

**ANALISIS KUALITATIF *Escherichia coli* SEROTYPE O157:H7  
PADA AIR MINUM DALAM KEMASAN DAN ISI ULANG  
DENGAN TEKNIK PCR DI MAKASSAR**

*A QUALITATIVE ANALYSIS ON *Escherichia coli* SEROTYPE O157:H7  
IN PACKAGED AND REFILLED DRINKING WATER  
WITH PCR TECHNIQUE IN MAKASSAR*

**FEBBY ESTER FANY KANDOU**



**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**2008**

**ANALISIS KUALITATIF *Escherichia coli* SEROTYPE O157:H7  
PADA AIR MINUM DALAM KEMASAN DAN ISI ULANG  
DENGAN TEKNIK PCR DI MAKASSAR**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi  
Biomedik / Mikrobiologi

Disusun dan diajukan oleh

**FEBBY ESTER FANY KANDOU**

Kepada

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2008**

## TESIS

### ANALISIS KUALITATIF *Escherichia coli* SEROTYPE O157:H7 PADA AIR MINUM DALAM KEMASAN DAN ISI ULANG DENGAN TEKNIK PCR DI MAKASSAR

Disusun dan diajukan oleh:

**FEBBY ESTER FANY KANDOU**

**Nomor Pokok P1506206002**

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis  
pada tanggal 2 Agustus 2008  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui  
Komisi Penasihat

---

Prof. dr. Moch. Hatta, Sp MK, Ph.D

K e t u a

Ketua Program Studi Biomedik

---

Prof. dr. Hj. Rosdiana Natsir, Ph.D

---

dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D

Anggota

Direktur Program Pascasarjana  
Universitas Hasanuddin

---

Prof. Dr. dr. A. Razak Thaha, MSc.

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Febby Ester Fany Kandou

Nomor mahasiswa : P1506206002

Program studi : Biomedik / Mikrobiologi

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 2 Agustus 2008

Yang menyatakan

Febby Ester Fany Kandou

## PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa karena atas kasih karunia-Nya maka tesis ini dapat diselesaikan.

Gagasan yang melatari tajuk permasalahan ini timbul dari hasil pengamatan penulis terhadap kualitas air minum dalam kemasan dan isi ulang yang beredar di masyarakat. Penulis bermaksud memberikan informasi secara ilmiah kepada masyarakat tentang kualitas air minum tersebut, juga untuk pengelola air minum dalam kemasan dan isi ulang dalam upaya pengelolaan air minum yang memenuhi standar kesehatan serta untuk instansi terkait dalam melakukan pembinaan dan pengawasan mutu produk.

Banyak kendala yang dihadapi oleh penulis dalam penyusunan tesis ini, namun berkat bantuan berbagai pihak maka tesis ini dapat selesai pada waktunya. Dalam kesempatan ini penulis dengan tulus menyampaikan terima kasih kepada Prof. dr. Mochammad Hatta, Sp.MK., Ph.D sebagai Ketua Komisi Penasihat dan dr. Muhammad Nasrum Massi, Ph.D sebagai Anggota Komisi Penasihat atas bantuan dan bimbingan yang telah diberikan mulai dari pengembangan minat terhadap permasalahan penelitian ini, pelaksanaan penelitiannya sampai dengan penulisan tesis ini. Terima kasih penulis sampaikan kepada Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D.; Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS dan Prof. Dr. Akbar Tahir, MSc sebagai Panitia Penilai atas saran-saran yang diberikan demi penyempurnaan dari tesis ini. Ucapan terima

kasih juga penulis sampaikan kepada Bapak Markus, Rommy, Safri dan semua yang ada di Laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin atas bantuan yang diberikan selama penelitian. Terakhir ucapan terima kasih disampaikan kepada kedua orangtua, suami Ir. Johan A. Rombang, MSc., Ph.D. dan anak-anak Ivanno, Michelle dan Claudia tercinta atas pengertian dan pengorbanan yang diberikan, Tuhan Memberkati.

Makassar, Agustus 2008

Febby Ester Fany Kandou

## ABSTRAK

**FEBBY ESTER FANY KANDOU.** *Analisis Kualitatif Escherichia coli Serotype O157:H7 pada Air Minum Dalam Kemasan dan Isi Ulang dengan Teknik PCR di Makassar* (dibimbing oleh Mochammad Hatta dan Muhammad Nasrum Massi).

Penelitian ini bertujuan untuk (1) menganalisis keberadaan bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7 dengan menggunakan teknik kultur dan PCR pada air minum dalam kemasan dan air minum isi ulang dan (2) mengamati parameter fisik dari air minum dalam kemasan dan isi ulang yaitu warna, bau, rasa dan kekeruhan serta mengukur pH air.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Metode yang digunakan adalah teknik kultur dengan mengidentifikasi bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7 pada sampel air minum dalam kemasan dan isi ulang dengan menggunakan medium selektif Sorbitol Mac Conkey Agar dan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan mengamplifikasi DNA bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7 pada gen target *rfbE*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7 pada teknik kultur tidak terdeteksi, sedangkan pada teknik PCR sebanyak 8,33% sampel air minum dalam kemasan dan 25% sampel air minum isi ulang terkontaminasi bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7. Parameter fisik yaitu warna, bau, rasa dan kekeruhan sesuai dengan persyaratan kesehatan yang telah ditentukan. Pengukuran pH pada sampel AMDK terendah 6,02 dan tertinggi 9,24 tidak memenuhi standar yang telah ditentukan, sedangkan pH AMIU memenuhi standar kesehatan yang telah ditentukan.

## ABSTRACT

**FEBBY ESTER FANY KANDOU.** *A Qualitative Analysis on Escherichia coli Serotype O157:H7 in Packaged and Refilled Drinking Water with PCR Technique in Makassar* (supervised by Mochammad Hatta dan Muhammad Nasrum Massi).

This research aims to (1) analyze the existence of *Escherichia coli* serotype O157:H7 bacteria using culture and PCR techniques in packaged and refilled drinking water; (2) observe the physical parameters of packaged and refilled drinking water consisting of color, smell, taste, muddiness and water pH measurement.

This research was carried out at Molecular and Immunology Biology Laboratory of Medical Faculty, Hasanuddin University. The method used was culture technique by identifying *Escherichia coli* serotype O157:H7 bacteria in packaged and refilled drinking water using selective Sorbitol Mac Conkey Agar medium and *Polymerase Chain Reaction* (PCR) technique by amplifying DNA bacteria of *Escherichia coli* serotype O157:H7 at *rfbE* gene target.

The results show that *Escherichia coli* serotype O157:H7 bacteria at culture technique is not detected, whereas at PCR technique it is found that there are 8,33% of packaged drinking water samples and 25% of refilled drinking water samples are contaminated with *Escherichia coli* serotype O157:H7. Physical parameters consisting of color, smell, taste and muddiness are in line with the determined health requirement. The measurement of pH for the lowest packaged drinking water sample is 6,02 and the highest one is 9,24. This means that they do not fulfill the determined standard, whereas pH of refilled drinking water fulfills the determined health standard.

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
LEMBAR PENGAJUAN TESIS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iv
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan Penelitian	5
D. Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
A. Tinjauan Umum tentang Air Minum	7
B. Air Minum Dalam Kemasan	9
C. Depot Air Minum Isi Ulang	10

D. Proses Produksi Air Minum Dalam Kemasan dan Isi Ulang	12
E. Bakteri Coliform sebagai Indikator Mikrobiologis dalam Menentukan Kualitas Air	15
F. <i>Escherichia coli</i> serotype O157:H7	19
G. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	24
H. Kerangka Konseptual	27
BAB III METODE PENELITIAN	30
A. Rancangan Penelitian	30
B. Waktu dan Lokasi Penelitian	30
C. Populasi dan Sampel Penelitian	31
D. Definisi Operasional	31
E. Alat dan Bahan	32
F. Instrumen Pengumpulan Data	33
1. Teknik Pengambilan Sampel	33
2. Pemeriksaan di Laboratorium	34
3. Kultur Bakteri <i>Escherichia coli</i> serotype O157:H7	34
4. Ekstraksi DNA	35
5. Amplifikasi DNA dengan PCR	36
6. Deteksi Produk PCR	37
G. Analisis Data	37

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	38
A. Hasil Penelitian	38
B. Pembahasan	49
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	56
A. Kesimpulan	56
B. Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN	62
CURICULUM VITAE	73

**DAFTAR TABEL**

<b>Nomor</b>		<b>Halaman</b>
1.	Kultur bakteri <i>E.coli</i> serotype O157:H7 pada sampel AMDK	39
2.	Hasil PCR <i>E.coli</i> serotype O157:H7 pada sampel AMDK	42
3.	Warna, bau, rasa, kekeruhan dan pH dari sampel AMDK	44
4.	Kultur bakteri <i>E.coli</i> serotype O157:H7 pada sampel AMIU	45
5.	Hasil PCR <i>E.coli</i> serotype O157:H7 pada sampel AMIU	47
6.	Warna, bau, rasa, kekeruhan dan pH dari sampel AMIU	49

## DAFTAR GAMBAR

<b>Nomor</b>	<b>Halaman</b>
1. Proses <i>Reverse Osmosis</i>	15
2. <i>Escherichia coli</i> serotype O157:H7	21
3. ( <i>FRQ</i> <i>VLRMSH2</i> + <i>D GDQ</i> ( <i>FRQ</i> <i>-VLRMSH2</i> + <i>E</i> SDGD <i>LELRQDF</i> & <i>RQNH</i> \$JDU	
4. Prinsip Kerja <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	27
5. Koloni <i>Non-Sorbitol Fermenting</i> pada sampel AMDK	40
6. Perbedaan warna koloni <i>E.coli</i> pada medium SMAC Agar	41
7. Hasil PCR <i>E.coli</i> serotype O157:H7 pada sampel 1A-5A AMDK	43
8. Hasil PCR <i>E.coli</i> serotype O157:H7 pada sampel 5B-8C AMDK	43
9. Pertumbuhan koloni bakteri pada sampel AMIU	46
10. Hasil PCR <i>E.coli</i> serotype O157:H7 pada sampel 9C-12C AMIU	48

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Nomor</b>	<b>Halaman</b>
1. Persyaratan Kualitas Air Minum Menurut Permenkes Tahun 2002	62
2. Persyaratan Produk Air Minum Standar Nasional dan Internasional	63
3. Sistem Pengolahan Air Minum Secara Ultra Violet dan Ozonisasi	64
4. Karakteristik dari <i>Escherichia coli</i> serotype O157:H7	65
5. Estimasi Dosis Infeksius dari Spesies Bakteri yang Berhubungan dengan Diare	66
6. Skema Penelitian	67
7. Komposisi Medium Sorbitol Mac Conkey Agar, Mac Conkey Agar dan Mac Conkey Agar Base	70
8. NCBI Sequence DNA <i>Escherichia coli</i> serotype O157:H7	71

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang Masalah**

Sejak dasawarsa yang lalu telah berkembang industri air minum dalam kemasan (AMDK), merupakan air minum yang siap dikonsumsi secara langsung tanpa harus melalui proses pemanasan terlebih dahulu. Semakin banyaknya minat masyarakat terhadap air minum kemasan, mendorong pertumbuhan industri ini di kota-kota besar di Indonesia. Selain itu, industri air minum isi ulang (AMIU) atau air minum depot isi ulang (AMDIU) juga tumbuh pesat. Depot melakukan proses pengolahan dari air baku menjadi air minum dalam kemasan isi ulang (gallon) yang dapat langsung diminum (Suprihatin, 2004). Sejauh ini pemakaian AMIU dianggap sangat membantu masyarakat terutama di lokasi yang sulit memperoleh air bersih untuk konsumsi sehari-hari. Di samping itu, AMIU dianggap murah, efisien, mudah diperoleh dan harganya bisa sepertiga dari produk air minum kemasan yang bermerek, sehingga banyak rumah tangga yang beralih ke layanan ini (Poedji, 2004).

Masalah yang timbul sekarang adalah masalah kualitas air minum yang tampaknya menimbulkan keresahan di kalangan masyarakat. Air yang layak diminum harus memenuhi tiga persyaratan kelayakan yaitu dari segi fisik, kimia dan mikrobiologis. Syarat air minum adalah harus aman diminum

artinya bebas mikroba patogen dan zat berbahaya, syarat lainnya diterima dari segi warna, rasa, bau dan kekeruhannya (Soemirat, 2004).

Hasil survei kualitas mikrobiologis pada air minum dalam kemasan di Canada, tahun 1981-1989 sekitar 40% air minum dalam kemasan yang dijual mengandung bakteri aerob. Tahun 1992-1997, ditemukan sekitar 1,2% terkontaminasi *Pseudomonas aeruginosa*, 0,6% terkontaminasi *Aeromonas hydrophila*, 3,7% oleh koliform dan 2,1% oleh koliform fekal (Lacroix, 2008).

Forum Komunikasi Pengelolaan Kualitas Air Minum Indonesia, melakukan penelitian terhadap 96 depot dari 1200 depot air minum di Jakarta, hasilnya didapat 19,79% air yang diperiksa tercemar bakteri coliform dan sebanyak 5,21% tercemar bakteri coli tinja ( *E. coli* ) (Tempo interaktif, 2003). Hasil penelitian oleh Lembaga Perlindungan Konsumen Surabaya (LPKS) menyebutkan bahwa kualitas air dari 54 depot air minum isi ulang di Surabaya tidak layak dikonsumsi dan dapat menyebabkan penyakit diare, dengan ditemukannya bakteri *Escherichia coli* bahkan *Salmonella* dalam air minum isi ulang yang diambil dari beberapa depot (Kompas, 2003).

Hasil penelitian air minum isi ulang di daerah Jabotabek 2003-Maret 2004 oleh Pusat Penelitian Pemberantasan Penyakit, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI, Jakarta menyebutkan bahwa secara mikrobiologis air minum isi ulang di daerah Jabotabek tidak memenuhi syarat kesehatan yaitu ditemukan bakteri aerob pada air minum isi ulang di DKI Jakarta 32%, Bogor 12,5%, Tangerang 20% dan Bekasi 38%.

Juga ditemukan air minum isi ulang yang masih mengandung bakteri coliform dan *Escherichia coli* di DKI Jakarta 1,7%, Bogor 6%, Tangerang 11% dan Bekasi tidak ditemukan (Pracoyo, dkk, 2006). Hasil penelitian kualitas air minum isi ulang di Makassar pada tahun 2004 menyebutkan bahwa secara kimia dan mikrobiologis air minum isi ulang yang diambil dari beberapa depot memenuhi syarat kesehatan (Poedji, 2004).

Pada tahun 2007, Dinas Kesehatan Kota Makassar mendata sekitar 250 depot air minum isi ulang yang beroperasi di wilayah Kota Makassar. Pemeriksaan rutin dilakukan setiap bulan terhadap kebersihan lokasi depot air minum isi ulang dan pemeriksaan terhadap kualitas air minum isi ulang dilakukan setiap tiga bulan. Meskipun demikian, masih ada depot air minum isi ulang yang airnya tidak higienis, hal ini terbukti dengan ditemukannya air berlumut atau yang mengandung kotoran pada air kemasan merek terkenal dan air dari depot isi ulang di Kota Makassar (Tribun Timur, 16 Agustus 2007).

*Escherichia coli* adalah bakteri yang hidup secara normal dalam usus manusia dan hewan, bakteri ini dapat juga hidup di makanan, air dan tanah (Wikipedia, 2007). Kehadiran *E.coli* di dalam air atau makanan dapat digunakan sebagai indikator mikrobiologis untuk kontaminasi fekal dan sebagai ukuran untuk kualitas sanitasi (Tsen, *et al.* 1998). Sel-sel *E.coli* yang terdapat dalam air dan makanan pada umumnya merupakan *E.coli* non-patogen, walaupun pada sejumlah kasus, strain-strain patogen seperti

enterotoksigenik dan sel-sel *E.coli* yang memproduksi shiga-like toksin (STEC) juga dapat hadir dalam air dan makanan (Echeverria, *et al.* 1984; Candrian, *et al.* 1991; Lee Lang, *et al.* 1991 dalam Tsen, *et al.* 1998).

Pada penelitian ini lebih difokuskan pada bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7. Bakteri ini merupakan bakteri patogen yang penting sebab dapat menyebabkan beragam penyakit pada manusia diantaranya *hemorrhagic colitis* yaitu peradangan pada usus besar yang mengakibatkan pendarahan (*bloody diarrhea*) dan penyakit *hemolytic uremic syndrome (HUS)* yang mengakibatkan gagal ginjal dan anemia (Clark, 2007; Anonim, 2006). Penyebaran utama dari bakteri *E. coli* serotype O157:H7 adalah berasal dari air dan makanan, bakteri ini dapat dengan mudah beradaptasi dan bertahan pada kondisi lingkungan yang luas seperti perubahan dalam temperatur dan pH rendah (Yaron and Matthews, 2002). Penyebaran bakteri *E. coli* serotype O157:H7 dapat juga melalui air minum dan air kolam renang yang terkontaminasi (Zhao, *et al.* 2001).

Metode yang umum digunakan untuk pengujian kualitas air secara mikrobiologis adalah menghitung jumlah bakteri coliform di dalam sampel air secara kuantitatif dan kualitatif. Metode molekuler untuk menguji kualitas air yaitu menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dengan tingkat keakuratan yang lebih tinggi. PCR adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu. Dalam teknik ini yang harus dilakukan adalah mengisolasi sel-sel bakteri dari

sampel air, kemudian dilakukan amplifikasi DNA dari bakteri tersebut (Yuwono, 2006).

Berdasarkan uraian latar belakang masalah maka mendorong penulis untuk mengadakan penelitian tentang pengujian kualitas air minum dalam kemasan dan isi ulang secara mikrobiologis dengan menggunakan teknik PCR untuk menganalisis keberadaan bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7. Sebagai gen target adalah *rfbE* dengan posisi sekuens gen pada strand 5' – 3' yaitu 7441 – 7680 bp, ukuran produk PCR adalah 239 bp (Morin *et al.* 2004).

### **B. Rumusan Masalah**

Dengan memperhatikan latar belakang masalah maka permasalahan utama yang menjadi pertanyaan spesifik penelitian ini adalah: Apakah air minum dalam kemasan dan isi ulang tercemar oleh bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7?

### **C. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Menganalisis keberadaan bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7 dengan menggunakan teknik kultur dan PCR pada air minum dalam kemasan dan isi ulang.
2. Mengamati parameter fisik dari air minum dalam kemasan dan isi ulang yaitu warna, rasa, bau dan kekeruhan serta mengukur pH air.

#### **D. Manfaat Penelitian**

1. Sebagai informasi bagi masyarakat mengenai kualitas air minum dalam kemasan dan isi ulang.
2. Sebagai informasi ilmiah bagi perusahaan air minum dalam kemasan dan pengelola depot air minum dalam upaya pengelolaan air minum yang memenuhi standar kesehatan.
3. Sebagai bahan masukan bagi instansi terkait dalam melakukan pembinaan dan pengawasan kualitas air minum dalam kemasan dan isi ulang.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tinjauan Umum tentang Air Minum**

Air minum adalah salah satu kebutuhan utama bagi manusia. Air minum yang ideal seharusnya jernih, tidak berwarna, tidak berasa dan tidak berbau. Air minumpun seharusnya tidak mengandung kuman patogen dan segala organisme yang membahayakan kesehatan manusia, tidak mengandung zat kimia yang dapat mengubah fungsi tubuh, tidak korosif dan tidak meninggalkan endapan pada seluruh jaringan distribusinya. Pada hakekatnya, tujuan ini dibuat untuk mencegah terjadinya serta meluasnya penyakit bawaan air (*water borne disease*) (Soemirat, 2004).

Menurut Permenkes RI No. 907/Menkes/SK/VII/2002, air minum adalah air yang melalui proses pengolahan atau tanpa proses pengolahan yang memenuhi syarat kesehatan dan dapat langsung di minum. Jenis air minum meliputi: air yang didistribusikan melalui pipa untuk keperluan rumah tangga; air yang didistribusikan melalui tangki air; air kemasan dan air yang digunakan untuk produksi bahan makanan dan minuman yang disajikan kepada masyarakat, yang harus memenuhi syarat-syarat kualitas air minum.

Kualitas air adalah sifat air, kandungan organisme serta zat dalam air yang dapat dilihat atau diukur dari berbagai parameter baik fisik, kimia dan

mikrobiologis. Terjadinya penyimpangan terhadap standar parameter ini dapat mengubah kualitas air minum tersebut sehingga tidak dapat dimanfaatkan sesuai dengan peruntukannya.

Pada Peraturan Menkes RI No. 907/Menkes/SK/VI/2002 tanggal 29 Juli 2002 dijelaskan tentang syarat-syarat dan pengawasan kualitas air minum, termasuk air minum dalam kemasan dan isi ulang. Penetapan peraturan tentang persyaratan kualitas air minum dimaksudkan agar penyediaan air minum bagi masyarakat terjamin kualitasnya, sehingga tidak terjadi keracunan atau penyakit. Dalam rangka pengawasan kualitas air minum secara rutin yang dilakukan oleh Dinas Kesehatan Kota/Kabupaten, maka parameter kualitas air minimal yang harus diperiksa di laboratorium adalah sebagai berikut:

1. Parameter yang berhubungan langsung dengan kesehatan:
  - a. Parameter mikrobiologis: total bakteri coliform dan fecal coli (*E. coli*)
  - b. Parameter kimiawi: arsen, fluorida, kromium, kadmium, nitrit, nitrat, sianida dan selenium
2. Parameter yang tidak langsung berhubungan dengan kesehatan:
  - a. Parameter fisik: bau, warna, kekeruhan, rasa dan suhu
  - b. Parameter kimiawi: aluminium, besi, kesadahan, khlorida, mangan, pH, seng, sulfat, tembaga, sisa khlor dan amonia

## **B. Air Minum Dalam Kemasan (AMDK)**

Air minum kemasan atau dengan istilah air minum dalam kemasan (AMDK), merupakan air minum yang siap di konsumsi secara langsung tanpa harus melalui proses pemanasan terlebih dahulu dan dikemas dalam berbagai bentuk wadah 19 liter (gallon) , 1500 mL / 600 mL (botol) dan 240 mL /220 mL (gelas). Air kemasan diproses dalam beberapa tahap baik menggunakan proses pemurnian air (*Reverse Osmosis* / tanpa mineral) maupun proses biasa *Water treatment processing* (mineral) dimana sumber air yang digunakan untuk air kemasan mineral berasal dari mata air pegunungan sementara air kemasan non mineral biasanya digunakan sumber mata air tanah atau mata air pegunungan (Zeofilt, 2008)

Proses air minum dalam kemasan (AMDK) harus melalui proses tahapan baik secara klinis maupun secara hukum, secara higines klinis biasanya disahkan menurut peraturan pemerintah melalui Badan Pengawasan Obat dan Makanan (Badan POM RI) baik dari segi kimia, fisik dan mikrobiologis. Tahapan secara hukum biasanya melalui proses pengukuhan merek dagang, hak paten, sertifikasi dan asosiasi yang mana keseluruhannya mengacu pada peraturan pemerintah melalui Deperindag. Air minum dalam kemasan harus memenuhi standar nasional (SNI dengan kode SNI No.01-3553-1996) tentang standar baku mutu air dalam kemasan,

serta MD yang dikeluarkan oleh BPOM RI yang merupakan standar baku kimia, fisik dan mikrobiologis (Zeofilt, 2008).

Pada dasarnya air minum dalam kemasan (AMDK) diproses melalui 3 tahap yaitu: penyaringan, desinfeksi dan pengisian. Penyaringan dimaksudkan untuk menghilangkan kotoran dan bau yang terkandung dalam air. Desinfeksi bertujuan untuk membunuh bakteri patogen dalam air. Pengisian merupakan tahap akhir berupa pengemasan air yang telah diproses (Pedoman Proses AMDK, 2008).

### **C. Depot Air Minum Isi Ulang**

Menurut Deperindag (2004), Depot Air Minum adalah usaha industri yang melakukan proses pengolahan air baku menjadi air minum dan menjual langsung kepada konsumen. Lokasi di Depot Air Minum harus terbebas dari pencemaran yang berasal dari debu di sekitar depot, daerah tempat pembuangan kotoran/sampah, tempat penumpukan barang bekas, tempat bersembunyi dan berkembang biak serangga, binatang kecil, pengerat dan lain-lain, tempat yang kurang baik sistem saluran pembuangan air dan tempat-tempat lain yang diduga dapat mengakibatkan pencemaran.

Bahan baku utama yang digunakan adalah air yang diambil dari sumber yang terjamin kualitasnya, tidak diperbolehkan mengambil air baku yang berasal dari air PDAM yang ada dalam jaringan distribusi untuk rumah

tangga. Beberapa hal yang harus dilakukan untuk menjamin mutu air baku meliputi:

1. Sumber air baku harus terlindung dari cemaran kimia dan mikrobiologis yang bersifat merusak/mengganggu kesehatan
2. Air baku diperiksa secara berkala terhadap parameter fisik, kimia dan mikrobiologis

Seluruh mesin dan peralatan produksi yang kontak langsung dengan air harus terbuat dari bahan tara pangan (*food grade*), tahan korosi dan tidak bereaksi dengan bahan kimia. Mesin dan peralatan dalam proses produksi di Depot Air Minum sekurang-kurangnya terdiri dari:

1. Bak atau tangki penampung air baku
2. Unit pengolahan air (*water treatment*) terdiri dari:
  - a. Prefilter (saringan pasir) yang berfungsi menyaring partikel-partikel yang kasar, dengan bahan dari pasir atau jenis lain yang efektif dengan fungsi yang sama
  - b. Karbon filter berfungsi sebagai penyerap bau, rasa, warna, sisa klor dan bahan organik
  - c. Filter lain berfungsi sebagai saringan halus berukuran maksimal 10 mikron
  - d. Alat desinfektan (ozonisasi dan ultraviolet) yang berfungsi untuk membunuh kuman patogen

3. Alat pengisian yaitu mesin dan alat untuk memasukkan air minum ke dalam wadah

Sebelum dijual untuk pertama kali produk air minum harus dilakukan pengujian mutu yang dilakukan oleh laboratorium yang terakreditasi atau yang ditunjuk oleh Pemerintah Kota/Kabupaten yang terakreditasi. Pengujian mutu air minum wajib memenuhi persyaratan Keputusan Menteri Kesehatan No. 907/Menkes/SK/VII/2002.

#### **D. Proses Produksi Air Minum Dalam Kemasan dan Isi Ulang**

Proses pengolahan air minum pada prinsipnya harus mampu menghilangkan semua jenis polutan, baik pencemar fisik, kimia dan mikrobiologis (Suprihatin, 2004). Menurut Peraturan Menteri Perindustrian dan Perdagangan (2004), urutan proses produksi air minum dalam kemasan dan air minum isi ulang adalah sebagai berikut:

##### **1. Penampungan Air Baku dan Syarat Bak Penampung**

Air baku yang diambil dari sumbernya diangkut dengan menggunakan tangki dan selanjutnya ditampung dalam bak atau tangki penampung (reservoir). Bak penampung harus dibuat dari bahan tara pangan (*food grade*) dan harus bebas dari bahan-bahan yang dapat mencemari air.

Tangki pengangkutan mempunyai persyaratan yang terdiri atas:

- a. Khusus digunakan untuk air minum
- b. Mudah dibersihkan serta di desinfeksi

- c. Harus mempunyai manhole
- d. Pengisian dan pengeluaran air harus melalui kran
- e. Selang dan pompa yang dipakai untuk bongkar muat air baku harus diberi penutup yang baik, disimpan dengan aman dan dilindungi dari kemungkinan kontaminasi

2. Penyaringan bertahap terdiri dari:

- a. Saringan berasal dari pasir atau saringan lain yang efektif dengan fungsi yang sama. Bahan yang dipakai adalah butir-butir silica ( $\text{SiO}_2$ ) minimal 80%.
- b. Saringan karbon aktif yang berasal dari batu bara atau batok kelapa
- c. Saringan/filter lainnya

3. Desinfeksi

Desinfeksi dimaksudkan untuk membunuh kuman patogen. Proses desinfeksi dengan menggunakan ozon ( $\text{O}_3$ ) berlangsung dalam tangki atau alat pencampur ozon lainnya dengan konsentrasi ozon minimal 0,1 ppm dan residu ozon sesaat setelah pengisian berkisar antara 0,06-0,1 ppm. Tindakan desinfeksi lain yaitu dengan cara penyinaran Ultra Violet (UV) dengan panjang gelombang 254 nm atau kekuatan  $2537^0\text{A}$  dengan intensitas minimum 10.000 mw detik per  $\text{cm}^2$ .

#### 4. Pembilasan, Pencucian dan Sterilisasi Wadah

Wadah yang dapat digunakan adalah wadah yang terbuat dari bahan tara pangan (*food grade*) dan bersih. Wadah yang akan diisi harus disanitasi dengan menggunakan ozon ( $O_3$ ) atau air ozon.

#### 5. Pengisian

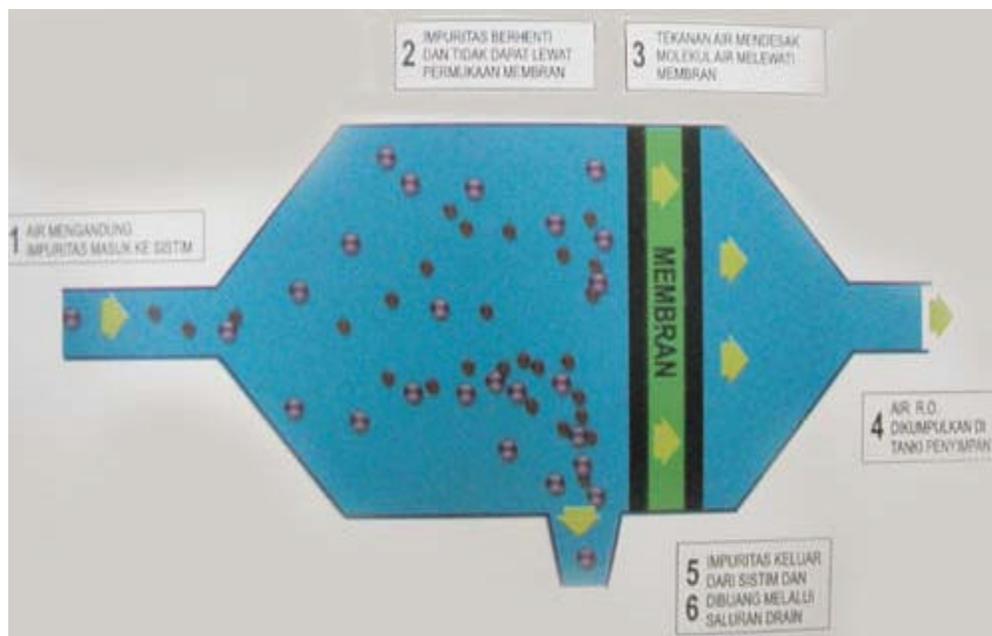
Pengisian wadah dilakukan dengan menggunakan alat dan mesin serta dilakukan dalam tempat pengisian yang higienis

#### 6. Penutupan

Penutupan wadah dapat dilakukan dengan tutup yang dibawa oleh konsumen dan atau yang disediakan oleh Depot Air Minum

Proses pengolahan alternatif adalah menggunakan metode *Reverse Osmosis* yaitu suatu teknologi pemurnian air yang paling modern, yang menggunakan membran semipermeabel yang sangat efektif, ekonomis dan mudah pemeliharaannya. Metode ini mampu membersihkan air hingga 90-99% dari segala macam pencemar yang terkandung di dalam air sehingga menghasilkan air yang bersih dan murni. Osmosis adalah suatu proses alami dimana dua macam larutan yang berbeda kepekatan/konsentrasinya dipisahkan oleh sebuah membran semipermeabel, sehingga larutan yang lebih rendah kepekatannya akan bergerak menembus membran semipermeabel menuju cairan yang lebih tinggi kepekatannya sampai terjadi keseimbangan kepekatan/ konsentrasi.

*Reverse Osmosis* (Osmosis balik) adalah penerapan tekanan pada sisi larutan yang mempunyai kepekatan/ konsentrasi tinggi, sehingga larutan mengalir dari yang lebih tinggi kepekatannya menuju larutan yang lebih rendah kepekatannya sampai terjadi keseimbangan kepekatan/ konsentrasi (Gambar 1) (Anonim, 2007).



Gambar 1. Proses *Reverse Osmosis* ( [www.fujiro.com](http://www.fujiro.com) )

### **E. Bakteri Coliform sebagai Indikator Mikrobiologis dalam Menentukan Kualitas Air**

Mikroorganisme indikator yang digunakan dalam analisis kualitas air adalah mikroorganisme yang kehadirannya di dalam air merupakan bukti bahwa air tersebut tercemar atau terkontaminasi oleh bahan tinja dari

manusia atau hewan berdarah panas (Todar, 2004). Dari beberapa jenis atau kelompok bakteri yang telah dievaluasi untuk menentukan sesuai tidaknya untuk digunakan sebagai organisme indikator, maka yang memenuhi persyaratan adalah *Escherichia coli* dan kelompok bakteri coliform lainnya. Bakteri coliform merupakan suatu kelompok bakteri yang sering digunakan sebagai indikator adanya kotoran dan kondisi sanitasi yang tidak baik terhadap air dan makanan sehingga tidak layak untuk dikonsumsi. Bakteri coliform dapat dibedakan menjadi dua grup yaitu:

1. Coliform fekal yang berasal dari kotoran (tinja) hewan maupun manusia, misalnya *Escherichia coli*.
2. Coliform non fekal biasanya ditemukan pada hewan atau manusia yang telah mati, misalnya *Enterobacter*, *Klebsiella* (Pelczar dan Chan, 1988).

Karakteristik dari bakteri coliform (famili Enterobacteriaceae) adalah bersifat Gram negatif, berbentuk batang, berukuran  $0,3 - 1,0 \times 1,0 - 6,0 \mu\text{m}$ , pergerakan dengan flagella peritrik, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora dan dapat memfermentasikan laktosa dengan membentuk gas. Tumbuh baik pada media yang mengandung pepton atau *beef extract* antara  $22^{\circ} - 35^{\circ}\text{C}$ , juga tumbuh pada Mac Conkey Agar yang mana digunakan sebagai media selektif. Bakteri ini tersebar luas dalam air, tanah dan sebagai flora normal dalam usus manusia dan hewan. *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*,

*Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* dan *Yersinia* diklassifikasikan ke dalam subklas Gammaproteobacteria, ordo Enterobacteriales dan famili Enterobacteriaceae (Todar, 2004).

*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 komensal 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)).

Berdasarkan sifat patogenik dan virulensinya, maka *Escherichia coli* dibagi menjadi lima grup Enterovirulen *Escherichia coli* (EEC), yaitu:

1. *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC), jika strain ini melakukan penetrasi dan menggandakan diri di dalam sel-sel epitel usus besar sehingga terjadi kerusakan sel yang tersebar pada usus besar dan menyebabkan diare yang hebat (Tarr, 1995). Menurut Todar (2004), *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC) menyerupai *Shigella* dalam mekanisme patogeniknya dan menghasilkan berbagai macam penyakit. Sindrom klinis identik dengan disentri yang disebabkan oleh *Shigella*, diare yang disertai demam. EIEC adalah organisme yang

invasif, mereka tidak menghasilkan LT (*heat-labile*) toksin atau ST (*heat-stable*) toksin dan mereka tidak menghasilkan Shiga toksin.

2. *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC), diwakili oleh satu strain yaitu serotype O157:H7 yang menyebabkan suatu sindrom diare yang berbeda dari EIEC (dan *Shigella*) dalam hal pelepasan darah yang berlebihan dan tidak disertai demam (Todar, 2004). *Escherichia coli* serotype O157:H7 digambarkan sebagai suatu strain *enterohemorrhagic* karena strain ini sering menghasilkan pendarahan diare pada pasien yang terinfeksi (Tarr, 1995). Diare pada anak-anak yang disebabkan oleh strain ini dapat berakibat fatal dan situasi yang sering mengancam kehidupan adalah efek toksiknya pada ginjal yang menyebabkan gagal ginjal akut (*hemolytic uremic syndrome, HUS*). Bakteri ini tidak menyerang sel-sel mukosa seperti *Shigella*, tetapi menghasilkan toksin yang sebenarnya identik dengan Shiga toksin yang disebut Shiga-like toksin (Todar, 2004).
3. *Enteraggregative Escherichia coli* (EAggEC), dapat menyebabkan diare yang akut dan kronik yang persisten (dalam waktu lama) pada anak-anak. Bakteri ini melekat pada sel-sel epitel dalam suatu pola yang menyerupai suatu tumpukan batubata dan menghasilkan toksin EnteroAggregative ST (EAST) (Tarr, 1995).
4. *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), dapat menyebabkan diare yang berair yang sama dengan *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC). Tidak

memproduksi LT atau ST toksin, namun dilaporkan bahwa mereka memproduksi suatu enterotoksin. Strain EPEC disebut juga '*moderately invasive*' (bersifat invasi yang sedang). Diare dan gejala-gejala lain dari infeksi EPEC kemungkinan disebabkan oleh invasi/penyerangan bakteri ke sel-sel inang daripada disebabkan oleh produksi toksin (Todar, 2004).

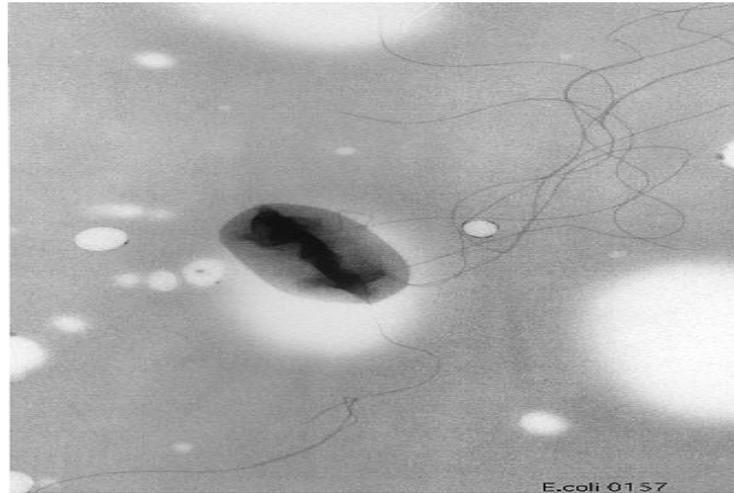
5. *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC), gejala-gejala infeksi ETEC yaitu diare tanpa demam. Bakteri bersifat non-invasif, menghasilkan LT atau ST toksin (Todar, 2004).

#### **F. *Escherichia coli* serotype O157:H7**

*Escherichia coli* serotype O157:H7 merupakan satu dari ratusan strain bakteri *Escherichia coli* yang berbahaya, menghasilkan toksin yang sangat kuat dan dapat menyebabkan penyakit berat (Clark, 2007). *E. coli* serotype O157:H7 pertama kali dikenal sebagai patogen akibat hasil dari penyebaran yang luar biasa dari penyakit gastrointestinal pada tahun 1982, penyebarannya ditemukan pada hamburger yang terkontaminasi (Wikipedia, 2007). Sejak tahun 1982, penyebaran dari infeksi *E.coli* serotype O157:H7 telah dikumpulkan dari bermacam-macam makanan yaitu sari buah apel, susu murni, kecambah tanaman alfalfa dan daging sapi giling serta produknya (Griffin and Tauxe, 1991). Penyebaran dapat juga berasal dari air minum atau air kolam renang yang terkontaminasi dengan *E. coli* serotype

O157:H7 telah dilaporkan di United State, Afrika Selatan, Finlandia dan Skotlandia. Pada tahun 2000, terjadi kontaminasi oleh *E. coli* serotype O157:H7 pada air yang disuplai oleh pemerintah Walkerton, Ontario, Canada dalam penyebarannya terjadi lebih dari 2000 kasus dengan 6 kematian (Zhao *et al.*, 2001). Menurut Petridis (2002), penyebaran terbesar bakteri *E.coli* serotype O157:H7 terjadi di Sakai (Jepang) dengan jumlah penderita 5727 orang, Skotlandia jumlah penderita 496 orang, Montana (USA) jumlah penderita 243 orang dan Pennsylvania (USA) jumlah penderita 51 orang.

*Escherichia coli* serotype O157:H7 adalah bakteri Gram negatif bentuk batang, Huruf "O" pada nama merujuk pada antigen somatik, sedangkan "H" merujuk pada antigen flagellar (Gambar 2). Bakteri ini menghasilkan Shiga-like toksin (SLT) yang menyebabkan penyakit yang berat dan merupakan anggota dari grup *Escherichia coli* patogenik yaitu *enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) (Wikipedia, 2007). Menurut Chinyu Su dan Brandt (1995), semua *E. coli* serotype O157:H7 memproduksi Shiga-like toksin (SLT) disebut "Shiga-like" karena strukturnya mempunyai kesamaan dengan Shiga toksin. Shiga-like toksin menghalangi sintesis protein pada sel-sel eukaryota sehingga menyebabkan kerusakan sel-sel endothelium pada ginjal, pankreas, otak dan organ lainnya, jadi toksin ini menghalangi kemampuan dari organ-organ tersebut untuk menjalankan fungsinya (Clark, 2007).



Gambar 2. *Escherichia coli* serotype O157:H7 (Todar, 2005)

Calderwood *et al.* (1987) melaporkan struktur dari Shiga toksin dan toksin yang didapatkan pada *E.coli* serotype O157:H7. Strain *E. coli* serotype O157:H7 memproduksi dua Shiga-like toksin yang berbeda yaitu Shiga-like toksin I (SLT I) dan Shiga-like toksin II (SLT II) (Johnson *et al.*, 1983; Noda *et al.*, 1987). Shiga-like toksin I mempunyai banyak kesamaan sifat-sifat biologis dengan Shiga toksin, dari sifat-sifat tersebut hampir tidak dapat dibedakan kecuali pada nukleotida dan level proteinnya (O'Brien *et al.*, 1983). Shiga-like toksin mempunyai struktur subunit yang sama dengan Shiga toksin yaitu terdiri dari satu subunit "A" yang aktif secara enzimatik dan lima subunit pengikat "B" (Jackson, *et al.*, 1987; O'Brien, *et al.*, 1983). Urutan nukleotida dan komposisi asam amino memperlihatkan bahwa Shiga-like toksin I dan Shiga toksin memberikan lebih dari 99% gen yang sesuai (homolog), dan

struktur mereka berbeda hanya pada satu asam amino pada subunit "A" (Calderwood, *et al.*, 1987; Jackson, *et al.*, 1987). Sebaliknya, Shiga-like toksin II secara genetik berhubungan juga dengan Shiga-like toksin I. Shiga-like toksin II memberikan sedikitnya 60% dari DNA-nya yang sesuai (homolog) dengan Shiga toksin atau Shiga-like toksin I (SLT II memperlihatkan 58% nukleotida yang homolog dan 56% asam amino yang homolog dengan SLT I) (Jackson, *et al.*, 1987).

Walaupun terdapat perbedaan dalam urutan molekuler, SLT I dan SLT II mempunyai reseptor sel dan aksi mekanisme intraseluler yang sama. Keduanya mengikat reseptor permukaan membran yang sama yaitu *receptor globotriaosyl ceramide*. *Globotriaosyl ceramide* diekspresikan secara cepat pada korteks ginjal manusia (Waddell, *et al.*, 1988). Pada pengikatan *receptor globotriaosyl ceramide*, SLT I dan SLT II menghambat sintesis protein melalui enzim pembelahan N-glycosidase di tempat yang spesifik pada residu adenin pada subunit 28s ribosomal (Furutani, *et al.*, 1990).

Bukti yang paling kuat untuk infeksi *E.coli* serotype O157:H7 adalah kehadiran bakteri ini dalam kultur tinja selain itu dapat juga melalui kehadiran dari Shiga-like toksin dalam tinja, atau kenaikan titer antibodi SLT dalam serum. Kultur tinja untuk organisme ini membutuhkan medium pertumbuhan yang khusus, karena *E.coli* serotype O157:H7 memfermentasi laktosa secara cepat ketika tumbuh pada medium yang mengandung laktosa (medium yang rutin dilakukan untuk kultur tinja) sehingga tidak dapat dikenali (tidak dapat

dibedakan) dari flora fekal normal lainnya. Namun, *E.coli* serotype O157:H7 dapat dibedakan dari kebanyakan strain *E.coli* lain melalui fermentasi sorbitol yang lambat atau tidak sama sekali memfermentasi sorbitol. Ketika ditempatkan pada cawan yang mengandung Mac Conkey Agar (medium indikator) dan Sorbitol Mac Conkey Agar (medium selektif), *E.coli* serotype O157:H7 menampakkan sorbitol negatif pada 24 jam setelah inkubasi. Koloni bakteri *E.coli* serotype O157:H7 pada medium Sorbitol Mac Conkey Agar akan menampakkan warna pucat atau tidak berwarna berbeda dengan *E.coli* non-serotype O157:H7 yang berwarna merah atau merah muda (Gambar 3) (Farmer and Davis, 1985; March and Ratnam, 1986).

Sorbitol Mac Conkey Agar (SMAC) dikembangkan dengan mengambil keuntungan dari karakteristik bakteri ini melalui penggantian laktosa pada medium Mac Conkey Agar dengan sorbitol. Medium SMAC Agar ini dipilih untuk isolasi *E.coli* serotype O157:H7 (CDC, 2003). Menurut March dan Ratnam (1986), deteksi *E.coli* serotype O157:H7 pada medium SMAC Agar mempunyai sensitivitas 100%, spesifisitas 85% dan akurasi 86%. Medium SMAC merupakan medium yang mudah, murah, cepat dan dapat dipercaya untuk mendeteksi *E.coli* serotype O157:H7. Koloni sorbitol negatif dapat dipilih dan selanjutnya dites melalui respon parameter biokimia, serotyping menggunakan antisera pada antigen H7 dan O157 atau mendeterminasi kehadiran Shiga-like toksin (Chinyu Su and Brandt, 1995).



D



E

Gambar 3. ( *FRQVHURMSH* + D GDQ ( *FRQQRQVHURMSH 2* + E  
 SDGD RLEVRODF &RQNH \$JDU [ZZZ WFKORLQKRP HFRP](#)

### **G. Polymerase Chain Reaction (PCR)**

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan teknik yang dapat memperbanyak jutaan urutan DNA spesifik hanya dalam waktu yang singkat. Teknik ini ditemukan oleh Kary B. Mullis pada tahun 1983. PCR adalah suatu reaksi untuk menggandakan jumlah molekul *Deoxyribonucleat Acid* (DNA) pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut dengan bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam satu *thermocycler* (Yuwono, 2006).

Materi awal untuk PCR adalah suatu larutan DNA dari untai ganda yang mengandung urutan nukleotida yang ditargetkan untuk disalin. Proses amplifikasi dapat dicapai dengan memanfaatkan dua primer oligonukleotida sintetik, enzim DNA polymerase termostabil dan *deoxynucleotide triphosphate* (dNTP) yang mencakup dATP, dCTP, dGTP dan dTTP yang bekerja pada untai DNA (Campbell, 1999).

PCR melibatkan tiga tahapan siklus temperatur yang berurutan yaitu denaturasi templat, annealing (penempelan) pasangan primer pada untai ganda DNA target dan pemanjangan (Yuwono, 2006).

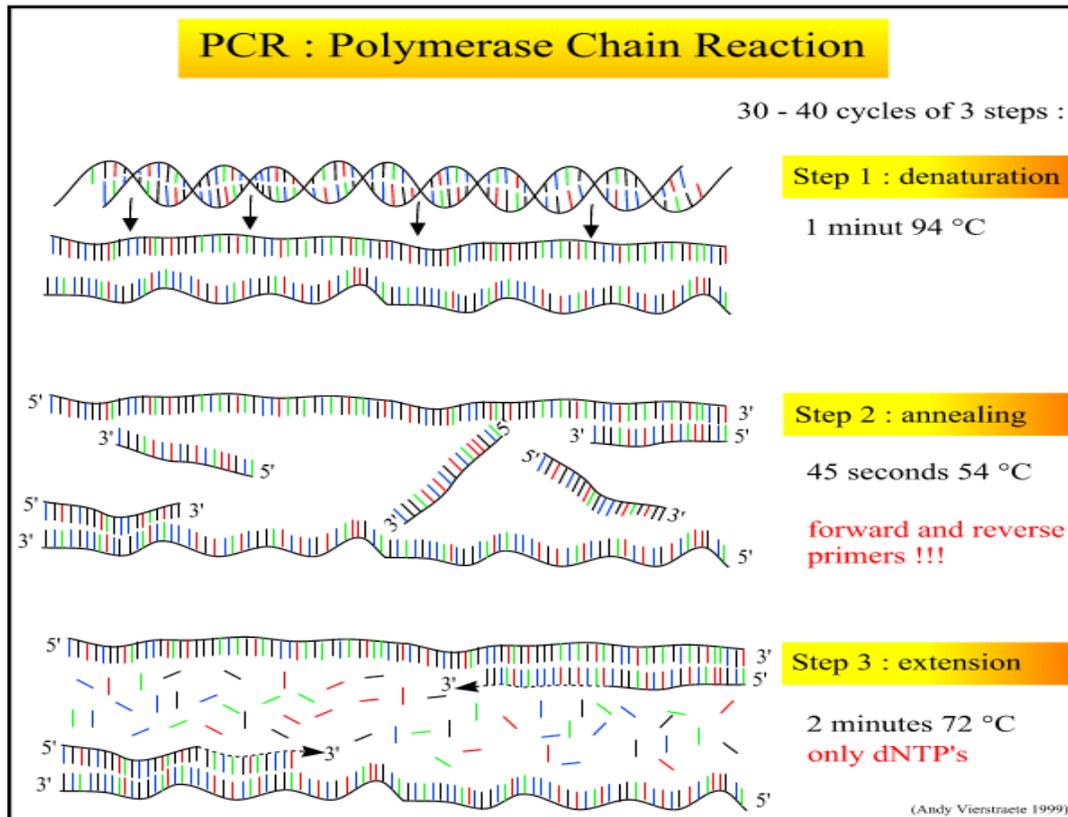
Prinsip kerja PCR adalah sebagai berikut:

- A. Tahap denaturasi, berlangsung pada suhu tinggi 94-96<sup>0</sup>C untuk memisahkan kedua untai DNA secara sempurna melalui pemutusan ikatan Hidrogen nukleotida sehingga terbentuk dua untai tunggal DNA.
- B. Tahap penempelan primer/annealing, suhu diturunkan 45-60<sup>0</sup>C (tergantung primer yang digunakan) sehingga primer menempel pada bagian DNA templat yang komplementer urutan basanya
- C. Tahap pemanjangan/ekstensi, apabila suhu dinaikkan kembali menjadi 70-75<sup>0</sup>C maka primer dengan bantuan enzim DNA polymerase akan membentuk untai DNA yang baru (Gambar 4).

Apabila 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

diulangi kembali dari awal, demikian seterusnya hingga siklus selesai (Diffenbach, 1995).

Keunggulan PCR dikatakan sangat tinggi, hal ini berdasarkan spesifitas, efisiensi dan keakuratannya. Spesifitas PCR terletak pada kemampuannya mengamplifikasi produk sesuai yang diinginkan. Efisiensi PCR adalah kemampuannya mengamplifikasi sehingga menghasilkan produk melalui sejumlah siklus. Keakuratan yang tinggi karena DNA polymerase mampu menghindari kesalahan pada amplifikasi produk (Mordechai, 1999). Melalui PCR identifikasi mikroorganisme pada sampel dapat dilakukan dengan cepat dan dapat dipercaya untuk mendiagnosa secara molekuler berbagai macam penyakit infeksi dimana metode kultur dan serologi sering terhambat dengan sedikitnya jumlah sampel (Bopp, *et al.*, 2003).



Gambar 4. Prinsip kerja *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Campbell,1999)

## H. KERANGKA KONSEPTUAL

### 1. Dasar Pemikiran Variabel yang Diteliti

Kualitas air minum yang ideal seharusnya memenuhi persyaratan fisik, kimia dan mikrobiologis. Oleh karena itu harus dilakukan pengawasan mutu kualitas air minum secara ketat pada air minum dalam kemasan dan isi ulang yang dikonsumsi oleh masyarakat. Target utama yang perlu diawasi untuk menjamin kualitas air minum adalah sumber air yang digunakan sebagai bahan baku dan proses pengolahan air minum tersebut. Sumber air yang

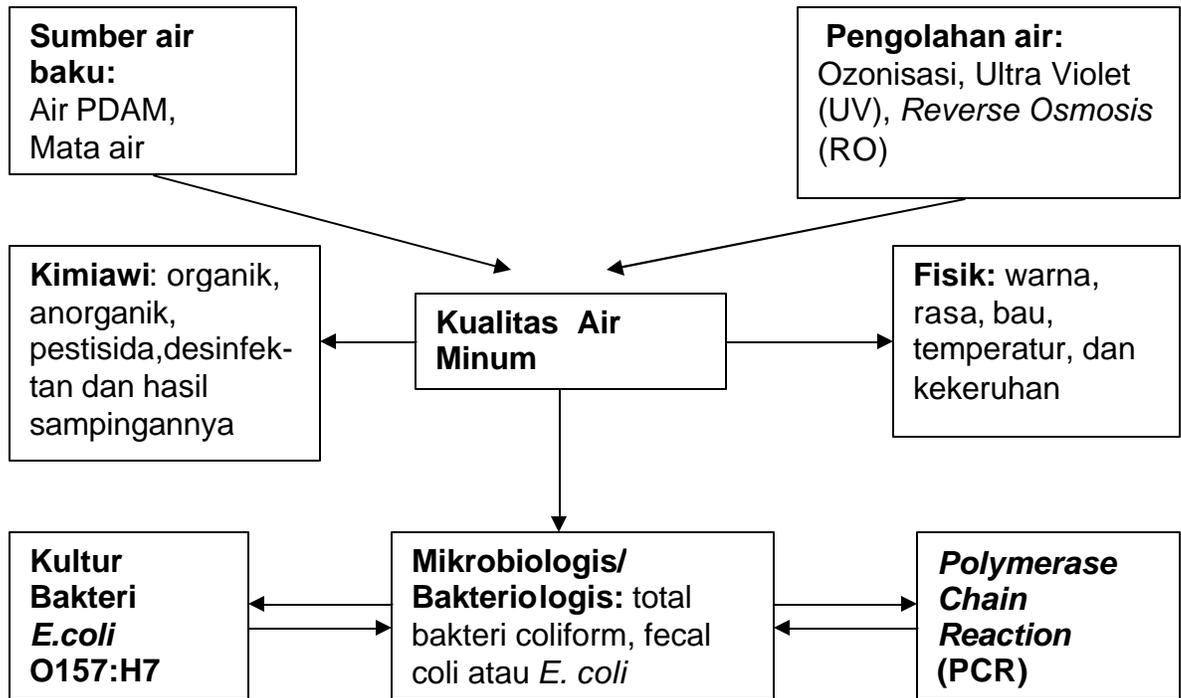
digunakan sebagai bahan baku pembuatan air minum dalam kemasan dan isi ulang harus bebas mikroba, tidak berbau dan tidak berwarna. Proses pengolahan juga harus steril dan dilakukan oleh tenaga-tenaga yang telah terlatih.

Salah satu indikator penting tingkat sanitasi air minum adalah keberadaan bakteri-bakteri coliform di dalam air, khususnya bakteri *Escherichia coli*. Untuk mengetahui kualitas air minum dalam kemasan dan isi ulang yang memenuhi persyaratan secara mikrobiologis maka dilakukan pemeriksaan pada sampel air. Pada penelitian ini dilakukan analisis keberadaan bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7 yang merupakan bakteri patogen dan dapat menyebabkan penyakit pada manusia.

Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Keuntungan dari teknik ini adalah mempunyai sensitivitas dan spesifitas yang tinggi serta dapat dilakukan secara cepat. Kelebihan lainnya adalah dapat dilakukan dengan menggunakan komponen-komponen yaitu DNA cetakan, oligonukleotida, dNTP, enzim dalam jumlah yang sangat sedikit.

Diharapkan hasil pemeriksaan ini dapat menjadi bahan masukan bagi instansi-instansi terkait dalam upaya pengawasan mutu kualitas air minum yang memenuhi standar kesehatan sesuai dengan Peraturan Menteri Kesehatan No. 907/Permenkes/SK/VII/2002.

## 2. Bagan Kerangka Konseptual



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian observasional dengan melakukan pemeriksaan terhadap sampel air minum dengan teknik PCR dan kultur. Pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yaitu suatu teknik untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target dengan bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer. Sedangkan teknik kultur yaitu dengan menumbuhkan bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7 pada medium Sorbitol Mac Conkey Agar. Sasaran penelitian ditujukan pada air minum dalam kemasan dan air minum isi ulang.

#### **B. Waktu dan Lokasi Penelitian**

Waktu penelitian selama dua bulan yaitu pada bulan Mei-Juni 2008. Lokasi penelitian di Laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

### **C. Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi pada penelitian ini adalah air minum dalam kemasan dan isi ulang yang ada di Makassar. Sampel penelitian adalah air minum yang dipilih secara purposif sampling. Karakteristik sampel untuk air minum dalam kemasan adalah dipilih yang diproduksi di Makassar dan sekitarnya, sedangkan untuk air minum isi ulang dipilih depot yang berada di lokasi pemukiman yang padat penduduk.

### **D. Definisi Operasional**

1. Air minum dalam kemasan (AMDK) adalah air minum yang siap di konsumsi secara langsung tanpa harus melalui proses pemanasan terlebih dahulu dan dikemas dalam berbagai bentuk wadah botol (1500mL/600mL) dan gelas (240mL/220mL).
2. Air minum isi ulang (AMIU) adalah air baku yang telah diproses dan dapat langsung diminum yang disediakan oleh depot air minum.
3. Air baku adalah air yang belum diproses yang memenuhi persyaratan mutu untuk diolah menjadi produk air minum.
4. Depot air minum adalah usaha industri yang melakukan proses pengolahan air baku menjadi air minum dan menjual langsung kepada konsumen
5. Persyaratan kualitas air minum adalah persyaratan yang ditetapkan oleh Menteri Kesehatan Nomor 907/Menkes/SK/VII/2002 .

6. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah teknik yang dilakukan untuk mengamplifikasi DNA bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7 pada gen target *rfbE*.
7. Kultur adalah teknik yang dilakukan untuk menumbuhkan dan mengidentifikasi bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7 dengan menggunakan medium selektif Sorbitol Mac Conkey Agar (SMAC).

### **E. Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol sampel, kotak es (*cool box*), autoklaf, inkubator, *safety cabinet*, *vortex shaker*, *gyrotary shaker*, tabung Eppendorf dan raknya, alat sentrifugasi, sarung tangan disposable, mikropipet, *thermocycler* (Hybaid, Ashford, UK), pH meter, cawan Petri, tabung reaksi, lampu spiritus, sengkeli/ose, erlenmeyer, gelas kimia, batang pengaduk, neraca analitik, *freezer* -20°C, lemari pendingin 4°C, mesin elektroforesis, perangkat UV light, kamera digital.

Bahan-bahan untuk pengambilan sampel yaitu alkohol 70%, kapas. Sedangkan bahan untuk kultur bakteri adalah medium Sorbitol Mac Conkey Agar (SMAC) yang mengandung Mac Conkey Agar base 40,0 gr dan D-Sorbitol 10 gr (*Difco*), air destilasi. Medium cair Brain Heart Infusion Broth (BHIB) dan medium Mac Conkey Agar (MAC). Bahan-bahan yang digunakan untuk ekstraksi DNA yaitu suspensi Diatom, larutan L6 (*Lysis buffer*), larutan

L2 (*Washing buffer*), etanol 70%, aseton, larutan TE (Tris-EDTA) elution buffer.

Untuk PCR, bahan-bahan yang digunakan yaitu ekstrak DNA, PCR mix (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0,1% gelatin), deoksinukleotida trifosfat (dNTP) yaitu dATP, dGTP, dTTP, dCTP, *Taq* DNA polymerase, 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).

Bahan-bahan untuk elektroforesis yaitu 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) (Morin, *et al.* 2004).

## F. Instrumen Pengumpulan Data

### 1. Teknik Pengambilan Sampel

**Untuk air minum isi ulang.** Desinfeksi tangan dengan alkohol 70% dan bersihkan terlebih dahulu kran, pengambilan dilakukan pada kran yang sering digunakan. Kran dibuka penuh dan biarkan air mengalir selama 2-3 detik, atau dalam waktu yang dianggap cukup, kemudian ditutup. Kran dibuka kemudian botol diisi air, pengiriman sampel dari lapangan sampai ke

laboratorium paling lama 24 jam pada suhu 4°C atau dalam *cool box* (Alaerts dan Santika, 1997).

**Untuk air minum kemasan.** Dikumpulkan sampel air minum kemasan dari berbagai merek yang diproduksi di Makassar dan sekitarnya. Sampel air minum kemasan tersebut selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan.

## **2. Pemeriksaan di Laboratorium**

Sampel air minum disentrifus dingin pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit selanjutnya supernatan dibuang dan sedimen dikumpulkan untuk kultur dan ekstraksi DNA. Sebanyak 100 µL sedimen dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf dan ditambahkan 900 µL larutan L6 (*lysis buffer*) kemudian diinkubasi selama 24 jam setelah itu dilakukan ekstraksi DNA. Selanjutnya untuk kultur, sebanyak 100 µL sedimen dimasukkan ke dalam medium cair Brain Heart Infusion Broth (BHIB) kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C untuk melihat pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan keruhnya medium.

Sampel air minum diukur pH-nya menggunakan pH meter dan diamati secara fisik yaitu warna, bau, rasa dan kekeruhan.

## **3. Kultur bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7 (March and Ratnam, 1986; Centers for Disease Control and Prevention, 2003)**

Jika terjadi kekeruhan pada medium cair BHIB maka diambil satu ose dan digoreskan pada medium Sorbitol Mac Conkey Agar untuk identifikasi

*E.coli* serotype O157:H7 dan medium Mac Conkey Agar sebagai medium indikator kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 35-37°C. Selanjutnya koloni yang tumbuh pada medium SMAC Agar di lakukan uji biokimia.

Sebagai pembanding (kontrol positif) digunakan isolat *Escherichia coli* dari RS. Dr. Wahidin Sudirohusodo, Makassar yang ditemukan pada penderita Infeksi Saluran Kencing (ISK). Isolat *E.coli* ini dikultur pada medium Sorbitol Mac Conkey Agar untuk melihat warna koloni yang terbentuk, perbedaan warna koloni menunjukkan strain *E.coli* tertentu.

#### **4. Ekstraksi DNA dengan Metode Boom (Hatta and Smits, 2007)**

Sampel sebanyak 100 µL yang telah ditambahkan 900 µL larutan L6 (*lysis buffer*) kemudian diinkubasi selama 24 jam untuk mendapatkan DNA, selanjutnya sampel diletakkan pada *gyrotary shaker* selama 1 jam kemudian ditambahkan 20 µL suspensi diatom (vortex dahulu suspensi tersebut setiap kali akan digunakan). Vortex campuran ini dan letakkan pada *gyrotary shaker* 100 rpm selama 10 menit. Vortex kembali campuran ini lalu sentrifus pada 12.000 rpm selama 15 detik buang supernatannya. Untuk mencegah terhisapnya diatom, sisakan 10 µL cairan supernatan pada tabung. Kemudian dicuci sebanyak dua kali dengan menambahkan 1 mL larutan L2 (*Washing buffer*), vortex, dan sentrifus selama 15 detik lalu buang supernatannya. Setelah itu, cuci dua kali dengan 1 mL etanol 70% dan satu kali dengan aseton. Buang supernatan aseton, biarkan tabung terbuka dan inkubasi pada

suhu 56°C dalam inkubator selama 10 menit. Tambahkan 60 µL TE-elution buffer, vortex dengan baik lalu inkubasi lagi tabung tersebut pada suhu 56°C selama 10 menit. Setelah itu, sentrifus selama 30 detik pada 12.000 rpm. Pindahkan 50 µL supernatan ke dalam vial yang baru (jangan menyentuh sedimennya) kemudian disimpan pada suhu -20°C hingga siap untuk diproses dengan teknik PCR.

Untuk kontrol positif, isolat *E.coli* yang telah dikultur pada medium SMAC Agar dan menampakkan koloni berwarna pucat atau tidak berwarna maka koloni tersebut diambil dan dilakukan ekstraksi DNA dengan prosedur yang sama dengan ekstraksi sampel.

#### **5. Amplifikasi DNA dengan PCR (Morin, *et al.* 2004)**

Sebagai langkah awal dibuat campuran reaksi untuk PCR. Setiap tabung PCR mengandung 16,9 µL air steril, 2 µL 10 mM *deoxynucleotide triphosphate mixture* (dNTP mix), 1 µL 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µL 10X amplifikasi buffer, 0,5 µL 10 µM *forward primer* dan 0,5 µL 10 µM *reverse primer*, 0,1 µL (0,25 U/µL) *Taq* DNA polymerase dan air steril ditambahkan sampai volume akhir 22,5 µL.

Selanjutnya disiapkan vial yang telah diisi masing-masing 2,5 µL sampel DNA. Masing-masing tabung diisi campuran reaksi PCR sebanyak 22,5 µL. Setelah itu, dilakukan amplifikasi dengan menggunakan mesin PCR (*Thermocycler*) (Hybaid, Ashford, UK) sebanyak 40 siklus setiap siklus terdiri dari 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 satu malam.

#### **6. Deteksi Produk PCR (Morin, et al. 2004)**

Masing-masing 5 µl produk amplifikasi dicampur dengan 2 µl larutan loading. 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.

#### **G. Analisis Data**

Hasil deteksi PCR dengan elektroforesis dianalisis berdasarkan ada tidaknya potongan pada pita DNA yang terbentuk dan data disajikan secara deskriptif dengan menggunakan tabel dan gambar.

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Hasil Penelitian**

Hasil penelitian yang telah dilaksanakan pada bulan Mei – Juni 2008 dengan tujuan (1) menganalisis keberadaan bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7 dengan menggunakan teknik kultur dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada air minum dalam kemasan dan isi ulang, (2) mengamati parameter fisik yaitu warna, bau, rasa dan kekeruhan serta mengukur pH air minum disajikan dalam bentuk tabel deskriptif dan gambar.

##### **1. Air Minum Dalam Kemasan (AMDK)**

Pada air minum dalam kemasan, sebanyak 8 merek AMDK yang diteliti dengan jumlah sampel yang dianalisis sebanyak 24 sampel. Karakteristik dari sampel yaitu dipilih air minum dalam kemasan yang diproduksi di Makassar dan sekitarnya, selanjutnya diperiksa dengan teknik kultur dan PCR untuk melihat keberadaan bakteri *E.coli* serotype O157:H7 sebagai parameter kualitas air minum. Hasil dari teknik kultur dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Kultur bakteri *E.coli* serotype O157:H7 pada sampel AMDK**

No. Merek	Kode Sampel	Kultur <i>E.coli</i> serotype O157:H7	Kultur <i>E.coli</i> non-serotype O157:H7	Keterangan
1	1A	(-)	(-)	
	1B	(-)	(+)	Koloni NSF
	1C	(-)	(-)	
2	2A	(-)	(-)	
	2B	(-)	(-)	
	2C	(-)	(+)	Koloni NSF
3	3A	(-)	(+)	Koloni NSF
	3B	(-)	(+)	Koloni NSF
	3C	(-)	(+)	Koloni NSF
4	4A	(-)	(-)	
	4B	(-)	(+)	Koloni NSF
	4C	(-)	(-)	
5	5A	(-)	(-)	
	5B	(-)	(-)	
	5C	(-)	(-)	
6	6A	(-)	(-)	
	6B	(-)	(-)	
	6C	(-)	(+)	Koloni NSF
7	7A	(-)	(-)	
	7B	(-)	(-)	
	7C	(-)	(+)	Koloni NSF
8	8A	(-)	(-)	
	8B	(-)	(+)	Koloni NSF
	8C	(-)	(-)	

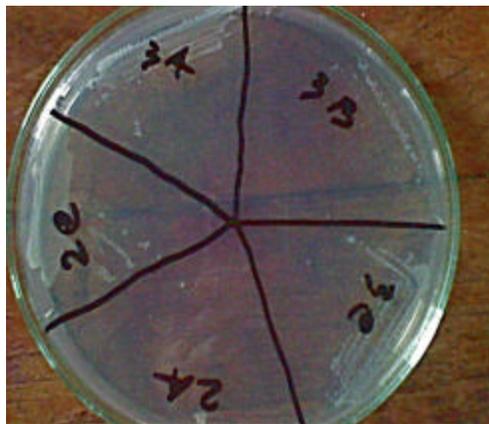
Keterangan:

(-) = tidak ada pertumbuhan koloni

(+) = ada pertumbuhan koloni (koloni NSF = Koloni *Non-Sorbitol Fermenting*)

Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat dari 24 sampel yang dianalisis, pada kultur *E.coli* serotype O157:H7 menunjukkan hasil negatif hal ini berarti tidak

ada pertumbuhan koloni bakteri *E.coli* serotype O157:H7 pada medium selektif Sorbitol Mac Conkey Agar. Namun, terdapat sebanyak 9 sampel (41,67%) pada kultur *E.coli* non-serotype O157:H7 menunjukkan hasil positif, hal ini berarti ada pertumbuhan koloni bakteri pada medium selektif Sorbitol Mac Conkey Agar yang dideskripsikan sebagai koloni *Non-Sorbitol Fermenting*, setelah dilakukan uji biokimia didapatkan koloni tersebut bukan bakteri *E.coli* serotype O157:H7. Pada Gambar 5 dapat dilihat sampel AMDK yang menampakkan koloni *Non-Sorbitol Fermenting*, terlihat pertumbuhan koloni pada sampel 2C, 3A, 3B dan 3C berwarna pucat (tidak berwarna) sedangkan pada sampel 2A tidak menampakkan pertumbuhan koloni (negatif).



Gambar 5. Koloni *Non-Sorbitol Fermenting* pada sampel AMDK

Kontrol positif diambil dari isolat bakteri *E.coli* yang diisolasi dari penderita infeksi saluran kencing (ISK) di Rumah Sakit Umum Dr. Wahidin Sudirohusodo – Makassar. Isolat bakteri tersebut ditumbuhkan pada medium

Sorbitol Mac Conkey Agar untuk melihat perbedaan warna koloni yang terbentuk yang menandakan perbedaan strain *E.coli*. Gambar 6 menampilkan pertumbuhan koloni bakteri *E.coli* pada medium SMAC Agar dengan warna yang berbeda yaitu warna merah kontras merupakan bakteri *E.coli* yang umumnya non-patogen dan warna pucat merupakan *E.coli* serotype O157:H7.



Gambar 6. Perbedaan warna koloni *E.coli* pada medium SMAC Agar  
Merah = *E.coli* non-patogen; pucat = *E.coli* serotype O157:H7

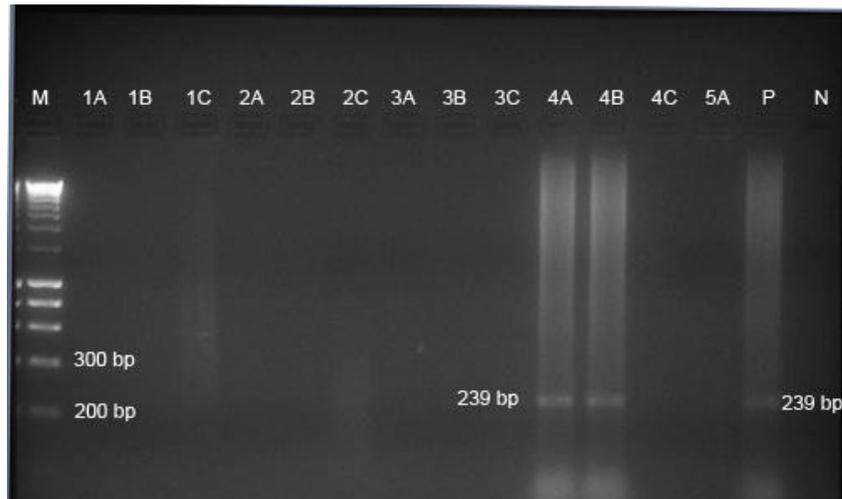
Hasil pemeriksaan sampel AMDK dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2. Hasil PCR *E.coli* serotype O157:H7 pada sampel AMDK**

No. Merek	Kode Sampel	PCR		Keterangan
		(+)	(-)	
1	1A		(-)	
	1B		(-)	
	1C		(-)	
2	2A		(-)	
	2B		(-)	
	2C		(-)	
3	3A		(-)	
	3B		(-)	
	3C		(-)	
4	4A	(+)		Terdeteksi
	4B	(+)		Terdeteksi
	4C		(-)	
5	5A		(-)	
	5B		(-)	
	5C		(-)	
6	6A		(-)	
	6B		(-)	
	6C		(-)	
7	7A		(-)	
	7B		(-)	
	7C		(-)	
8	8A		(-)	
	8B		(-)	
	8C		(-)	

Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat dari 24 sampel yang dianalisis terdapat 2 sampel (8,33%) menunjukkan hasil PCR positif hal ini berarti bakteri *E.coli* serotype O157:H7 terdeteksi pada sampel AMDK. Lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 7, dimana hasil yang diperoleh berupa pita DNA (band DNA) pada posisi 239 bp pada sampel 4A dan 4B dan dibandingkan dengan pita DNA kontrol positif (P) dari isolat bakteri *E.coli* serotype O157:H7 yang diisolasi dari penderita infeksi saluran kencing (ISK).

Pada Gambar 8, sampel 5B sampai 8C AMDK tidak diperoleh pita DNA (band DNA) bakteri *E.coli* serotype O157:H7.



Gambar 7. Hasil PCR *E.coli* serotype O157:H7 pada sampel 1A-5A AMDK  
M = marker; P = kontrol positif; N = kontrol negatif



Gambar 8. Hasil PCR *E.coli* serotype O157:H7 pada sampel 5B-8C AMDK  
(9A dan 9B adalah sampel AMIU yang digabungkan pada saat elektroforesis)

Parameter fisik yang diamati pada sampel AMDK adalah warna, bau, rasa dan kekeruhan serta dilakukan pengukuran pH sampel, disajikan pada Tabel 3.

**Tabel 3. Warna, bau, rasa, kekeruhan dan pH dari sampel AMDK**

No	Sampel	Warna	Bau	Rasa	Kekeruhan	pH
1	1A	-	-	-	-	6,56
	1B	-	-	-	-	6,50
	1C	-	-	-	-	6,66
2	2A	-	-	-	-	9,24
	2B	-	-	-	-	9,10
	2C	-	-	-	-	9,16
3	3A	-	-	-	-	8,86
	3B	-	-	-	-	8,78
	3C	-	-	-	-	8,76
4	4A	-	-	-	-	6,02
	4B	-	-	-	-	6,19
	4C	-	-	-	-	7,16
5	5A	-	-	-	-	7,13
	5B	-	-	-	-	7,10
	5C	-	-	-	-	6,95
6	6A	-	-	-	-	8,49
	6B	-	-	-	-	6,62
	6C	-	-	-	-	6,73
7	7A	-	-	-	-	6,40
	7B	-	-	-	-	8,41
	7C	-	-	-	-	6,37
8	8A	-	-	-	-	7,89
	8B	-	-	-	-	6,10
	8C	-	-	-	-	7,88

Keterangan:

Warna: (-) = tidak berwarna; (+) = berwarna

Bau: (-) = tidak berbau; (+) = berbau

Rasa: (-) = tidak berasa; (+) = berasa

Kekeruhan: (-) = tidak keruh/jernih; (+) = keruh

Berdasarkan Tabel 3 dapat dilihat dari 24 sampel AMDK yang dianalisis didapatkan semua parameter fisiknya memenuhi standar kesehatan yang telah ditentukan, sedangkan untuk pH sampel bervariasi antara 6,02 – 9,24.

## 2. Air Minum Isi Ulang (AMIU)

Pada air minum isi ulang, sebanyak 4 depot AMIU yang diteliti dengan jumlah sampel yang dianalisis sebanyak 12 sampel. Karakteristik dari sampel yaitu dipilih depot AMIU yang berada di lokasi pemukiman yang padat penduduk, selanjutnya diperiksa dengan teknik kultur dan PCR untuk melihat keberadaan bakteri *E.coli* serotype O157:H7 sebagai indikator pencemaran pada air minum. Hasil dari teknik kultur dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4. Kultur bakteri *E.coli* serotype O157:H7 pada sampel AMIU**

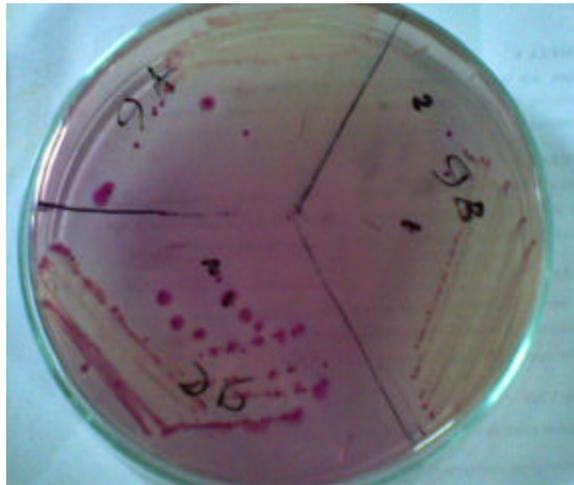
No. Depot	Kode Sampel	Kultur <i>E.coli</i> serotype O157:H7	Kultur <i>E.coli</i> non-serotype O157:H7
1	9A	(-)	(+)
	9B	(-)	(+)
	9C	(-)	(+)
2	10A	(-)	(+)
	10B	(-)	(+)
	10C	(-)	(+)
3	11A	(-)	(+)
	11B	(-)	(+)
	11C	(-)	(+)
4	12A	(-)	(+)
	12B	(-)	(+)
	12C	(-)	(+)

Keterangan:

(-) = tidak ada pertumbuhan koloni

(+) = ada pertumbuhan koloni (koloni NSF = Koloni *Non-Sorbitol Fermenting*)

Berdasarkan Tabel 4 dapat dilihat dari 12 sampel yang dianalisis, pada kultur *E.coli* serotype O157:H7 menunjukkan hasil negatif hal ini berarti tidak ada pertumbuhan koloni bakteri *E.coli* serotype O157:H7 pada medium selektif Sorbitol Mac Conkey Agar. Namun, pada kultur *E.coli* non-serotype O157:H7 menunjukkan hasil positif hal ini berarti ada pertumbuhan koloni bakteri pada medium selektif Sorbitol Mac Conkey Agar yang dideskripsikan sebagai koloni *Non-Sorbitol Fermenting*, setelah dilakukan uji biokimia didapatkan koloni tersebut bukan bakteri *E.coli* serotype O157:H7. Pada Gambar 9 dapat dilihat sampel AMIU yang menampakkan koloni *Non-Sorbitol Fermenting* berwarna pucat (tidak berwarna) serta koloni berwarna merah kontras dan merah muda keunguan.



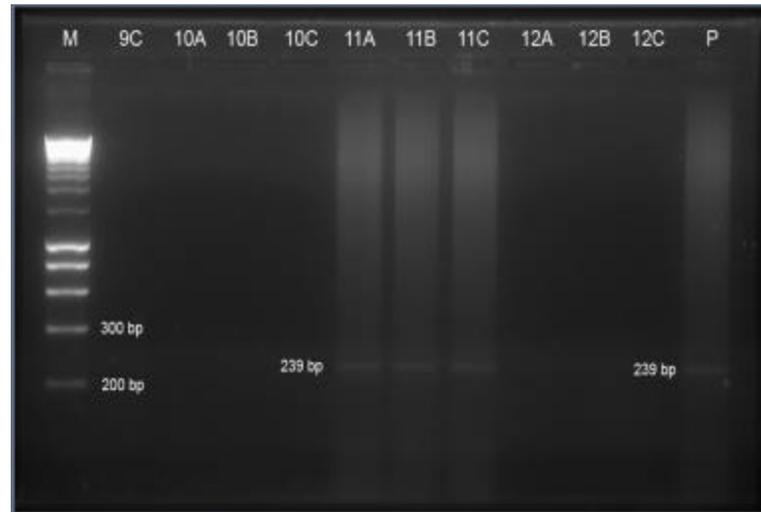
Gambar 9. Pertumbuhan koloni bakteri pada sampel AMIU

Hasil pemeriksaan sampel AMIU dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 5. Hasil PCR *E.coli* serotype O157:H7 pada sampel AMIU**

No. Depot	Kode Sampel	PCR		Keterangan
		(+)	(-)	
1	9A		(-)	
	9B		(-)	
	9C		(-)	
2	10A		(-)	
	10B		(-)	
	10C		(-)	
3	11A	(+)		Terdeteksi
	11B	(+)		Terdeteksi
	11C	(+)		Terdeteksi
4	12A		(-)	
	12B		(-)	
	12C		(-)	

Berdasarkan Tabel 5 dapat dilihat dari 12 sampel yang dianalisis terdapat 3 sampel (25%) menunjukkan hasil PCR positif hal ini berarti bakteri *E.coli* serotype O157:H7 terdeteksi pada sampel AMIU. Lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 10 dimana hasil yang diperoleh berupa pita DNA (band DNA) pada posisi 239 bp pada sampel 11A, 11B dan 11C dan dibandingkan dengan pita DNA kontrol positif (P) dari isolat bakteri *E.coli* serotype O157:H7 yang diisolasi dari penderita infeksi saluran kencing (ISK).



Gambar 10. Hasil PCR *E.coli* serotype O157:H7 pada sampel 9C-12C AMIU  
M = marker; P = kontrol positif

Parameter fisik yang diamati pada sampel AMIU adalah warna, bau, rasa dan kekeruhan serta dilakukan pengukuran pH sampel, disajikan pada Tabel 6.

**Tabel 6. Warna, bau, rasa, kekeruhan dan pH dari sampel AMIU**

No	Sampel	Warna	Bau	Rasa	Kekeruhan	pH
1	9A	-	-	-	-	7,09
	9B	-	-	-	-	7,20
	9C	-	-	-	-	7,13
2	10A	-	-	-	-	7,17
	10B	-	-	-	-	7,25
	10C	-	-	-	-	7,30
3	11A	-	-	-	-	6,63
	11B	-	-	-	-	6,71
	11C	-	-	-	-	6,85
4	12A	-	-	-	-	6,83
	12B	-	-	-	-	6,87
	12C	-	-	-	-	6,86

Keterangan:

Warna: (-) = tidak berwarna; (+) = berwarna  
 Bau: (-) = tidak berbau; (+) = berbau  
 Rasa: (-) = tidak berasa; (+) = berasa  
 Kekeruhan: (-) = tidak keruh/jernih; (+) = keruh

Tabel 6 menunjukkan dari 12 sampel AMIU yang dianalisis didapatkan semua parameter fisiknya memenuhi standar kesehatan yang telah ditentukan, sedangkan untuk pH sampel bervariasi antara 6,63 – 7,30.

## B. PEMBAHASAN

Penyebaran bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7 menjadi perhatian publik kesehatan yang penting karena bakteri ini sangat virulen dan menyebabkan penyakit gastrointestinal yang berbahaya, oleh karena itu dibutuhkan teknik deteksi untuk memonitor makanan dan penyediaan air (Morin, *et al.* 2004). Pada penelitian ini dilakukan teknik kultur dan PCR dimana menurut Yaron dan Matthews (2002) dalam teknik kultur umumnya

membutuhkan waktu yang lama dan kurang sensitif tetapi secara visual dapat dilihat pertumbuhan dan morfologi dari bakteri tersebut sedangkan teknik PCR lebih sensitif, spesifik dan dapat dikerjakan dalam waktu singkat.

Pada teknik kultur, tidak menampakkan pertumbuhan koloni bakteri *E.coli* serotype O157:H7, sedangkan pada teknik PCR terdeteksi bakteri *E.coli* serotype O157:H7. Hal ini kemungkinan disebabkan jumlah koloni bakteri *E.coli* serotype O157:H7 yang tumbuh pada medium sangat rendah sehingga yang mendominasi adalah pertumbuhan koloni *Non-Sorbitol Fermenting* (NSF). Menurut Morin, *et al.* (2004), bakteri patogen sering hadir dalam jumlah yang sangat rendah dan untuk bakteri *E.coli* serotype O157:H7 kurang dari 10 sel sudah dapat menyebabkan infeksi (Kerr, *et al.* 2000). Namun menurut Petridis, *et al.* (2002), salah satu karakteristik yang unik dari *E.coli* serotype O157:H7 yang membedakannya dengan strain *E.coli* lainnya adalah memiliki dosis infeksi yang sangat kecil yaitu 10 – 100 sel cukup untuk menyebabkan penyakit.

Hasil PCR diperoleh pita DNA (band DNA) pada posisi 239 bp sesuai dengan kontrol positif yang digunakan. 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 lipopolisakarid (LPS) yang merupakan konstituen yang esensial dari membran luar bakteri. Lipopolisakarid (LPS) sering terlibat dalam proses patologi bakteri Gram negatif dan memegang peranan penting dalam infeksi dari bakteri-bakteri

patogen (Morin, *et al.* 2004; Yaron and Matthews, 2002). Gen *rfbE* dari *E.coli* serotype O157:H7 menyandi LPS O157 dan merupakan gen yang unik untuk serogroup *E.coli* O157, gen ini telah diidentifikasi sebagai penanda (*marker*) yang baik karena diturunkan pada semua fase pertumbuhan (*growth phases*) dari fase eksponensial awal sampai fase stasioner akhir. Gen *rfbE* merupakan gen target yang baik untuk mendeteksi kehadiran dari bakteri *E.coli* serotype O157:H7 dalam sampel (Yaron and Matthews, 2002). Primer yang digunakan pada penelitian ini merujuk pada primer yang digunakan oleh Morin, *et al.* (2004) dimana spesifisitasnya 100%, kedua primer secara spesifik mengamplifikasi DNA gen target. Sensitifitas dari teknik PCR untuk mendeteksi *E.coli* serotype O157:H7 adalah kurang lebih 30 sel.

Untuk mendapatkan air sehat perlu dilakukan serangkaian proses pengolahan (*water treatment*). Pada dasarnya air minum dalam kemasan (AMDK) dan air minum isi ulang (AMIU) diproses melalui 3 tahap yaitu: penyaringan, desinfeksi, dan pengisian. Penyaringan dimaksudkan untuk menghilangkan kotoran dan bau yang terkandung dalam air. Desinfeksi bertujuan untuk menghilangkan sebagian besar mikroba dan membunuh bakteri patogen dalam air, dengan menggunakan proses ozonisasi, ultra violet (UV) dan *reverse osmosis* sistem (pemurnian air). Pengisian merupakan tahap akhir berupa pengemasan air yang telah diproses. Khusus untuk AMDK, harus memenuhi standar nasional (SNI) tentang standar baku mutu air dalam kemasan, serta MD yang dikeluarkan oleh BPOM RI yang

merupakan standar baku kimia, fisik dan mikrobiologis agar AMDK layak dikonsumsi dan aman bagi kesehatan manusia. Sedangkan pada AMIU, tetap harus memenuhi standar kesehatan yang telah ditentukan oleh Departemen Kesehatan melalui Permenkes RI No. 907/Menkes/SK/VI/2002 (Lampiran 1) dan berada di bawah pengawasan Dinas Kesehatan setempat. Namun, pada penelitian ini didapatkan sampel AMDK dan AMIU yang tidak memenuhi persyaratan yang telah ditentukan. Berdasarkan hasil PCR didapatkan terkontaminasi bakteri *E.coli* serotype O157:H7. Hal ini kemungkinan disebabkan proses pengolahan yang tidak memenuhi syarat serta sumber air baku yang digunakan telah tercemar.

Menurut Zeofilt (2008), umumnya sumber air yang digunakan untuk air minum dalam kemasan (AMDK) berasal dari mata air pegunungan atau dapat juga dari sumber mata air tanah, pada penelitian ini tidak ditelusuri lebih jauh sumber air yang digunakan pada sampling AMDK yang diamati karena beberapa kendala yang dihadapi. Namun kemungkinan kontaminasi dapat terjadi akibat eksploitasi yang berlebihan pada sumber mata air yang digunakan, hal ini didukung oleh Kerr *et al.* (2000) dan Lacroix, *et al.* (2008) yang mengemukakan bahwa kontaminasi patogen terjadi sebagai hasil dari eksploitasi yang berlebihan pada sumber air mineral alami, seperti kejadian penyebaran penyakit kolera di Portugal pada tahun 1974 dimana air minum kemasan diidentifikasi sebagai salah satu media transmisi dari *Vibrio cholera*, sumber air kemasan diduga terkontaminasi.

Kemungkinan kontaminasi juga dari proses pengolahan yang tidak memenuhi standar yang telah ditentukan, untuk AMDK ada beberapa proses yang harus dilalui yaitu: proses *water treatment system*, proses *water sterilization*, proses *quality control system* dan proses pengemasan (gallon, botol dan gelas). Pada proses pengolahan air (*water treatment*) yang harus diperhatikan adalah kapasitas filter-filter pendukung, media yang digunakan, bahan tabung filter yang digunakan serta perawatan dari alat-alat yang digunakan. Menurut Warburton, *et al.* (1998), observasi melalui *scanning elektron microscopy* diindikasikan bahwa sel bakteri *E.coli* serotype O157:H7 menempel dan memperbanyak diri pada dinding kontainer (tabung) dan bertahan selama lebih dari 300 hari. Jika kebersihan dari tabung-tabung (kontainer) filter tidak diperhatikan maka dapat terjadi pembentukan biofilm. Plauche (2006) mengemukakan bahwa sel biofilm lebih tahan terhadap bahan-bahan antimikroba, maupun kondisi fisik yang ekstrim seperti panas, sehingga kontaminasi yang disebabkan oleh sel ini dapat menyebarkan penyakit melalui makanan (*foodborne disease*) dan air (*waterborne disease*).

Lokasi depot air minum isi ulang (AMIU) yang diambil sebagai sampling penelitian berada di tengah pemukiman, deskripsi dari lokasi depot yaitu berada tepat dipinggir jalan, lingkungan sekitar cukup bersih, ruangan tempat pengisian air juga bersih, khusus untuk depot nomor 1 dan 3 letaknya tidak jauh dari kanal. Sumber air yang digunakan oleh depot tersebut berasal dari air PDAM yang ditampung dalam tandon (bak

penampungan) dan proses pengolahan menggunakan sistem ultra violet (UV) dan ozonisasi. Kemungkinan kontaminasi dapat terjadi pada sumber air yang digunakan yaitu air PDAM karena walaupun air PDAM tersebut telah diberikan perlakuan seperti klorinasi, namun kemungkinan bakteri *E.coli* serotype O157:H7 masih dapat bertahan hidup, kriteria klorin bebas untuk desinfeksi air minum adalah 0,2 ppm. Zhao, *et al.* (2001) mengemukakan bahwa klorin dapat membunuh *E.coli* dengan merusak proses transportasi dan respirasi dari membran sel, mekanisme ini berlaku juga untuk bakteri *E.coli* serotype O157:H7, namun dari hasil penelitiannya didapatkan *E.coli* serotype O157:H7 strain G masih dapat bertahan pada konsentrasi 2,0 ppm klorin bebas. Kontaminasi juga dapat terjadi pada gallon jika tidak dibersihkan dengan baik maka kemungkinan bakteri masih menempel pada dinding gallon, pada sampling depot AMIU yang diamati terdapat perbedaan proses pencucian dimana pada lokasi pertama pencucian dilakukan dengan menyemprotkan air kemudian dikeringkan pada ruang sterilisasi yang mengandung sinar UV setelah itu dipindahkan ke ruang pengisian air. Pada lokasi kedua, gallon dibersihkan dengan cairan sabun dan sikat khusus gallon kemudian disemprot dengan air setelah itu dipindahkan ke ruang pengisian air. Pada lokasi ketiga dan keempat, proses pencuciannya sama yaitu gallon hanya disemprotkan dengan air setelah itu dipindahkan ke ruang pengisian air. Hal ini mengindikasikan bahwa ada perbedaan dalam teknologi

produksi serta proses operasi dan pemeliharaan yang diterapkan pada masing-masing depot isi ulang.

Parameter fisik seperti warna, bau, rasa dan kekeruhan yang diamati pada sampel AMDK dan AMIU memenuhi syarat kesehatan yang telah ditentukan. Pengukuran pH pada sampel AMDK tidak memenuhi persyaratan yaitu terendah 6,02 dan tertinggi 9,24, standar pH air minum sesuai Permenkes adalah kisaran 6,5 – 8,5. Pada AMIU, pengukuran pH memenuhi syarat kesehatan yang telah ditentukan yaitu antara 6,63 - 7,25. Pada sampel AMDK (4A dan 4B) didapatkan pH rendah yaitu 6,02 dan 6,19 tidak memenuhi persyaratan yang telah ditentukan dan pada sampel ini terdeteksi bakteri *E.coli* serotype O157:H7, pH rendah pada sampel kemungkinan akibat aktifitas mikroorganisme (proses respirasi sel) dimana bakteri menghasilkan gas  $\text{CO}_2$  dan  $\text{H}_2\text{O}$  yang merupakan senyawa asam karbonat yang mudah terurai menjadi ion-ion  $\text{H}^+$  dan  $\text{HCO}_3^-$ , ion  $\text{H}^+$  ini dapat menentukan pH suatu media (Waluyo, 2004). Menurut Yaron and Matthews (2002), bakteri *E.coli* serotype O157:H7 dapat hidup pada pH rendah.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian tentang Analisis kualitatif *Escherichia coli* serotype O157:H7 pada air minum dalam kemasan dan isi ulang dengan teknik PCR di Makassar, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Pada teknik kultur tidak menampakkan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7 pada sampel air minum dalam kemasan dan air minum isi ulang.
2. Pada teknik PCR sebanyak 8,33% sampel air minum dalam kemasan dan 25% sampel air minum isi ulang terdeteksi bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7.
3. Pemeriksaan parameter fisik: warna, bau, rasa dan kekeruhan pada air minum dalam kemasan dan air minum isi ulang memenuhi standar kesehatan yang telah ditentukan.
4. Pengukuran pH pada air minum dalam kemasan terendah 6,02 dan tertinggi 9,24 tidak memenuhi standar kesehatan yang telah ditentukan, sedangkan untuk air minum isi ulang memenuhi standar kesehatan yang telah ditentukan.

## **B. Saran**

1. Perlu adanya penelitian lanjutan dengan mengambil sampel penelitian dalam jumlah banyak, lebih ditelusuri lagi sumber air yang digunakan sebagai bahan baku dan diamati lebih jauh sumber kontaminasi bakteri.
2. Perlu dilakukan pengawasan secara ketat pada proses pengolahan air (*water treatment*), pemeliharaan fasilitas atau peralatan yang digunakan, memperhatikan kualitas produk yang dihasilkan serta sanitasi lingkungan.
3. Dinas kesehatan dan instansi terkait tetap konsisten dalam melakukan pengawasan kualitas air minum dalam kemasan dan isi ulang untuk menjamin keamanan produk bagi konsumen

### **Rekomendasi dari hasil penelitian ini:**

1. Masyarakat yang mengkonsumsi air minum isi ulang sebaiknya dididihkan terlebih dahulu agar bakteri patogen mati dan untuk air minum dalam kemasan sebaiknya diamati penampilan fisik masih layak atau tidak, pastikan tidak ada semacam lendir di dalamnya sebab ini merupakan indikasi tercemarnya produk air dalam kemasan.
2. Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) lebih intensif dalam melakukan pengawasan terhadap air minum dalam kemasan dan isi ulang yang beredar di masyarakat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2006. ***Escherichia coli O157:H7 Infection*** (on line) (<http://www.health.state.ny.us>, diakses 12 November 2007).
- Anonim. 2007. ***Reverse Osmosis*** (on line). (<http://www.fujiro.com>, diakses 4 Desember 2007).
- Alaerts, G.A. dan Santika, S.S. 1997. ***Metode Penelitian Air***. Surabaya: Usaha Nasional.
- Bopp, D.J., Sauders, B.D., *et al.* 2003. **Detection, Isolation, and Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* Associated with a Large Waterborne Outbreak.** *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 41, No. 1. p. 174-180.
- Campbell, N.A. *et al.* 1999. ***Biology, fifth edition***. USA: Addison Wesley Langman, Inc.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2003. ***E.coli O157:H7: Procedure for Isolation and Identification from Stool Specimens***.
- Calderwood, S.B., Auclair, F., *et al.* 1987. **Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 4364-8.
- Chinyu Su and Brandt, L.J. 1995. ***Escherichia coli* O157:H7 Infection in Humans.** *Annals of Internal Medicine*, Volume 123 Issue 9, p. 698-707.
- Clark, M. 2007. ***Escherichia coli* O157:H7** (on line). (<http://www.about-ecdi.com>, diakses 12 November 2007).
- Dieffenbach, W.C. and Gabriella, S.D. 1995. ***PCR Primer: A Laboratory Manual***. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Furutani, M., Ito, K., *et al.* 1990. **Demonstration of RNA N-glycosidase activity of a Verotoxin (VT2 variant) produced by *Escherichia coli* O91:H21 from a patient with the hemolytic-uremic syndrome.** *FEMS Microbiol Lett.* , 44:91-4.
- Farmer, J.J. and Davis, B.R. 1985. **H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis.** *J Clin Microbiol.* 22: 620-5.
- Griffin, P.M. and Tauxe, R.V. 1991. **The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and the associated hemolytic-uremic syndrome.** *Epidemiol Rev.*, 13:60-98.

Hatta, M. and Smits, H.L. 2007. **Detection of *Salmonella Typhi* by Nested Polymerase Chain Reaction in Blood, Urine, and Stool Samples.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76(1), p. 139-143.

Jackson, M.P., Neill, R.J., *et al.* 1987. **Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophage from *Escherichia coli* 933.** *FEMS Microbiol Lett.*, 44:109-14.

Johnson, W.M., Lior, H., Bezanson, G.S. 1983. **Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada.** *Lancet.*, 1:76.

Kerr, M., Fitzgerald, M., Sheriden, J.J. 2000. **The Survival of Added *Escherichia coli* O157:H7 in Natural Mineral Water and Its Product and the Development of a Rapid Method for Enumeration of the Heterotrophic Bacteria in Natural Mineral Water.** The National Food Centre, Teagasc, Dunsinea, Castleknock, Dublin 15.

Kompas, 2003. ***Mengamankan Air Minum Isi Ulang*** (on line). (<http://www.kompas.co.id>, diakses 12 November 2007).

Lacroix, B., Li, W.M.K., Powell, D.A. 2008. **The Microbiological Safety of Bottled Water in Canada.** Food Safety Network. University of Guelph, Canada.

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*, 50:11, 2037-2044.

Mordechai, E. 1999. ***Application of PCR the Methodologies in Molecular Diagnostic.*** USA: Burlington Country.

March, S.B. and Ratnam, S. 1986. **Sorbitol MacConkey Medium for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 Associated with Hemorrhagic Colitis.** *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.23, No. 5 p. 869-872.

Noda, M., Yutsudo, T., *et al.* 1987. **Purification and Some Properties of Shiga-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is Immunologically identical to Shiga toxin.** *Microb. Pathog.*, 2:339-49.

O'Brien, A.D., Lively, T.A., *et al.* 1983. ***Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin.** *Lancet.*, 1:702.

O'Brien, A.D., Chang, T.W., *et al.* 1983. **Purification of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis.** *Lancet.*, 2:573.

Petridis, H., Kidder, G., Ogram, A. 2002. ***Escherichia coli* O157:H7 a Potential Health Concern**. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville.

Plauche, S.B. 2006. **Detection and Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Cattle Water Troughs and the Effects of Cetylpyridinium Chloride againsts *E.coli* O157:H7 biofilm on the Surface of Stainless Steel**. Dissertation. Faculty of The Louisiana State University.

Permenkes RI No. 907/Menkes/SK/VII/2002 tentang **Syarat-syarat dan Pengawasan Kualitas Air Minum**. 2002. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Peraturan Menperindag RI No. 651/MPP/Kep/10/2004 tentang **Persyaratan Teknis Depot Air Minum dan Perdaganganannya**. 2004. Jakarta: Departemen Perindustrian dan Perdagangan Republik Indonesia.

Pedoman Proses dan Mesin/Peralatan Produksi Air Minum Dalam Kemasan. 2008. (on line) (<http://klm-micro.com/blog/klm-drinking-water>) diakses Mei 2008.

Poedji, W., 2004. **Analisis Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kualitas Air Minum Isi Ulang (AMIU) di Kota Makassar**. Tesis tidak diterbitkan. Makassar: Program Pascasarjana UNHAS.

Pracoyo, N.E., dkk. 2006. **Penelitian Bakteriologi Air Minum Isi Ulang di Daerah Jabotabek Tahun 2004**. Pusat Penelitian Pemberantasan Penyakit. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.

Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S. 1988. **Dasar-dasar Mikrobiologi 2**. Universitas Jakarta: Indonesia Press.

Soemirat, J. 2004. **Kesehatan Lingkungan**. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Suprihatin. 18-24 Maret 2004. **Air Minum Isi Ulang Layakkah Dikonsumsi**. *Majalah Femina*, No.12/XXXII.

Tempointeraktif. 3 Desember 2003. **Isi Ulang Air Dalam Kemasan Hanya Boleh Bagi Pemegang Merek** (on line). (<http://www.tempointeraktif.com>, diakses 12 November 2007).

Tribun Timur. 16 Agustus 2007. **Hati-hati, Puluhan Air Depot Isi Ulang Tak Higienis** (on line). (<http://www.tribuntimur.com>, diakses 12 November 2007).

Todar, K. 2004. **The Enteric Bacteria**. Todar's Online Textbook of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison.

Todar, K. 2005. ***E.coli* Infections**. Ken Todar's Microbial World, University of Wisconsin-Madison.

Tarr, P.I. 1995. ***Escherichia coli* O157:H7: Clinical, Diagnostic, and Epidemiological Aspect of Human Infection**. *Clinical Infectious Diseases*, 20:1-10.

Wikipedia, 2007. ***Escherichia coli* O157:H7**. (on line) (<http://en.wikipedia.org/wiki/E.coliO157:H7>, diakses 12 November 2007).

Waddell, T., Head, S., Petric, M. *et al.* 1988. **Globotriosyl Ceramide is Specifically Recognized by the *Escherichia coli* Verocytotoxin 2**. *Biochem Biophys Res Commun.* 152:674-9.

Warburton, D.W., Austin, J.W., Harrison, B.H. *et al.* 1998. **Survival and Recovery of *Escherichia coli* O157:H7 in Inoculated Bottled Water**. *Journal of food protection* vol.61:948-952.

Waluyo, L. 2004. ***Mikrobiologi Umum***. Malang: UMM Press

Yaron, S. and 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.

Yuwono, T., 2006. ***Teori dan Aplikasi PCR***. Yogyakarta: Penerbit ANDI

Zhao, T., Doyle, M.P., Zhao, P. 2001. **Chlorine Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Water**. *Journal of Food Protection*, Vol. 64, No.10, p.1607-1609.

Zeofilt, 2008. **Zeofilt Water Treatment**. (on line). (<http://zeofilt.wordpress.com>) diakses April 2008.

## Lampiran 1.

## PERSYARATAN KUALITAS AIR MINUM

## PERATURAN MENTERI KESEHATAN RI

Nomor : 907/MENKES/SK/VII/2002

Tanggal : 29 Juli 2002

## BAKTERIOLOGIS

Parameter	Satuan	Kadar Maksimum yang diperbolehkan
<b>a. <u>Air Minum</u></b> <i>E.Coli</i> atau <i>fecal coli</i>	Jumlah per 100 ml sampel	0
<b>b. <u>Air yang masuk sistem distribusi</u></b> <i>E.Coli</i> atau <i>fecal coli</i>	Jumlah per 100 ml sampel	0
Total Bakteri Coliform	Jumlah per 100 ml sampel	0
<b>c. <u>Air pada sistem distribusi</u></b> <i>E.Coli</i> atau <i>fecal coli</i>	Jumlah per 100 ml sampel	0
Total Bakteri Coliform	Jumlah per 100 ml sampel	0

## Lampiran 2.

**PERSYARATAN PRODUK AIR MINUM STANDAR NASIONAL  
DAN INTERNASIONAL**

PARAMETER	NATIONAL / INDONESIA	FDA	Codex
PRODUK	SNI 01-3553-1996	Part 165(4-1-1997 Ed)	Codex STAN 108-1981
Nitrat (NO <sub>3</sub> )	Maks 45 mg/L	Maks 10 mg/L	Maks 45 mg/L
Nitrit (NO <sub>2</sub> )	Maks 0.005 mg/L	Maks 1 mg/L	Maks 0.005 mg/L
Amonium (NH <sub>4</sub> )	Maks 0.1 mg/L	-	-
Sulfat (SO <sub>4</sub> )	Maks 200 mg/L	Maks 250 mg/L	-
Klorida (Cl)	Maks 250 mg/L	Maks 250 mg/L	-
Florida (F)	Maks 1 mg/L	Maks 1 mg/L	Maks 2mg/L
Sianida (Cn)	Maks 0.05 mg/l	Maks 0.2 mg/L	-
Besi (Fe)	Maks 0.3 mg/L	Maks 0.3 mg/L	-
Mangan (Mn)	Maks 0.05 mg/L	Maks 0.05 mg/L	Maks 2.0 mg/L
Klor bebas	Maks 0,1 mg/L	-	-
Zinc	-	Maks 5.0 mg/L	Maks 5.0 mg/L
Phenols	-	Maks 0.001 mg/L	-
Total trihalomethan	-	Maks 0.10 mg/L	-
Endrin	-	Maks 0.0002 mg/L	-
<b>Logam Berat :</b>			
Timbal (Pb)	Maks 0.05 mg/L	Maks 0.005 mg/L	Maks 0.05mg/L
Tembaga (Cu)	Maks 0.5 mg/L	Maks 1.0 mg/L	Maks 1 mg/L
Cadmium (Cd)	Maks 0.01 mg/L	Maks 0.005 mg/L	Maks 0.01 mg/L
Raksa (Hg)	Maks 0.001 mg/L	Maks 0.002 mg/l	Maks 0.001 mg/L
Cemaran Arsen (As)	Maks 0.05 mg/L	Maks 0.05 mg/L	Maks 0.05 mg/L
<b>Mikrobiologi</b>			
Angka lempeng total awal	-		
Angka lempeng total akhir	-		
Bakteri bentuk coli	< 2 APM/100 mL		< 2 APM/mL
C. perfringens	Negatif/100mL		
Salmonella	Negatif/100mL		
Pseudomonas	-		0
Aeruginosa	-		
Grop D Streptococi	-		0

Sumber: <http://klm-micro.com/>

**Lampiran 3.****SISTEM PENGOLAHAN AIR SECARA ULTRA VIOLET  
DAN OZONISASI**

Sumber air baku

?

Bak penampungan (*storage tank*)

?

Penyaringan bertahap:

- Saringan pasir (butir Silica)
- Saringan karbon aktif
- Mikro filter (maksimal 10 mikron)

?

Desinfeksi/Sterilisasi:

- Ultra Violet
- Ozonisasi

?

*Reaktor tank*

?

Filtrasi 5 mikron

?

Filtrasi 1 mikron

?

Kran pengisian air

Sumber: Poedji (2004) dan (<http://klm-micro.com/>)

## Lampiran 4.

**KARAKTERISTIK *Escherichia coli* SEROTYPE O157:H7**

	<b><i>E. coli</i> O157:H7 Reactions<sup>A</sup></b>	<b>Other <i>Escherichia</i> Reactions</b>
Gram Stain	Negative	Negative
IMViCs:		
Indole	+ (Red) <sup>B</sup>	variable
Methyl Red	+ (Red)	+ (Red)
Vogues-Proskauer	- (No Color)	- (No Colour)
Citrate	- (Green or No Growth)	- (Green or No Growth)
Cellobiose	- (Purple)	- (Purple)
Sorbitol	- (Pale or No Colour)	+ (Coloured)
Urea slants	- (Pale)	- (Pale)
Pigment Production on Nutrient Agar	- (No Pigment)	- (No Pigment)
MUG Reaction	- (No fluorescence <sup>C</sup> )	+ (Fluorescence)
BCIG Reaction	- (Pale)	+ (Coloured)
Latex Agglutination	+ (Positive)	- (Negative)
O157	+ (Positive)	- (Negative)
H7	+ (Positive)	- (Negative)
Verotoxin production (VT)	VT 1+ and/or VT 2+	VT 1 and/or VT 2+ or -

<sup>A</sup> + (Positive Reactions); - (Negative Reactions)

<sup>B</sup> Some *E. coli* O157 strains are indole negative.

<sup>C</sup> *E. coli* O157:H16 and H45 fluoresce when MUG is present.

Sumber: Laboratory Procedure MFLP-80, March 2008

## Lampiran 5.

**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 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	<i>Salmonellosis</i>	Standar higienis yang rendah, unggas yang tidak matang dan telur mentah
<i>Shigella</i> spp.	10 - 1,000,000	Disentri	Higienis individu yang rendah
<i>Vibrio cholerae</i>	1,000,000 - 1,000,000,000	Kolera	<i>seafood</i> mentah atau tidak matang dan air yang terkontaminasi

*Principal source:* Foodborne Pathogens: Risks and Consequences, Report No. 122, CAST- Council for Agricultural Science and Technology, September 1994.

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

## Lampiran 6.

**SKEMA PENELITIAN**

Sampel AMDK\*\* dan AMIU\*\*  
 ?  
 Sentrifus pada 3000 rpm selama 30 menit  
 (buang supernatannya, sedimen dikumpulkan)  
 ?  
 100 µL Kultur bakteri dan 100 µL Ekstraksi DNA

\*\* diamati parameter fisik (warna, bau, rasa dan kekeruhan) dan diukur pH air

**KULTUR *Escherichia coli* SEROTYPE O157:H7**

100 µL sampel dimasukkan dalam medium cair  
 Brain Heart Infusion Broth (BHIB)  
 (inkubasi 1x24 jam, suhu 35°C)  
 ?  
 Hasil positif  
 (ditandai dengan keruhnya medium)  
 ?  
 Ambil 1 ose digoreskan pada Sorbitol Mac Conkey Agar (SMAC)  
 dan Mac Conkey Agar  
 (inkubasi 1x24 jam, suhu 35°C)  
 ?  
 Koloni yang tidak berwarna (pucat) pada SMAC Agar  
 dilakukan uji biokimia (tes IMVIC)  
 ?  
 Identifikasi *Escherichia coli* serotype O157:H7  
 (merujuk pada lampiran 4)

**Lanjutan Lampiran 6.****EKSTRAKSI DNA (METODE BOOM)**

900  $\mu$ L *Lysis buffer* (L6) + 100  $\mu$ L sampel + 20  $\mu$ L suspensi diatom  
(vortex campuran ini, letakkan pada gyrotary shaker 100 rpm selama 10  
menit)

?

Vortex kembali, sentrifus pada 12.000 rpm selama 15 detik  
(Buang supernatannya)

?

Cuci 2x dengan 1 mL *Washing buffer* (L2)  
(vortex, sentrifus selama 15 detik, buang supernatannya)

?

Cuci 2x dengan 1 mL etanol 70% dan 1x dengan aseton  
(buang supernatant aseton, inkubasi pada suhu 56°C selama 10 menit)

?

Tambahkan 60  $\mu$ L TE-elution buffer  
(vortex, inkubasi pada suhu 56°C selama 10 menit)

?

Sentrifus selama 30 detik pada 12.000 rpm

?

Pindahkan 40-50  $\mu$ L supernatan ke dalam vial yang baru

?

Hasil Akhir

(siap diproses dengan teknik PCR)

## Lanjutan Lampiran 6.

### AMPLIFIKASI DNA DENGAN PCR

Tiap vial diisi 2,5  $\mu$ L DNA + 22,5  $\mu$ L campuran reaksi PCR

?

Amplifikasi 40 siklus:

- denaturasi: 94°C, 1 menit
- annealing: 57°C, 1 menit, 15 detik
- ekstensi: 72°C, 30 detik
- ekstensi akhir: 72°C, 24 jam

?

Produk PCR

### DETEKSI PRODUK PCR

Campurkan 5  $\mu$ L produk PCR + 2  $\mu$ L larutan loading

?

Masukkan dalam sumur gel agarosa 1,5%  
(masukkan juga *marker* DNA ? / HindIII)

?

Elektroforesis selama 1 jam

?

Diamati di bawah sinar Ultra Violet (UV)

?

Hasil berupa pola pita DNA (band DNA)

**Lampiran 7.****KOMPOSISI MEDIUM****Medium Sorbitol Mac Conkey Agar (Difco™)**

Formula Per Liter

Peptone	15,5 gram
Proteose Peptone	3.0 gram
D-Sorbitol	10,0 gram
Bile Salts	1,5 gram
Sodium Chloride	5,0 gram
Neutral Red	0,03 gram
Crystal Violet	0,001 gram
Agar	15,0 gram

**Medium Mac Conkey Agar (Difco™)**

Formula Per Liter

Peptone	17,0 gram
Proteose Peptone	3.0 gram
Lactose	10,0 gram
Bile Salts No. 3	1,5 gram
Sodium Chloride	5,0 gram
Neutral Red	0,03 gram
Crystal Violet	0,001 gram
Agar	13,5 gram

**Medium Mac Conkey Agar Base (Difco™)**

Komposisi sama dengan medium Mac Conkey Agar tanpa penambahan laktosa

Sumber: MacConkey\_Agars.pdf. dan MacConkey\_Agars\_with\_Sorbitol1.pdf.

## CURICULUM VITAE

### A. Data Pribadi

1. Nama : Febby Ester Fany Kandou
2. Tempat, tgl. Lahir : Makassar, 27 Februari 1969
3. Alamat : Jln. Malalayang 2, lingkungan 2  
Malalayang – Manado  
Telp. (0431) 832354, HP 081340044105
4. Status Sipil :
  - a. Nama suami : Ir. Johan A. Rombang, MSc., Ph.D
  - b. Nama anak : Ivanno Alexander Rombang  
Michelle Estherfania Rombang  
Claudia Emmanuela Rom bang

### B. Riwayat Pendidikan

#### 1. Pendidikan Formal :

- ✍ Tamat SD tahun 1982 di SD Negeri Kompl. Mangkura Makassar
- ✍ Tamat SLTP tahun 1985 di SMP Negeri 6 Makassar
- ✍ Tamat SLTA tahun 1988 di SMA Negeri 1 Makassar
- ✍ Sarjana (S1) tahun 1995 di Universitas Hasanuddin Makassar

#### 2. Pendidikan Non Formal : ---

### C. Pekerjaan dan Riwayat Pekerjaan

- ✍ Pekerjaan : Dosen FMIPA Universitas Sam Ratulangi Manado
- ✍ NIP : 132 176 159
- ✍ Pangkat/Jabatan : Penata, Golongan III C/ Lektor

D. Karya ilmiah/Artikel jurnal yang telah dipublikasikan :

- ✍ Virus sebagai Vektor dalam Terapi Gen Penyakit Genetik (Karya Ilmiah pada Jurnal *Sains* FMIPA Manado, 2008)
- ✍ Efektivitas Antibakteri Ekstrak Tumbuhan Daun Sendok (*Plantago major*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* (Jurnal *Eugenia* (Terakreditasi) Fak. Pertanian Manado, April 2006)
- ✍ Inventarisasi dan Penapisan Alkaloid Tumbuhan Obat Tradisional Suku Sangir di Kabupaten Sangihe Sulawesi Utara (Jurnal *Eugenia* (Terakreditasi) Fak. Pertanian Manado, Juli 2006)