

APLIKASI TEKNIK TINDAKAN BERANTAI POLIMERASE (PCR)
DALAM PENGENALPASTIAN STRAIN
ESCHERICHIA COLI DALAM AIR

KOH KENG WEI

TESIS INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI
SEBAHAGIAN DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH
SAUJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN

PROGRAM SAINS SEKITARAN
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

2005



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: APLIKASI TEKNIK TINDAKAN BERANTAI (PCR)
Dalam Pengenalpastian Strain E. coli dalam air.

Ijazah: SAJAJANA MUDA SAINS

SESI PENGAJIAN: 2WS - 2WS

Saya KOH KENG WEE

(HURUF BESAR)

mengaku membenarkan tesis (LPS/Sarjana/Doktor Falsafah)* ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. **Sila tandakan (/)

SULIT

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh

(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: S. LRA SRI KUANTAN
19, LAMPURH GALING BESAR

Dr. Yun Leong Wan

Nama Penyelia

253W, KUANTAN, PAHANG

Tarikh: 29.3.2005

Tarikh: 29.3.2005

CATATAN: * Potong yang tidak berkenaan.

** Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana socara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah dijelaskan sumbernya.

22 Februari 2005



KOH KENG WEI

HS2002-3892



DIPERAKUKAN OLEH

Tandatangan

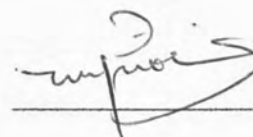
1. PENYELIA

(Dr Bonaventure Vun Leong Wan)



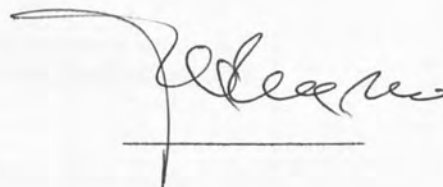
2. PENYELIA BERSAMA

(Ms Teoh Peik Lin)



3. PEMERIKSAAN 1

(Profesor Madya Dr Mohd Harun Abdullah)



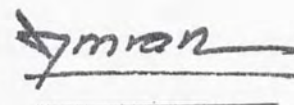
4. PEMERIKSAAN 2

(Cik Farrah Anis Fazliatul Adnan)



5. DEKAN

(Profesor Madya Dr Amran Ahmed)





PENGHARGAAN

Terlebih dahulu, saya amat bersyukur kerana kajian disertasi ini dapat disiapkan dalam tempoh yang ditentukan bagi memenuhi syarat memperolehi Ijazah Sarjana Muda Sains dengan kepujian dalam Program Sains Sekitaran sesi 2004/2005.

Saya ingin mengambil kesempatan ini untuk mengucapkan ribuan terima kasih kepada penyelia dan ko-penyelia projek ini iaitu Dr Vun Leong Wan dan Ms Teoh Peik Lin ke atas pertolongan dan bimbingan yang amat berguna sepanjang tempoh kajian ini dijalankan. Selain itu, saya amat berterima kasih kepada dua pemeriksa saya iaitu Profesor Madya Dr. Mohd Harun Abdullah dan Cik Farrah Anis atas komen tentang projek 1. Tambahan pula, saya juga amat berterima kasih kepada ahli –ahli keluarga saya dan Mr Aw Yong (shibo) dari Pertubuhan Buddhist Tzu Chi Merit di cawangan Kota Kinabalu yang sentiasa memberikan dorongan dan semangat kepada saya.

Di samping itu, saya juga ingin merakamkan ucapan terima kasih atau “Gan En” kepada rakan sebaya dan sahabat baik.

Akhir kata, saya ingin merakamkan penghargaan saya terhadap pihak Universiti Malaysia Sabah, kakitangan di Institut Penyelidikan Bioteknologi dan Sekolah Sains dan Teknologi atas bantuan dan kerjasama mereka sepanjang tempoh kajian ini.

Koh Keng Wei



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

ABSTRAK

Tujuan kajian ini adalah untuk mengenalpasti strain *Escherichia coli* dalam sampel air dengan menggunakan Tindakan Berantai Polimerase (PCR) yang berasaskan kepada pengamplifikasian gen 16S rRNA. *E. coli* dari air tasik dan air sungai telah dikultur dengan media *Lauryl Sulphate Broth* dan LB Agar. Tiga koloni tunggal telah dipilih untuk melakukan tindakan berantai polimerase dengan tiga jenis primer oligonukleotida iaitu 16E1, 16E2, dan 16E3. Pengoptimuman suhu penggabungan PCR telah memberikan amplifikasi yang baik lantas menunjukkan hasil keputusan yang jelas dan bersaiz 584 bp dalam elektroforesis gel. Keputusan dalam kajian ini telah menunjukkan bahawa gabungan primer seperti 16E1/16E2, 16E1/16E3 dan 16E1/16E2/16E3 memberikan strain *E. coli* yang mungkin hadir dalam sampel air tetapi tidak konklusif.



ABSTRACT

A method was being developed for the identification of *Escherichia coli*, using the polymerase chain reaction (PCR) based on the amplification of 16S rRNA gene by three specific oligonucleotide primers. Two types of water samples were selected; namely lake water and river water for this study. *E. coli* in both water samples were cultured on *Lauryl Sulphate* broth and LB Agar. Three single colonies were selected and amplified with three oligonucleotide primers so-called 16E1, 16E2 and 16E3. The optimization of PCR's annealing temperatures had resulted in better amplification and such results were clearly shown in the gel electrophoresis that followed. Results showed that the combination of primers such as 16E1/16E2, 16E1/16E3 and 16E1/16E2/16E3 gave different strain of *E. coli* that possibly present in water sample but not conclusive.



KANDUNGAN

Muka Surat

HALAMAN JUDUL	
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	xi
SENARAI RAJAH	xii
SENARAI FOTO	xiv
SENARAI SIMBOL, UNIT DAN SINGKATAN	xv
SENARAI LAMPIRAN	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 PENGENALAN	1
1.2 OBJEKTIF KAJIAN	5
1.3 KEPENTINGAN KAJIAN	5
BAB 2 ULASAN LITERATUR	6
2.1 Isu-isu Penyakit Bawaan-Air	6
2.1.1 Cara Pendedahan	8
2.1.2 Penyakit Bawaan-Air	9
2.1.3 Jenis Penyakit Bawaan-Air	9
2.1.3.1 Penyakit <i>Cryptosporidiosis</i>	9
2.1.3.2 Penyakit <i>Giardiasis</i>	10
2.1.3.3 Penyakit Ulser Peptik	10
2.1.3.4 Penyakit “ <i>Amoebic Meningoencephalitis</i> ”	11
2.1.3.5 Penyakit Kolera	11
2.1.3.6 Penyakit Diarrhea	12



2.2	<i>Escherichia coli</i>	13
2.2.1	Taksonomi	13
2.2.2	Ekologi	14
2.2.3	Morfologi	15
2.2.3.1	Pili	15
2.2.3.2	Flagela	16
2.2.3.3	Genomik <i>E. coli</i>	17
2.2.3.4	Asid Ribonukletida (RNA)	18
2.2.3.5	Toksin	20
2.3	Pengelasan <i>E. coli</i> Patogenik	21
2.3.1	<i>E. coli</i> Enteropatogenik (EPEC)	21
2.3.1.1	Epidemiologi	22
2.3.1.2	Patogenesis	22
2.3.2	<i>E. coli</i> Enterotoksikgenik (ETEC)	23
2.3.2.1	Epidemiologi	23
2.3.2.2	Patogenesis	23
2.3.3	“ <i>Enteroinvasive E. coli</i> ” (EIEC)	24
2.3.3.1	Epidemiologi	24
2.3.3.2	Patogenesis	25
2.3.4	“ <i>Enterohaemorrhagic E. coli</i> ” (EHEC)	25
2.3.4.1	Epidemiologi	25
2.3.4.2	Patogenesis	26
2.3.5	“ <i>Enteraggregative E. coli</i> ” (EAEC)	27
2.3.5.1	Patogenesis	27
2.4	Perbandingan Kaedah Pengenalpastian <i>E. coli</i>	28
2.5	Tindakan Berantai Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	30
2.5.1	Prinsip-prinsip PCR	30
2.5.2	Primer	31
2.5.3	Templat	33
2.5.4	Mekanisma	34
2.5.4.1	Kitar Nyahasli (<i>DENATURING</i>)	34
2.5.4.2	Penggabungan (<i>ANNEALING</i>)	34



2.5.4.3 Pemanjangan (<i>ELONGATION</i>)	35
2.5.5 Perpustakaan DNA dan Komplemetari DNA (cDNA)	36
2.5.6 Elektroforesis Gel Agaros (<i>AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS, AGE</i>)	37
BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH	42
3.1 Bahan	42
3.1.1 Sampel air	42
3.1.2 Media Lauryl Sulfat Broth	42
3.1.3 Media Luria Bertani Agar	42
3.1.4 Primer Oligonukleotida	43
3.1.5 Elektroforesis Gel Agaros	43
3.2 Kaedah	44
3.2.1 Pengambilan Sampel	44
3.2.2 Teknik Aseptik	44
3.2.3 Pengkulturan dan Pertumbuhan	45
3.2.4 Pengayaan Kultur	45
3.2.5 Pengekstrakkan DNA	45
3.2.6 Pengamplifikasian dengan PCR	46
3.2.7 Elektroforesis Gel Agaros	48
BAB 4 KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN	50
4.1 Suhu Penggabungan	50
4.2 Pengekstrakkan DNA	51
4.3 Pengamplifikasian PCR bagi set pasangan primer 16E1/16E2, 16E1/16E3, dan 16E1/16E2/16E3	56
4.3.1 Sampel air tasik	56
4.3.2 Sampel air sungai	61
4.4 Media Pertumbuhan	69



BAB 5	KESIMPULAN DAN CADANGAN	71
5.1	Kesimpulan	71
5.2	Cadangan	72
	RUJUKAN	74
	LAMPIRAN	82



SENARAI JADUAL

No. Jadual		Muka Surat
2.1	Perbandingan antara kaedah yang digunakan untuk menentukan kehadiran <i>E. coli</i> .	29
3.1	Penyediaan “ <i>PCR cocktail</i> ” di dalam keadaan berair	46
3.2	Program PCR	47
4.1	Ringkasan daripada jalur DNA yang wujud di dalam fotograf gel dengan menggunakan tiga keputusan gabungan pasangan primer 16E1/16E2, 16E1/16E3, dan 16E1/16E2/16E3 melalui langkah tindakan berantai polimerase (PCR)	65
4.2	Ringkasan daripada strain <i>E. coli</i> yang wujud di dalam fotograf gel dengan menggunakan tiga keputusan gabungan pasangan primer 16E1/16E2, 16E1/16E3, dan 16E1/16E2/16E3 melalui langkah tindakan berantai polimerase (PCR) yang dipetik daripada Tsen <i>et al.</i>	65

SENARAI RAJAH

No. Rajah		Muka Surat
2.1	Langkah dalam Tindakan Berantai Polimerase	36
2.2	Sistem gel agaros elektroforesis tenggelam	40
2.3	Langkah yang sesuai untuk memuatkan sampel DNA ke dalam telaga gel agaros	41
4.1	Hasil ekstraksi DNA 3 koloni dari lokasi yang berbeza di Tasik SST untuk persampelan kali pertama	53
4.2	Hasil ekstraksi DNA bagi 3 koloni dari lokasi yang berbeza di Tasik SST untuk persampelan kali pertama	53
4.3	Hasil ekstraksi DNA bagi 3 koloni dari yang berbeza di Sungai Likas untuk persampelan kali pertama	55
4.4	Hasil ekstraksi DNA bagi 3 koloni dari tiga lokasi yang berbeza di Sungai Likas untuk persampelan kali pertama	55
4.5	Produk PCR air tasik (60°C) yang telah diamplifikasikan oleh pasangan primer 16E1/16E2, 16E1/16E3, 16E1/16E2/16E3 masing-masing bagi lorong 1, 3, dan 5. Lorong 7 menunjukkan tetangga DNA 100 bp manakala lorong 2, 4, dan 6 sebagai kawalan negatif	56



- 4.6 Produk PCR air tasik (58°C) yang telah diamplifikasikan oleh pasangan primer 16E1/16E2, 16E1/16E3, 16E1/16E2/16E3 masing-masing bagi lorong 2, 3, dan 4. Lorong 1 menunjukkan tetangga DNA 100 bp manakala lorong 5 sebagai kawalan negatif 57
- 4.7 Produk PCR bagi strain bakteria *E. coli* yang telah diamplifikasikan oleh pasangan primer 16E1/16E2/16E3. Lorong 1 menunjukkan tetangga DNA 100 bp manakala lorong 2, 3, 4, 5 dan 6 masing-masing mewakili strain EIEC, ETEC, EPEC, EHEC, dan *E. Coli* bukan patogenik. Kesemua strain ini merupakan kawalan positif yang dipetik dari Tsen *et al.* (1998) sebagai rujukan kajian. 59
- 4.8 Produk PCR air tasik (56°C) yang telah diamplifikasikan oleh pasangan primer 16E1/16E2, 16E1/16E3, 16E1/16E2/16E3 masing-masing bagi lorong 2, 3, dan 4. Lorong 1 menunjukkan tetangga DNA 100 bp manakala lorong 5 sebagai kawalan negatif 60
- 4.9 Produk PCR air sungai (58 °C) yang telah diamplifikasikan oleh pasangan primer 16E1/16E2, 16E1/16E3, 16E1/16E2/16E3 masing-masing bagi lorong 1, 2, dan 3. Lorong 5 menunjukkan tetangga DNA 100 bp manakala lorong 4 sebagai kawalan 61
- 4.10 Produk PCR air sungai (56 °C) yang telah diamplifikasikan oleh pasangan primer 16E1/16E2, 16E1/16E3, 16E1/16E2/16E3 masing-masing bagi lorong 2, 3 dan 4. Lorong 1 menunjukkan tetangga DNA 100 bp. 62
- 4.11 Produk PCR air sungai (60 °C) yang telah diamplifikasikan oleh pasangan primer 16E1/16E2, 16E1/16E3, 16E1/16E2/16E3 masing-masing bagi lorong 2, 3 dan 4. Lorong 1 menunjukkan tetangga DNA 100 bp. 64



SENARAI FOTO

No. Foto	Muka Surat
3.1 Tindakan Berantai Polimerase, PCR (Model: PTC-220, M J Research)	48



SEANARAI SIMBOL, UNIT DAN SINGKATAN

SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
WHO	World Health Organization
CDC	<i>Center of Disease Control</i>
HUS	sindrom hemolitik uremik
EPEC	<i>Escherichia. coli</i> Enteropatogenik
ETEC	<i>Escherichia. coli</i> Enterotoksikgenik
EHEC	<i>Escherichia. coli</i> Enterohaemorrhagic
EIEC	<i>Escherichia. coli</i> Enteroinvasive
EAEC	<i>Escherichia. coli</i> Enteroagregatif
STEC	<i>shiga-toxin-producing E. coli</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Raction</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid
rRNA	ribosomal Ribonucleic acid
rDNA	ribosomal Deoxyribonucleic acid
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
%	Peratus
NTEC	Nekrotoksigenik <i>E. coli</i>
H ₂ S	hidrogen sulfit
G	Guanine
C	Sitosol
µm	micrometer
kDa	kiloDalton
bp	base pair
tRNA	transfer ribonucleic acid
mm	milimeter
°C	darjah celsius
5'	five prime
3'	three prime
A	Adenine
T	Timina



U	Urasil
ATP	Adenosine trifosfat
CTP	Sitidina trifosfat
GTP	Guanosina trifosfat
UTP	Uridina trifosfat
mRNA	messenger Ribonucleic acid
dNTP	deoksinukleotida trifosfat
NaCl	Natrium klorida
K ₂ HPO ₄	kalium hidrogen fosfat
NaOH	natrium klorida
mL	mililiter
N	Normality
g	gram
KCl	kalium klorida
MgCl ₂	Magnesium klorida
Tris-HCl	Tris-Hidrogen klorida
mmolL ⁻¹	mili mol per liter
U	unit
mM	miliMolar
ddH ₂ O	double distilled water
TAE	Tris-acetate-EDTA
Na ₂ -EDTA	natrium EDTA
rpm	rotation per minit
s	second
pmol	pikomol
T _m	Melting Temperature
16E1	PCR Primer
16E2	PCR Primer
16E3	PCR Primer
SMAC	sorbitol-MacConley Agar
μl	micro liter
Cfu	Colony Forming Unit



SENARAI LAMPIRAN

No. Lampiran		Muka Surat
A	Struktur bagi pasangan bes	82
B	Struktur DNA	83
C	Struktur bagi DNA dan RNA	84
D	Bakteria <i>Escherichia coli</i>	85



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

Sehingga ke abad ini, pertambahan bilangan penduduk dunia secara eksponen telah mengakibatkan berbagai-bagai jenis penyakit wujud dan tercetus di merata dunia. Antaranya adalah virus “*Anthrax*” dan virus korona “*Severe Acute Respiratory Syndrome, (SARS)*”. Berdasarkan pada kedua-dua virus ini, virus “*Anthrax*” biasanya digunakan dalam peperangan (*WARS*) melalui bawaan-udara (*airborne*) sebagai senjata biologikal manakala virus korona “*Severe Acute Respiratory Syndrome, (SARS)*” pula tercetus dipercayai ekoran daripada virus yang terkandung di dalam tubuh badan binatang liar yang bernama “*Masked Palm Civet*” dan juga dikatakan sebagai senjata biologikal yang wujud daripada aktiviti antropogenik dengan tidak sengaja dan juga tidak disedari oleh manusia sendiri (Holmes, 2003).

Tambahan pula, berdasarkan pada nama singkatan bagi kedua-dua virus ini iaitu “*WARS*” dan “*SARS*”, cuma abjad pertama sahaja yang berbeza. Tetapi, implikasi bagi kedua-dua virus ini adalah serius sehingga menakutkan penduduk sedunia.



Justeru, kedua-dua virus ini telah meragut beratus-ratus nyawa penduduk dunia yang masing-masing berlaku di Amerika Syarikat dan Guangdong, China. Selain daripada virus, bakteria juga tidak ketinggalan menjadi musuh utama dunia pada masa kini. Antara penyakit yang disebabkan oleh bakteria adalah penyakit diarrhea, disentari, kolera dan lain-lain lagi yang dikenali sebagai penyakit bawaan-air. Oleh sebab bilangan penduduk dunia yang semakin bertambah secara eksponen, maka permintaan terhadap air minuman yang bersih dan bebas daripada patogen juga bertambah. Pada masa yang sama, banyak sungai, tasik dan air bawah tanah telah dicemari oleh aktiviti antropogenik lantas mengakibatkan tercetusnya penyakit bawaan-air (Rose *et al.*, 2001).

Sejak tahun 1975, penyakit bawaan-air berlaku dengan berleluasa di Amerika Syarikat. Ini adalah disebabkan oleh patogen enterik manusia yang wujud di dalam media air. Dianggarkan hampir 6000 kes kematian berlaku dalam satu hari yang berhubung dengan penyakit sebegini dan kebanyakan mangsanya adalah kanak-kanak (WHO/UNICEF, 2000). Sungguhpun begitu, pengetahuan mengenai kelakuan bagi berbagai-bagai jenis mikroorganisma di persekitaran dan sifat patogenesis juga diketahui. Tetapi, langkah yang lebih progresif masih belum diambil dan dilaksanakan. Walaubagaimanapun, hampir separuh daripada wabak yang berkaitan dengan air minuman kini berpunca daripada agen yang tidak diketahui puncanya. Tambahan pula, berbagai-bagai jenis patogen yang baru telah muncul, malangnya sifat dan impak setiap patogen itu adalah kurang jelas (Rose *et al.*, 2001).



Selain itu, berdasarkan pada laporan daripada *Center of Disease Control* (CDC), sejumlah 38 kes wabak yang berhubung dengan bakteria *Escherichia coli* O157 terdeteksi pada tahun 1999. Semasa terdeteksinya wabak ini pada tahun 1999, sebanyak 30 buah negeri di Amerika Syarikat telah terbabit dalam kes ini dan seramai 1897 orang telah dijangkiti penyakit bawaan air. Antaranya, 201 orang telah dimasukkan ke hospital, 37 orang dijangkiti sindrom hemolitik uremik (HUS), dan 4 orang dilaporkan mati. Sungguhpun begitu, sebanyak 70 peratus daripada penyakit ini berlaku di New York dan Illinois.

Ramai orang di dunia kini tidak berpeluang untuk menerima dan mengguna air yang bersih dan selamat. Fenomena ini mengakibatkan kadar jangkitan penyakit dan kematian meningkat dengan ketara ekoran daripada organisma pencetus penyakit di dalam air. Secara anggaran, hampir satu per empat daripada penghuni wad hospital terdiri daripada pesakit yang terjangkit dengan penyakit bawaan-air (Strauba *et al*, 2003).

Ketika *Escherichia coli* Enteropatogenik (EPEC) telah dipertimbangkan sebagai patogen *Escherichia coli* (*E. coli*) yang dominan di Sao Paulo, Brazil; satu kajian epidemiologi dilakukan untuk menentukan perkaitan di antara *E. coli* Enteroagregatif (EAEC) dengan diarrhea yang akut tidak dijumpai di Brazil sehingga kini (Scaletsky *et al.*, 2002). Tambahan pula, kehadiran *E. coli* dalam air boleh digunakan sebagai penunjuk biologikal untuk pencemaran tinja (*faecal contamination*) dan sebagai pengukuran untuk kualiti kebersihan. Lazimnya, sel *E. coli* yang hadir dalam media air kebanyakannya adalah *E. coli* bukan patogenik tetapi strain yang



patogenik seperti *E. coli* enterotoksigenik dan “*shiga-toxin-producing E. coli*” (STEC) juga turut hadir bersama (Tsen *et al.*, 1998).

Pelbagai cara telah digunakan untuk menentukan kehadiran jenis bakteria yang hadir dalam sampel makanan, klinikal dan air. Tetapi, cara yang digunakan untuk memperoleh maklumat daripada hasil itu adalah terhad. Sebagai contoh, kaedah konvensional melibatkan pengkulturan mikroorganisma (patogen bakteria) di atas media yang terpilih dan diidentifikasi berdasarkan pada ciri-ciri morfologikal, biokimia, dan immunologikal. Walaubagaimanapun, kaedah ini memakan masa dan skim penentuan berdasarkan pada sifat-sifat fenotip bakteria juga sukar ditafsirkan (Sheridan *et al.*, 1998).

Oleh hal yang demikian, suatu alat yang sensitif, spesifik dan berupaya untuk menentukan jenis bakteria atau strain *E.coli* yang hadir dalam sampel air persekitaran adalah diperlukan agar hasilnya boleh dikenalpasti dengan tepat. Antaranya adalah kaedah molekul (*molecular method*) iaitu Tindakan Berantai Polimerase (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) (Boccuzzi *et al.*, 1998).

Pengenalpastian *E. coli* dalam air dan makanan dengan kaedah molekul ini ditumpukan kepada penggunaan teknologi gen probe PCR ke atas gen *lacZ*, *lamB* dan *uid* serta operon *malB*. Tambahan pula, penentuan *E. coli* dalam makanan dengan kaedah penghibridan DNA kolorimetrik juga dibangunkan. Walaubagaimanapun, terdapat beberapa laporan atau kajian telah membuktikan bahawa penggunaan gen 16S rRNA sebagai target gen bagi kaedah PCR berpotensi untuk menentukan kehadiran strain *E. coli* dalam air dengan tepat. Oleh itu, tiga primer PCR yang unik



dan spesifik untuk penentuan *E. coli* dalam air ialah 16E1, 16E2, dan 16E3. Ini kerana ketiga-tiga primer ini berupaya mengekod pada bahagian V₃ dan V₆ dalam gen 16S rRNA *E.coli*. Kesimpulannya, terdapat bukti yang menunjukkan bahawa aplikasi ketiga-tiga primer ini berupaya menentukan strain *E. coli* yang hadir dalam air minuman dan air persekitaran dengan tepat dan berkesan (Tsen *et al.*, 1998).

1.2 OBJEKTIF KAJIAN

Objektif kajian bagi penyelidikan ini adalah untuk mengenalpasti strain *Escherichia coli* yang hadir dalam sampel air Sungai Likas dan Tasik Sekolah Sains dan Teknologi (SST) melalui pengamplifikasian 16S rDNA dengan menggunakan kaedah tindakan berantai polimerase (PCR).

1.3 KEPENTINGAN KAJIAN

Kepentingan kajian untuk penyelidikan ini adalah untuk memperkenalkan kaedah molekul dalam pengenalpastian strain *Escherichia coli*. Oleh itu, faktor seperti suhu penggabungan (*annealing temperature*), media pengkulturan dan gabungan primer spesifikasi akan diambil kira sebagai langkah yang efektif untuk mengenalpasti strain *E. coli* yang hadir. Sekiranya berlaku penyakit yang berkaitan dengan bakteria bawaan air, maka kaedah ini boleh mengenalpasti strain *E. coli* yang menjadi pencetus kepada penyakit tersebut.



BAB 2

ULASAN LITERATUR

2.1 ISU-ISU PENYAKIT BAWAAN-AIR

Terdapat lebih daripada satu bilion penduduk dunia sedang menggunakan air yang tidak selamat (Rose *et al.*, 2001). Daripada jumlah itu, sebanyak 3.4 juta orang telah terkorban akibat daripada jangkitan penyakit yang berhubung dengan air. Nilai ini kebanyakannya adalah membabitkan kanak-kanak. Antara penyakit ini termasuk malaria, diarrhea dan “*guinea worm*”. Walaupun Amerika Syarikat banyak memberi perhatian dalam mengawal pencemaran air dari aspek kimia tetapi aspek biologi (mikroorganisma patogen) merupakan ancaman utama dalam penyakit bawaan-air. Antaranya patogen ini adalah *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Helicobacter pylori*, *Naegleria fowleri*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O157, *Pfiesteria*, dan Hepatitis A (Rose *et al.*, 2001).

Di Amerika Syarikat, lebih daripada 200 juta orang menerima sistem bekalan air awam secara langsung. Ekoran daripada itu, dianggarkan sebanyak 9 milion kes penyakit bawaan-air berlaku setiap tahun. Simptom bagi jangkitan penyakit ini biasanya adalah pendek dan kadang-kadang seketika sahaja bagi seseorang yang sihat. Penyakit bawaan-air yang umum adalah penyakit gastrousus (*gastrointestinal*).



RUJUKAN

- Alexander, Steve K., Strete, Dennis. dan Niles, Mary Jane., 2004. *Laboratory Exercises in Organismal and Molecular Microbiology*. Mac-Graw Hill Companies, Inc, New York.
- Atlas, Ronald M. dan Parks, Lawrence C., 1997. *Handbook of Microbiological Method*. Ed ke-2 CRC Press, U.S.A.
- Balows, Albert., Truper, Hans G., Dworkin, Martin., Harder, Wim. dan Schleifer, Karl-Heinz., 1992. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology Of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Volume III. Ed. ke-2. Springer-Verlag, New York.
- Bej, Asim K. Dicesare, Jposeph L. Haff, Lawrence dan Atlas, Ronald M., 1991. Detection of *Escherichia coli* dan *Shigella* spp. in Water by Using the polymerase Chain Reaction and Gene Probe for *uid*. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**(4), 1013-1017.
- Bitton, Gabriel., Farrah, Samuel R., Montague, Clay L. dan Akin, Elmer W., 1986. Viruses in drinking water. *Environmental Science and Technology* **20**, 216–222.



- Boccuzzi, Victoria M., Straube, William L., Ravel, Jacques., Colwell, Rita R. dan Hill, Russell T., 1998. Preparation of DNA extracted from environmental water samples for PCR amplification. *Journal of Microbiological Methods* **31**, 193–199.
- Brenner, Kristen P., Rankin, Clifford C., Roybal, Yvette R., Gerard N. Stelma, J.R., Scarpino, Pasquale V. dan Dufour, Alfred P., 1993. New Medium for the Simultaneous Detection of Total Coliforms and *Escherichia coli* in water. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(11), 3534-3544.
- Burdun, David. W. dan Whitney, Donald. B., 1995. *BIOTECHNOLOGY: PROTEINS to PCR A Course in Strategies and Lab Techniques*. Birkhauser Boston, U.S.A.
- Centers for Disease Control and Prevention., 1999. Department of Health and Human services: Public Health Service. Atlanta, GA 30333.
- Colquhoun, K.O., Timms, S dan Fricker, C.R., 1995. Detection of *Escherichia coli* in potable water using direct impedance technology. *Journal of Applied Bacteriology* **79**, 635-639.
- Colwell, R R., 1996. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* **274**, 2025–2031.



- Connon, Daniel H., Chandler, Francis W., Schwartz, David A., Manz, Herbert J. dan Lack, Ernst E., 1997. *Pathology of Infectious Diseases*. Vol I. Appleton & Lange, Stamford.
- Coye, MJ. dan Goldoft, M., 1989. Microbiological contamination of the ocean, and human health. *New Journal of Medicine* **86**, 533–538.
- Curriero, Frank C., Patz, Jonathan A., Rose, Joan B. dan Lele, Subhash., 2001. The Association Between Extreme Precipitation and Waterborne Disease Outbreaks in the United States, 1948-1994. *American Journal of Public Health* **91**(8), 1194-1199.
- Dieffenbach, Carl W dan Dveksler, Gabriela S., 1995. *PCR Primer: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A.
- DuPont, H. L., Formal, S. B., Hornick, R. B., Snyder, M. J., Libonati, J. P., Sheahan, D. G., Labrec, E. H. dan Kalas, J. P., 1971. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *The New England Journal of Medicine* **285**, 1–9.
- Ferreira, A., Rendano, L., Wiedmann, M, dan Boor, K. J., 1999. Characterization of rpoS alleles in *Escherichia coli* O157:H7 and in other *E. coli* serotypes. *Journal of Applied Microbiology* **86**, 295-301.



- Fode-Vaughan, K.A., Maki, J.S., Benson, J.A. dan Collins, M.L.P., 2003. Direct PCR Detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* **37**, 239-243.
- Gilgen, M. Wegmuller, B. Burkhalter, P. Buhler, H-P. Muller, U. Luthy, J. dan Candrian, U., 1995. Reverse Transcription PCR To Detect Enteroviruses in Surface Water. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(4), 1226–1231.
- Gordillo, M. E., Reeve, G. R., Pappas, J., Mathewson, J. J., DuPont, H. L. dan Murray, B. E., 1992. Molecular characterization of strains of enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 889–893.
- Hacker, Jorg dan Heesemann, Jurgen., 2002. *Molecular Infection Biology Interactions Between Microorganisms and Cells*. John Wiley & Sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag, Canada.
- Holmes, Kathryn V., 2003. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *Journal of Clinical Investigation* **111**(11), 1605-1609.
- Hunter, P. R., 2003. Climate Change and Waterborne and vector-borne disease. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* **94**, 37S-46S.



- Innis, Michael A., Gelfand, David H., Sninsky, John J. dan White, Thomas J., 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc, U.S.A.
- Jackson, Charlene R. Fedorka-Cray, Paula J. dan Barrett, John B., 2004. Use of a Genus- and Species-specific Multiplex PCR for Identification of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* **42**(8), 3558-3565.
- Jothikumar, Narayanan dan Griffiths, Mansel W., 2002. Rapid Detection of Escherichia coli O157:H7 with Multiplex Real-Time PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(6), 3169-3171.
- Johnson, James R., 2000. Development of polymerase chain reaction-based assays for bacterial gene detection. *Journal of Microbiological Methods* **41**, 201-209.
- Josephson, K.L., Gerba, C.P dan Pepper, I.L., 1993. Polymerase Chain Reaction Detection of Nonviable Bacterial Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 3513-3515.
- Keer, J.T dan Birch, L., 2003. Molecular method for the assessment of bacterial viability. *Journal of Microbiological Methods* **53**, 175-183.
- Kilvington, S. dan Beeching, J., 1995. Identification and epidemiological typing of *Naegleria fowleri* with DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2071-2078.



- LeChevallier, MW., Norton, WD. dan Lee, RG., 1991. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 2610–2616.
- Lederberg, Joshua, 2000. *Encyclopedia of Microbiology*, Volume 2. Ed. ke-2. Academic Press, U.S.A.
- MacKenzie, WR., Hoxie, NJ., Proctor, ME., Gradus, MS., Blair, KA., Peterson, DE., Kazmierczak, JJ., Addiss, DG., Fox, KR. dan Rose, JB., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine* **331**, 161–167.
- Meyers, Robert A., 1995. *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, Wiley-VCH, Canada.
- Miesfeld, Roger L., 1999. *Applied Molecular Genetics*. John Wiley & Sons, Inc, Canada.
- Nataro, James P. dan Kaper, James B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* **11** (1), 142–201.
- Phillips, Jonathan., Murray, Paul. dan Crocker, John., 1995. *The Biology of Disease*. Black Well Science Ltd, Great Britain.



- Rose, Joan B., Epstein, Paul R., Lipp, Erin K., Sherman, Benjamin H., Bernard, Susan M. dan Patz, Jonathan A., 2001. Climate Variability and Change in the United States: Potential Impacts on Water and Foodborne Diseases Caused by Microbiologic Agents. *Environmental Health Perspectives* **109**.
- Reed, Bob. Holmes, David. Weyers, Jonathan. dan Jones, Allan., 1998. *Practical Skills in Biomolecular Sciences*. Addison Wesley Longman, England.
- Ryan, Kenneth J. dan George Ray, C., 2004. *SHERRIS MEDICAL MICROBIOLOGY: An Introduction To Infectious Diseases*. Ed. ke-4. MacGraw-Hill, U.S.A.
- Scaletsky, Isabel C. A., Fabbriotti, Sandra H., Silva, Sueli O. C., Morais, Mauro B. dan Fagundes-Neto, Ulysses., 2002. HEp-2-Adherent *Escherichia coli* Strains Associated with Acute Infantile Diarrhea, São Paulo, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* **8(8)**.
- Sheridan, G. E. C. Masters, C. I. Shallcross, J. A. dan Mackey, B. M., 1998. Detection of mRNA by Reverse Transcription-PCR as an Indicator of Viability in *Escherichia coli* Cells. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 1313–1318.
- Strauba, Timothy M. dan Chandlerb, Darrell P., 2003. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. *Journal of Microbiological Methods* **53**, 185–197.



Tsen, H.Y. Lin, C.K. dan Chi, W.R., 1998. Development and use of 16S rRNA gene targeted PCR primers for the identification of *Escherichia coli* cells in water. *Journal of Microbiology* **85**, 554-560.

WHO/UNICEF, 2000. "Global water supply and sanitation assessment 2000 report," Water For People. <http://www.water4people.org/default.htm>.

Wilson, Michael., McNab, Rod. Dan Henderson, Brian., 2002. *Bacterial Disease Mechanisms: An Introduction to Cellular Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge.

Yaron, S dan Matthews, K.R., 2002. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:O7: investigation of specific target genes. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 633-640.

Zhu, Q.Y., Li, L.Q., Guo, Z.B. dan Yang, R.F., 2002. Identification of Shiga-like toxin *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea by polymerase chain reaction. *Chinese Medical Journal* **115**(6), 815-818.

