ l cybro safe dan tuang pada cetakan.

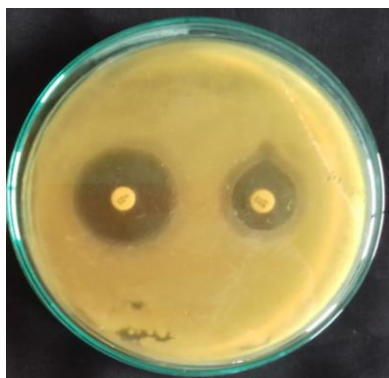
G. Pembuatan media LB (Lauria Bertani)

1. Tryptone 1 gram
2. Yeast extract 0,5 gram
3. NaCl 1 gram
4. Aquades 100 mL

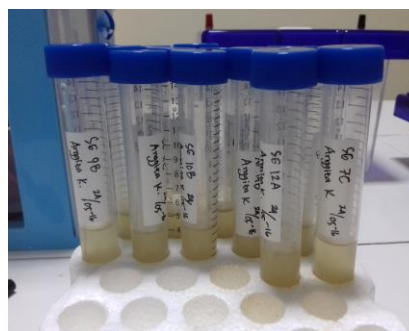
Dilarutkan semua bahan dengan aquades, diukur pH hingga 7,4 dengan NaOH 1 N, kemudian disterilkan. Media siap digunakan.



LAMPIRAN 3



Hasil Uji Sensitivitas isolat *E.coli* air sumur gali di Kabupaten Demak



Proses isolasi DNA plasmid *E.coli*



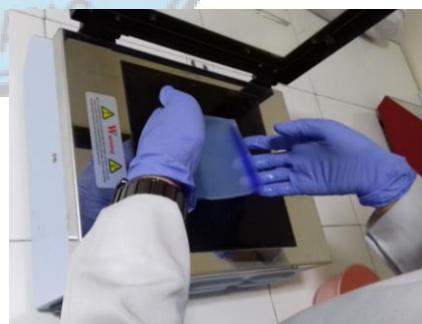
Inkubasi setelah penambahan RNase



Persiapan running elektroforesis



Proses running elektroforesis gel Agarosa 1,5%



Pembacaan hasil elektroforesis gel Agarosa dengan UV Transilluminator