

Optimization of Pathogenic Bacterial DNA Isolation in PCR-Based River Water Samples

Optimasi Isolasi DNA Bakteri Patogen pada Sampel Air Sungai Berbasis PCR

Ananda Aulia Putri¹, Yuni Ahda¹, Dwi Hilda Putri¹, Afifatul Achyar¹

¹Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

*Correspondence author: afifatul.achyar@fmipa.unp.ac.id

Abstract

Pathogenic bacteria are microorganisms that cause disease in their hosts by various processes which are clearly through direct damage to tissue or cells during replication, through the production of toxins that allow pathogens to reach new tissue or exit cells at the site of replication. Pathogenic bacteria such as *E.coli* can be spread through river water because many rivers are used as dumping grounds for sewage and rubbish, thereby spreading pathogenic bacteria. This research aims to determine the optimization of DNA isolation and detect pathogenic bacteria in river water samples. The methodology used in this research was taking samples of Ganges river water around the Biology Laboratory, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Padang State University and carrying out laboratory analysis. The results of research from optimization of Ganges river water samples show that the optimal primer for detecting pathogenic bacteria is the ESS primer. The ESS primer has the potential to amplify *E.coli*, *Salmonella* and *Shigella* bacteria with an amplicon size of 825 bp. Optimization of isolation is more optimal when the sample is inserted into a microtube.

Keywords: Pathogenic Bacteria, Isolation Optimization, River Water, DNA, PCR

Abstrak

Bakteri patogen adalah mikroorganisme yang menyebabkan penyakit pada inangnya dengan berbagai proses yang secara jelas melalui kerusakan langsung jaringan atau sel selama replikasi, melalui produksi toksin yang memungkinkan patogen mencapai jaringan baru atau keluar dari sel pada tempat bereplikasi. Bakteri patogen seperti *E.coli* dapat tersebar melalui air sungai karena sungai banyak dijadikan sebagai tempat pembuangan kotoran dan sampah sehingga menjadi penyebaran bakteri patogen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui optimasi isolasi DNA dan mendeteksi bakteri patogen pada sampel air sungai. Metodologi yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengambilan sampel air sungai gangga di sekitar Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang dan dilakukan analisis laboratorium. Hasil penelitian dari optimasi sampel air sungai gangga bahwa primer yang optimal untuk mendeteksi bakteri patogen adalah primer ESS. Primer ESS berpotensi mengamplifikasi bakteri *E.coli*, *Salmonella*, dan *Shigella* dengan ukuran amplicon 825 bp. Optimasi isolasi lebih optimal saat sampel dimasukkan kedalam *microtube*.

Kata kunci: Bakteri Patogen, Optimasi Isolasi, Air sungai, DNA, PCR

Pendahuluan

Patogen adalah mikroorganisme yang menyebabkan penyakit pada inangnya dengan berbagai proses yang secara jelas melalui kerusakan langsung jaringan atau sel selama replikasi, melalui produksi toksin yang memungkinkan patogen mencapai jaringan baru atau keluar dari sel pada tempat bereplikasi. Patogen didefinisikan sebagai mikroba yang menyebabkan kerusakan pada inang. Kerusakan pada inang disebabkan oleh respon imun berlebihan sehingga membunuh sel yang terinfeksi dan tidak terinfeksi serta merusak jaringan inang. Patogen secara taksonomi terdiri dari beberapa jenis seperti bakteri. Bakteri adalah patogen

mikroskopis yang bereproduksi dengan cepat setelah memasuki tubuh dengan cara melepaskan racun yang merusak jaringan dan menyebabkan penyakit. Secara umum patogenesis bakteri diawali dengan masuknya bakteri ke dalam tubuh inang melalui bermacam-macam cara, antara lain melalui saluran pernafasan, saluran pencernaan, rongga mulut, kuku dan lain-lain. (Balloux dan Dorp, 2017).

Bakteri patogen dapat tersebar melalui air. Air merupakan kebutuhan dasar hidup di bumi yang menentukan kesehatan dan kesejahteraan manusia. Salah satu sumber air dengan potensi yang besar adalah sungai. Sungai adalah aliran air alami dari daerah hulu ke daerah hilir. Aliran alami sungai merupakan sumber utama untuk memenuhi kebutuhan rumah tangga, sanitasi lingkungan, pertanian, industri, pariwisata, olahraga, perikanan, dan tenaga listrik. Sungai banyak dijadikan sebagai tempat pembuangan kotoran dan sampah sehingga menjadi penyebaran bakteri patogen yang menyebabkan penyakit (Adrianto, 2018). Penelitian (Ferdana *et al*, 2021) menyatakan terdapatnya bakteri patogen *E.coli* yang disebabkan oleh pembuangan limbah kegiatan industri PLTU serta limbah masyarakat di kawasan sungai sirih.. Sumber patogen diakibatkan oleh aktivitas masyarakat yang suka membuang sampah rumah tangga dan fecal manusia.

Salah satu parameter kualitas air adalah tidak tercemar *Escherichia coli*, *Salmonella thypi* dan *Shigella* sp (Achyar *et al*, 2021). Parameter kualitas air pada air sungai dapat dilakukan dengan metode isolasi DNA. Metode isolasi DNA menjadi tahapan penting untuk menghasilkan DNA murni. Isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA dari partikel-partikel lainnya seperti lipid, protein, polisakarida, dan zat lainnya. Proses tersebut membutuhkan preparasi sampel untuk mendapatkan DNA dengan kualitas yang baik karena akan digunakan untuk berbagai analisis molekuler. Analisis molekuler dilakukan pada setiap sampel dan untuk setiap sampel dibutuhkan optimasi untuk mendapatkan hasil yang optimal pada tahap isolasi sehingga DNA dapat terlihat jelas. Isolasi DNA berguna untuk beberapa analisis molekuler dan rekayasa genetika seperti PCR. Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan setelah mendapat optimasi yang optimal. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah salah satu teknik biologi molekuler untuk mengamplifikasi sekuen DNA spesifik menjadi ribuan sampai jutaan kopi sekuen DNA (Ferniah dan Pujiyanto, 2013)

Penelitian ini mengenai optimasi isolasi DNA bakteri patogen dengan menggunakan sampel air sungai dan dianalisis molekuler menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui optimasi isolasi DNA dan mendeteksi bakteri patogen pada sampel air sungai.

Bahan dan Metode

Pengambilan Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel air sungai gangga. Sampel air sungai Gangga diambil di sekitar Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang. Air sungai yang sudah diambil kemudian dimasukkan ke dalam botol plastik. Air sungai gangga berpotensi mengandung bakteri patogen karena kondisi air sungai yang kotor dipenuhi sampah rumah tangga yang dibuang di sekitar sungai.

Pembuatan Larutan Stok

Larutan stok yang dibutuhkan adalah TAE 50x, Buffer TE, dan Chelex-TE. TAE 50x dibuat dengan cara menimbang 24,4 gr Tris-base dan 100 ml 0,5 M EDTA ke dalam botol schott. Volume larutan dicukupkan 1000 ml dengan ditambah ddH₂O. Larutan disterilisasi menggunakan *autoclave*.

Buffer TE dibuat dengan menambahkan 1 ml Tris HCl 10 mM (pH 8) dan 0,1 ml EDTA 1 mM. Volume larutan dicukupkan hingga 100 ml dengan menambahkan ddH₂O. Larutan dihomogenkan dan disterilisasi menggunakan *autoclave*. Chelex-TE dibuat dengan konsentrasi 10% dengan cara ditimbang 0,1 gram Chelex kemudian ditambah 1 ml TE pH 8.

Optimasi Isolasi DNA

Metode Isolasi DNA bakteri menggunakan sampel air sungai gangga. Isolasi DNA menggunakan alat *sentrifuge* untuk mendapatkan pelet DNA pada sampel. Isolasi DNA menggunakan Chelex-TE pada kedua sampel yang membedakan pada sampel air sungai gangga diberi perlakuan f1, f2 adalah sampel yang dimasukkan di dalam tabung *falcon*) dan m1, m2 adalah sampel yang dimasukkan pada *microtube* kemudian diberikan pembeda pada perlakuan f1, dan m1 yang ditambahkan *proteinase-k*. Sampel dilakukan inkubasi selama 1 jam dengan kecepatan 250 rpm pada suhu 56°C kemudian diinkubasi lagi selama 10 menit dengan

kecepatan 250 rpm pada suhu 99°C lalu *sentrifuge*.

Amplifikasi PCR

Proses PCR dilakukan dengan menyalakan *thermocycler* kemudian menyiapkan tabung PCR, lalu diberi label. Bahan- bahan PCR dimasukkan ke tube sesuai komposisi. Metode PCR dilakukan dengan menggunakan primer multiplex dan primer ESS. Program PCR yang digunakan yaitu: program Td Patogen.

Tabel 1: Primer Multiplex PCR

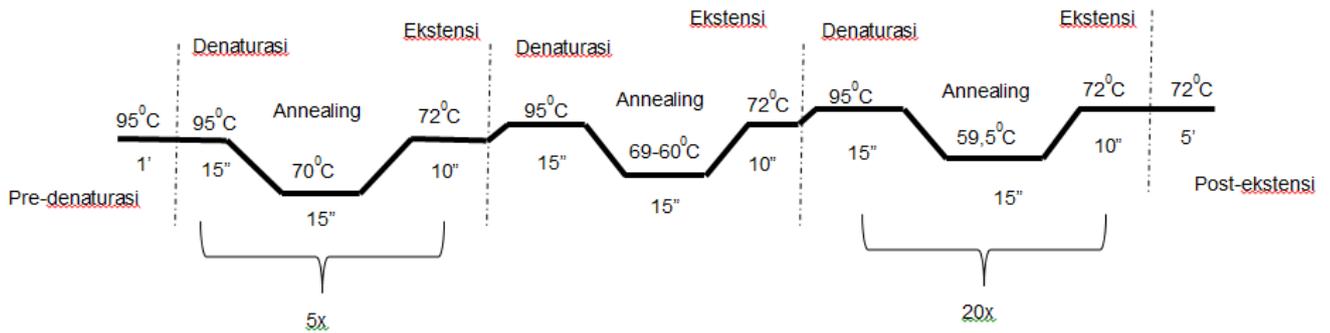
Primer	Deskripsi		
	Urutan	Ukuran Amplikon	Referensi
<i>E.coli</i> - AA Forward	5'-ATGCAGTGGTTCCTTATCTCACA-3'	417 bp	Putri <i>et al</i> , 2021
<i>E.coli</i> - AA Reverse	5'- ATCCTTAATGGCACTGCGCT-3'		
<i>Salmonella</i> - OY Forward	5'-CCGTCTTATCTTGATTGAAGCCG-3'	559 bp	Yuselman <i>et al</i> , 2021
<i>Salmonella</i> - OY Reverse	5'-CGTCATGATATCCGCCCA-3'		
<i>Shigella</i> - DB Forward	5'-GCTAATGAAAATGGCGCTGT-3'	817 bp	Purwakasih dan Achyar,2021
<i>Shigella</i> - DB Reverse	5'-AGCCGACGGTTGAAGTTAC-3'		

Tabel 2: Primer ESS PCR

Primer	Deskripsi		
	Urutan	Ukuran Amplikon	Referensi
ESS - Forward	5'-TTGCTCTTCGCTGACGAGT-3'	825 bp	Achyar <i>et al</i> , 2021
ESS -Reverse	5'- TTTAACCTTGCGGCCGTA-3'		

Tabel 3: Komponen PCR pada primer Multiplex dan primer ESS

Primer Multiplex		Primer ESS	
Komponen PCR	Volume	Komponen PCR	Volume
2x PCR Buffer	5 µL	2x PCR Buffer	5 µL
2 Mm dNTPS	2 µL	2 Mm Dntps	2 µL
10 µM Primer <i>e.coli</i> forward	0,3 µL	Primer ESS forward	0,4 µL
10 µM Primer <i>e.coli</i> reverse	0,3 µL	Primer ESS Reverse	0,4 µL
10 µM Primer <i>Salmonella</i> forward	0,1 µL	Enzim KOD Fx Neo	0,2 µL
10 µM Primer <i>Salmonella</i> reverse	0,1 µL	<i>Nuclease Free Water</i> (NFW)	1 µL
10 µM Primer <i>Shigella</i> forward	0,6 µL	DNA Template	1 µL
10 µM Primer <i>Shigella</i> reverse	0,6 µL		
Enzim KOD Fx Neo	0,2 µL		
<i>Nuclease Free Water</i> (NFW)	-		
DNA Template	0,8 µL		



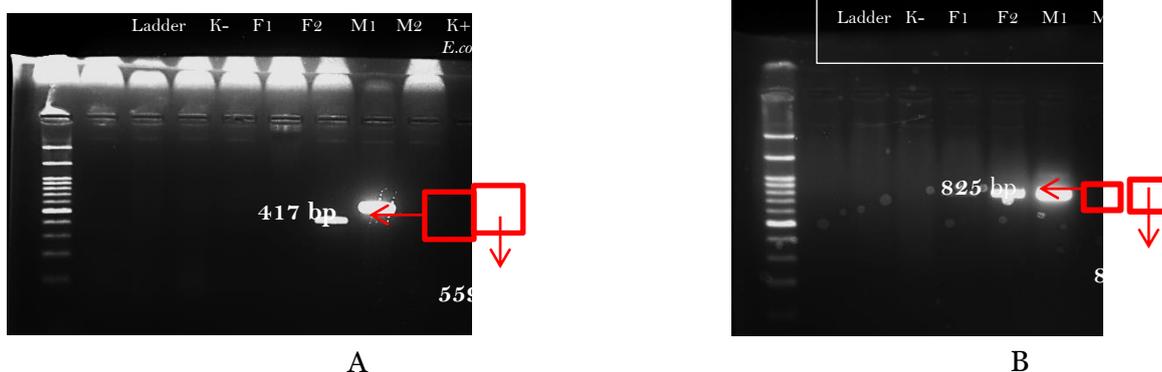
Gambar 1: Program PCR Td Patogen

Elektroforesis

Hasil PCR divisualisasikan dengan metode elektroforesis yang menggunakan gel agarose 2%.

Hasil dan Pembahasan

Optimasi isolasi dilakukan untuk mengetahui isolasi yang optimal demi mendapatkan DNA bakteri yang murni. Optimasi isolasi DNA dilakukan setiap tahapan proses isolasi yaitu tahap pelisisan sel, ekstraksi DNA, dan pemurnian DNA. Sampel yang dioptimasi disentrifugasi untuk mengendapkan sel dari komponen yang ada di sampel berdasarkan jenis molekul. Sampel yang telah disentrifugasi akan menghasilkan pelet yang akan diberi Chelex-TE dan *Proitenase-K*.



Optimasi pada sampel air sungai gangga dilakukan dengan menggunakan primer multiplex dan primer ESS dengan program PCR Td Patogen. Hasil elektroforesis pada gambar A menunjukkan hasil dari sampel air sungai gangga dengan menggunakan primer multiplex pada program Td Patogen. Gambar A tidak terlihat pita DNA pada sampel air sungai gangga dari kedua perlakuan yang dilakukan. Gambar A hanya menunjukkan kontrol positif pada DNA *E.coli* dan DNA *Salmonella* sedangkan DNA *Shigella* tidak terlihat. Hasil elektroforesis pada gambar B menunjukkan hasil dari sampel air sungai gangga dengan menggunakan primer ESS pada program yang sama yaitu Td Patogen. Gambar B menunjukkan ada pita DNA pada sampel M2 dan kontrol positif *E.coli*. Sampel M2 terlihat jelas pita DNA dengan ukuran ampikon 825 bp.

Berdasarkan hasil visualisasi diatas membuktikan primer ESS lebih optimal menunjukkan pita DNA pada air sungai gangga daripada primer Td- Patogen, dan hasil optimasi pada air sungai ini membuktikan bahwa sampel yang dimasukkan ke dalam *microtube* lebih optimal daripada sampel yang dimasukkan kedalam tabung falcon serta sampel yang hanya diberi Chelex-TE lebih optimal daripada diberi tambahan *Proitenase-K* pada sampel air sungai gangga .

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dari optimasi sampel air sungai gangga bahwa primer yang optimal untuk mendeteksi bakteri patogen adalah primer ESS. Primer ESS berpotensi mengamplifikasi bakteri *E.coli*, *Salmonella*, dan, *Shigella* dengan ukuran ampikon 825 bp (Achyar *et al*, 2021). Optimasi isolasi lebih optimal saat sampel dimasukkan kedalam *microtube*.

Daftar Pustaka

- Achyar, A. Putri, I. Putri, D. 2022. Sensitivity and Specificity of Molecular-Based Approach for Detecting Drinking Water Pathogen. *Journal of Science and Technology*. 11(2): 74-78.
- Achyar, A. Atifah, Y. Putri, D. 2021. In Silico Study of Developing a Method for Detecting Pathogenic Bacteria in Refillable Drinking Water Sample. *Journal of Physics: Conference Series*. doi:10.1088/1742-6596/1940/1/012061
- Adrianto, R. 2018. Pemantauan Jumlah Bakteri Coliform di Perairan Sungai Provinsi Lampung. *Jurnal Teknologi Agro Industri*. 10(1): 1-6
- Balloux, F. dan Dorp, I. 2017. Q&A: What are Pathogens, and What Have They Done TO and for us. *Journal BMC Biology*. 15(1): 1-6
- Ferdana, G. Nursyirwani. Amin, B. 2021. Concentration of Water Pollution Indicators Bacteria in Sirih Padang Sumatera Barat. *Asian Journal of Aquatic Sciences*. 4(1): 44-53
- Muhsinin, S. Sulastri, M. Supriadi, D. 2018. Deteksi Cepat Gen InvA pada *Salmonella sp.* dengan Metode PCRm. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*. 5 (3) : 191-200.
- Purwakasih, B. D. and Achyar, A. 2021. Primer Design and in Silico PCR for Detection *E. coli sp.* on Refilled Water Samples. *Serambi Biologi*. 6(1), 1-6.
- Putri, A. I., Achyar, A., Putri, D.H., Ahda, Y. 2021. Primer design, in silico PCR and optimum annealing temperature for *Escherichia coli* detection in refillable drinking water samples. *Tropical Genetics* 1(2), 52-60
- Yuselman, O., Achyar, A., Putri, D.H., Ahda, Y. in press. Primers Design and PCR Optimization for Developing *Salmonella sp.* Detection Method on Refillable Drinking Water Sample. *Advances in Biological Sciences Research: Proceedings of the 3rd International Conference on Biology, Science and Education (ICoBioSE 2021)*.