

**OPTIMASI DAN VALIDASI METODE *POLYMERASE
CHAIN REACTION (PCR)* UNTUK MENDETEKSI
BAKTERI *Bacillus cereus* DAN
Pseudomonas aeruginosa PADA PANGAN**

SKRIPSI

**Disusun untuk memenuhi salah satu syarat
memperoleh gelar Sarjana Sains**






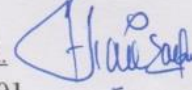
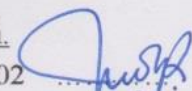
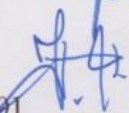
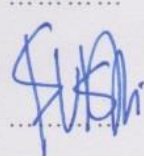
**HAZLEINI MISVAYANTY
3425122202**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA
2017**

PERSETUJUAN PANITIA UJIAN SKRIPSI

OPTIMASI DAN VALIDASI METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION*
(PCR) UNTUK MENDETEKSI BAKTERI *Bacillus cereus* DAN
Pseudomonas aeruginosa PADA PANGAN

Nama : Hazleini Misvayanty
No. Reg : 3425122202

Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Penanggung Jawab		
Dekan : Prof. Dr. Suyono, M.Si. NIP. 19671218 199303 1 005		29/17 8
Wakil Penanggung Jawab		
Wakil Dekan I : Dr. Muktiningsih, M.Si. NIP. 19640511 198903 2 001		29/17 8
Ketua : Dr. Reni Indrayanti, M.Si. NIP. 19621023 199803 2 002		24/17 8
Sekretaris / Penguji I : Dr. Tri Handayani K., M.Si. NIP. 19660316 199203 2 001		23/17 8
Anggota		
Pembimbing I : Dra. Yoswita Rustam, M.Si. NIP. 19530909 198010 2 002		22/17 8
Pembimbing II : Eva Nikastri, S.TP., M.Si. NIP. 19730126 200501 2 001		24/17 8
Penguji II : Dr. Dalia Sukmawati, M.Si. NIP. 19730914 200604 2 001		22/17 8

Dinyatakan lulus ujian skripsi pada tanggal 16 Agustus 2017

LEMBAR PENYATAAN

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul “**Optimasi dan Validasi Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk Mendeteksi Bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada Pangan**” yang disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dari Program Studi Biologi Universitas Negeri Jakarta adalah karya ilmiah saya dengan arahan dari dosen pembimbing.

Sumber informasi yang diperoleh dari penulis lain yang telah dipublikasikan yang disebutkan dalam teks skripsi ini, telah dicantumkan dalam Daftar Pustaka sesuai dengan norma, kaidah, dan etika penulisan ilmiah.

Jika dikemudian hari ditemukan sebagian besar skripsi ini bukan hasil karya saya sendiri dalam bagian-bagian tertentu, saya bersedia menerima sanksi pencabutan gelar akademik yang saya sanding dan sanksi-sanksi lainnya sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.



Jakarta, Agustus 2017

Hazleini Misvayanty

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamiin, segala puji bagi Allah SWT. Berkat rahmat dan ridho-NYA penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Optimasi dan Validasi Metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)* untuk Mendeteksi Bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada Pangan**”. Skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta.

Penulis menyadari bahwa dalam menyelesaikan skripsi ini banyak bantuan dari berbagai pihak yang telah mendukung, memberi bantuan, memberikan bimbingan dan doa. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dra. Yoswita Rustam, M.Si. dan Ibu Eva Nikastri, S.TP., M.Si. selaku dosen pembimbing yang telah banyak memberikan bimbingan, motivasi, masukan serta kesabaran untuk membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Terima kasih pula kepada Ibu Dr. Tri Handayani Kurniati, M.Si dan Ibu Dr. Dalia Sukmawati, M.Si. selaku dosen penguji yang telah memberi masukan dan saran kepada penulis dalam penulisan skripsi ini, Bapak Dr. Adisyahputra, M.S. selaku pembimbing akademik yang telah memberi arahan, masukan, dan motivasi bagi penulis selama perkuliahan, seluruh dosen pengajar di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Negeri Jakarta (UNJ) yang memberikan ilmu yang bermanfaat selama penulis menempuh studi, Ibu Desi dan ibu raihani yang telah memberikan dukungan selama penulis melakukan penelitian dan menyusun skripsi. Tidak lupa terima kasih penulis untuk ucapkan kepada pihak Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Gedung Pusat Riset Obat dan Makanan (PROM), BPOM yang telah memberikan izin penelitian skripsi.

Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada ayahanda Hazniel Haroen, Ibunda Misnawati, kakak Irwansyah Hazniel atas motivasi, dukungan, doa dan restu, serta kasih sayang yang selalu diberikan kepada penulis dalam suka dan duka, sehingga penulis tetap kuat dan semangat dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada seluruh staff dan karyawan PROM, terutama Mba Suci, Mba Silma, Mba Novi, Mba Lastri, Mba Dora, Pak Eka, Pak Tono, Pak Maru, Pak Asep, Pak Jaka yang telah berbaik hati membimbing, membantu, menyemangati penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, rekan seperjuangan penelitian tugas akhir di Laboratorium Mikrobiologi, yaitu Aisyah Wulandari yang telah menemani dan membantu penulis dalam melakukan penelitian hingga penyusunan skripsi, keluarga besar Biologi 2012, terutama: Stefani, Disa, Family, Agustina, Puput, Sherly, Via, Dinda, Tiya, Lita, Tria, Annisa, Riza, Afifah, dan Hima yang telah memberikan semangat dan dukungannya kepada penulis selama proses penelitian, sampai dengan terselesaikannya skripsi ini.

Kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak diharapkan demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pembaca dan dapat digunakan sebaik-baiknya.

Jakarta, Mei 2017

Hazleini Misvayanty

ABSTRAK

HAZLEINI MISVAYANTY. Optimasi dan Validasi Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk Mendeteksi Bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada Pangan. Dibawah Bimbingan YOSWITA RUSTAM dan EVA NIKASTRI.

Bacillus cereus dan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan contoh spesies bakteri yang dapat menyebabkan keracunan makanan. Deteksi bakteri pada makanan dapat dilakukan dengan metode PCR yang sudah teroptimasi dan tervaliditas untuk deteksi *B. cereus* dan *P. aeruginosa*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan kondisi optimum dalam mendeteksi *B. cereus* dan *P. aeruginosa* dengan melakukan optimasi secara kualitatif molekuler berbasis PCR dan mendapatkan validitas dari metode tersebut atau membuktikan kinerja metode analisis yang akan digunakan. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi PROM, BPOM, Jakarta Pusat. Hasil optimasi konsentrasi primer menunjukkan bahwa deteksi gen *motB* pada *B. cereus* dan gen 16S rRNA pada *P. aeruginosa* telah dapat teroptimasi dan tervaliditas dengan metode PCR yang optimum pada kondisi konsentrasi primer 20 μM , konsentrasi DNA 50 ng/ μL dan suhu *annealing* 55⁰C (*B. cereus*) dan 59⁰C (*P. aeruginosa*). Hasil validasi terhadap metode analisa pada masing-masing metode spesifik untuk deteksi *B. cereus* dan *P. aeruginosa* dengan menghasilkan LOD adalah 1 ng/ μL dan 0,5 ng/ μL , serta membuktikan metode analisa tersebut secara sensitifitas dan spesifisitas untuk deteksi *B. cereus* dan *P. aeruginosa* mencapai nilai 100% .

Kata kunci: *B. cereus*, optimasi, *P. aeruginosa*, PCR, validasi metode analisis.

ABSTRACT

Hazleini Misvayanty. Optimization and Validation of *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Method for Detecting Bacteria *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa* On Food. Under the guidance of YOSWITA RUSTAM and EVA NIKASTRI

Bacillus cereus and *Pseudomonas aeruginosa* are examples of bacterial species that can cause food poisoning. Detection of bacteria in food can be done by PCR method that has been optimized and validated for detection of *B. cereus* and *P. aeruginosa*. The purpose of this study is obtain the optimum condition in detecting *B. cereus* and *P. aeruginosa* by qualitative molecular-based PCR and obtain the validity of the method or prove the performance of the analytical method to be used. This research was conducted at Microbiology Laboratory PROM, BPOM, Central Jakarta. Primer concentration optimization results show that detection of *motB* gene on *B. cereus* and 16S rRNA gene in *P. aeruginosa* has been optimized and validated by optimum PCR method at 20 μ M primer concentration conditions, 50 ng/ μ L DNA concentration, and annealing temperature of 55⁰C (*B. cereus*) and 59⁰C (*P. aeruginosa*). The validation results of analysis on each specific method for detection of *B. cereus* and *P. aeruginosa* by yielding LOD is 1 ng/ μ L and 0.5 ng/ μ L and proving the method of analysis with sensitivity and spesificity for the detection of *B. cereus* and *P. aeruginosa* reach 100% value.

Keywords : *B. cereus*, optimization, *P. aeruginosa*, PCR, validation of analytical methods.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan	4
D. Manfaat	4
BAB II KAJIAN PUSTAKA	5
1. Bakteri	5
2. <i>Bacillus cereus</i>	7
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
4. Deteksi Bakteri Menggunakan Metode <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	10
5. Elektroforesis	13
6. Validasi Metode Analisis	14
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	16
A. Waktu dan Tempat Penelitian	16
B. Metode Penelitian	16
1. Alat dan Bahan	16
2. Cara Kerja	17
3. Analisis Data	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
A. Peremajaan dan Purifikasi Kultur Bakteri	25
B. Ekstraksi DNA	26
C. Optimasi Metode PCR	28

1.	Optimasi Konsentrasi Primer	28
2.	Optimasi Suhu <i>Annealing</i>	31
D.	Validasi Metode Secara Molekuler	33
1.	Penentuan Spesifisitas	34
2.	Penentuan <i>Limit of Detection</i> (LOD)	35
3.	Penentuan Sensitivitas, Spesifisitas, Positif Palsu, dan Negatif Palsu	36
4.	Penentuan Homologi <i>Bacillus cereus</i> dan <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	37
E.	Deteksi <i>Bacillus cereus</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada Sampel	39
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	43
A.	Kesimpulan	43
B.	Saran	43
	DAFTAR PUSTAKA	44
	LAMPIRAN	51
	DAFTAR RIWAYAT HIDUP	

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Ukuran pemisahan molekul DNA linear pada standar gel agarose	13
Tabel 2.	Primer <i>B. cereus</i> dan <i>P. aeruginosa</i>	17
Tabel 3.	Media selektif untuk <i>B. cereus</i> ATCC 11778 dan <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	18
Tabel 4.	Media selektif untuk bakteri pembanding	18
Tabel 5.	Komponen Reaksi PCR	19
Tabel 6.	Komponen Reaksi PCR	20
Tabel 7.	Kondisi validasi metode untuk <i>B. cereus</i>	22
Tabel 8.	Kondisi validasi metode untuk <i>P. aeruginosa</i>	22
Tabel 9.	Perhitungan hasil PCR untuk validasi metode	23
Tabel 10.	Nilai absorbansi <i>B. cereus</i> dan <i>P. aeruginosa</i> hasil ekstraksi DNA	27
Tabel 11.	Hasil amplifikasi parameter sensitivitas, spesifisitas, positif palsu, dan negatif palsu	37
Tabel 12.	Hasil identifikasi isolat <i>B. cereus</i> dan <i>P. aeruginosa</i> berdasarkan <i>sekuensing</i> dengan metode BLAST dan NCBI	38
Tabel 13.	Nilai absorbansi sampel hasil ekstraksi DNA	39

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Gambaran umum struktur sel bakteri	6
Gambar 2.	Morfologi <i>B. cereus</i>	7
Gambar 3.	Morfologi <i>P. aeruginosa</i>	9
Gambar 4.	Siklus PCR	12
Gambar 5.	Hasil isolasi: (A) <i>B. cereus</i> di media MYPA; (B) <i>P.aeruginosa</i> di media PAB	25
Gambar 6.	Hasil optimasi konsentrasi primer untuk deteksi <i>B. cereus</i> . Lajur M: <i>ladder marker</i> 100 bp; lajur 1-2, 5-6, 9-10, 13-14 dan 17-18 (<i>B. cereus</i>); lajur 3, 7, 11, 15, dan 19 (<i>non-template control</i>); lajur 4, 8, 12, 18, dan 20 (<i>master mix</i>)	29
Gambar 7.	Hasil optimasi konsentrasi primer untuk deteksi <i>P.aeruginosa</i> . Lajur M: <i>ladder marker</i> 100 bp; lajur 1-3 (<i>P.aeruginosa</i>); lajur 4 (<i>non-template control</i>); dan lajur 5 (<i>master mix</i>)	30
Gambar 8.	Hasil amplifikasi optimasi suhu <i>annealing</i> <i>B. cereus</i> . Lajur M: <i>ladder marker</i> 100 bp	31
Gambar 9.	Hasil amplifikasi optimasi suhu <i>annealing</i> <i>P. aeruginosa</i> Lajur M: <i>ladder marker</i> 100 bp	32
Gambar 10.	Hasil elektroforesis dibawah sinar UV menunjukkan pita DNA <i>B. cereus</i> . Lajur M: <i>ladder marker</i> 100 bp; lajur 1 (<i>B.cereus</i>); lajur 2-11 (bakteri lainnya); lajur 12 (<i>non-template control</i>); lajur 13 (<i>master mix</i>)	34
Gambar 11.	Hasil elektroforesis dibawah sinar UV menunjukkan pita DNA <i>P. aeruginosa</i> . Lajur 2, 11, dan 12 (<i>P. aeruginosa</i>); lajur 3-9 dan 13-16 (bakteri lainnya); lajur 17 (<i>non-template control</i>); lajur 18 (<i>master mix</i>)	35
Gambar 12.	Hasil amplifikasi PCR Limit of detection (LOD) DNA <i>B.cereus</i>	36

Gambar 13. Hasil amplifikasi PCR Limit of detection (LOD) DNA <i>P.aeruginosa</i>	36
Gambar 14. Hasil amplifikasi PCR isolat bakteri dari; (A) tepung mocaf (lajur 2-5), dendeng kaujon (lajur 6-9), susu formula (lajur 11-19), kontrol <i>B. cereus</i> (lajur 21); (B) air minum (lajur 2- 5), kontrol <i>P. aeruginosa</i> (lajur 6-7)	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Surat Izin Penelitian	51
Lampiran 2.	Komposisi dan Pembuatan Media	52
Lampiran 3.	Pengenceran Primer 100 μ M	56
Lampiran 4.	Pembuatan TBE	57
Lampiran 5.	Pembuatan Gel Agarosa 1,5%	58
Lampiran 6.	Hasil <i>Sequencing</i> Isolat <i>B. cereus</i>	59
Lampiran 7.	Hasil <i>Sequencing</i> Isolat <i>P. aeruginosa</i>	60
Lampiran 8.	Hasil BLAST <i>B. cereus</i>	63
Lampiran 9.	Hasil BLAST isolat <i>P. aeruginosa</i>	64
Lampiran 10.	Hasil Pohon Filogeni <i>B. cereus</i>	66
Lampiran 11.	Hasil Pohon Filogeni <i>P. aeruginosa</i>	67
Lampiran 12.	Hasil Optimasi dan Validasi Metode Analisis untuk Deteksi <i>B. cereus</i> dan <i>P. aeruginosa</i>	68

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Makanan dan minuman merupakan kebutuhan pokok bagi manusia yang berguna untuk pertumbuhan dan perkembangan fisik maupun otak. Makanan harus mempunyai jaminan keamanan dari cemaran-cemaran yang berbahaya, seperti cemaran biologi. Cemaran biologi khususnya bakteri patogen sering ditemukan pada makanan dengan tingkat kontaminasi bervariasi hingga mencapai 24-48% (Pracoyo, 2006). Hal ini menyebabkan makanan dapat menjadi perantara berbagai penyakit dan membahayakan kesehatan manusia.

Penyakit pada manusia yang ditularkan melalui makanan atau minuman yang tercemar disebut sebagai *foodborne disease* (Schmidt *et al.*, 2003). Bakteri merupakan salah satu mikroorganisme yang dapat mengkontaminasi makanan. *Bacillus cereus* (*B. cereus*) dan *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) merupakan contoh spesies bakteri yang dapat menimbulkan penyakit, seperti gangguan saluran pencernaan atau gejala kelainan neurologis (Herman *et al.*, 2015). Bakteri tersebut mengkontaminasi makanan kemudian masuk ke dalam tubuh melalui pencernaan.

Bakteri *B. cereus* dan *P. aeruginosa* mampu menghasilkan enterotoksin dan menyebabkan penyakit diare. Toksin yang dihasilkan *B. cereus* dan *P. aeruginosa* akan terakumulasi selama pertumbuhannya. Enterotoksin yang dihasilkan oleh *B. cereus* adalah *non-hemolitik* (Nhe), sedangkan *P. aeruginosa* menghasilkan eksotoksin A. Bakteri *P. aeruginosa* menimbulkan infeksi pada luka bakar dengan menghasilkan nanah hijau kebiruan dan bakteri tersebut dapat menyebar melalui makanan yang terkontaminasi oleh pekerja di rumah sakit yang kurang bersih dalam penanganan pasien dan makanan (Mayasari, 2005; Sudarwanto, 2011).

Deteksi bakteri patogen pada makanan umumnya dilakukan dengan metode konvensional yang berbasiskan pada reaksi biokimia. Metode konvensional

memerlukan serangkaian uji, yaitu uji morfologi, uji biokimia, dan perlu konfirmasi dengan uji serologi. Pengujian dengan metode konvensional dapat memakan waktu sehari-hari, sedangkan konsumsi makanan terus berlangsung dan perlu adanya suatu tindakan cepat untuk mendeteksi bahaya bakteri patogen dalam makanan. Oleh karena itu, perlu dilakukan deteksi yang mampu menganalisis faktor penyebab penyakit yang disebabkan oleh cemaran bakteri patogen secara cepat, sensitif, dan akurat.

Metode untuk mendeteksi bakteri patogen terus mengalami perkembangan teknologi untuk mengatasi kelemahan metode konvensional, seperti menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Teknik PCR telah diterima sebagai standar internasional untuk identifikasi bakteri patogen pada produk makanan sejak beberapa tahun terakhir (ISO 22174, 2005).

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan metode amplifikasi fragmen dari DNA *template* secara *in-vitro* untuk menghasilkan fragmen DNA yang identik (Pelt-Verkuil *et al.*, 2007). Salah satu faktor penting yang mempengaruhi keberhasilan amplifikasi dalam reaksi PCR yaitu ditentukan oleh ada atau tidaknya primer oligonukleotida yang menempel dan menyatu dengan DNA *template* (Aqzayunarsih, 2015). Primer akan menempel pada genom yang memiliki susunan basa nukleotida yang komplemen dengan susunan basa pada primer (Sunandar dan Imron, 2010).

Analisis PCR dengan primer spesifik merupakan langkah terbaik untuk mendeteksi bakteri patogen karena dapat menentukan secara cepat keberadaan gen target dan cukup sensitif (Aris, 2011). Selain basa nukleotida dan primer, keberhasilan amplifikasi dipengaruhi juga oleh volume dan konsentrasi komponen dalam reaksi PCR, seperti enzim DNA *polymerase*, konsentrasi DNA, konsentrasi primer, pereaksi *master mix/reagen* PCR, *buffer*, serta kondisi reaksi PCR.

Ketetapan primer, suhu *annealing*, dan jumlah siklus amplifikasi merupakan faktor-faktor utama pada kondisi PCR yang dapat mempengaruhi produk PCR (Ishmael dan Stellato, 2008). Adanya penggunaan PCR dengan kondisi yang tidak optimum akan menghasilkan produk yang tidak sesuai dengan produk target atau bahkan tidak menghasilkan produk PCR (Roux, 2009). Optimasi metode PCR

perlu dilakukan untuk efisiensi waktu dan penggunaan bahan, serta memastikan kondisi PCR dan penggunaan bahan dalam metode tersebut dapat memberikan hasil yang optimum dalam mendeteksi bakteri patogen pada makanan dengan cepat dan tepat (Joko *et al.*, 2011).

Selain melakukan optimasi, validasi metode juga diperlukan untuk memastikan bahwa hasil yang didapatkan dari metode optimum telah sesuai dengan tujuan penggunaannya dan data yang dihasilkan akurat (ISO 22118, 2011). Validasi metode sangat diperlukan karena beberapa alasan, yaitu validasi metode adalah persyaratan peraturan dan elemen penting dari kontrol kualitas, serta membantu memberikan jaminan bahwa pengukuran akan dapat diandalkan dalam beberapa bidang (Riyanto, 2014). Validasi metode analisis kualitatif molekuler berbasis PCR dilakukan dengan cara memastikan kondisi PCR yang digunakan mampu memberikan hasil yang spesifik untuk deteksi *B. cereus* dan *P. aeruginosa* (parameter spesifisitas), menentukan konsentrasi DNA terendah yang masih dapat terdeteksi melalui teknik PCR (parameter *Limit of Detection*), dan meminimalkan hasil negatif palsu dan positif palsu yang terjadi akibat kondisi reaksi amplifikasi belum optimum (parameter spesifisitas, selektivitas, tingkat positif palsu dan negatif palsu).

Data yang diperoleh dari hasil optimasi dan validasi dapat membuktikan bahwa pengujian dengan metode PCR tersebut memberikan hasil yang akurat dalam mendeteksi *B. cereus* dan *P. aeruginosa*. Oleh karena itu, hasil dari penelitian yang dilakukan untuk mendapatkan metode analisis kualitatif molekuler yang optimum untuk mendeteksi cemaran *B. cereus* dan *P. aeruginosa* pada makanan maupun minuman.

B. Perumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah bagaimana mendeteksi bakteri *B. cereus* dan *P. aeruginosa* dengan melakukan optimasi dan validasi metode PCR, sehingga dapat dijadikan metode analisis baku yang digunakan untuk pengujian makanan.

C. Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan kondisi optimum dalam mendeteksi *B. cereus* dan *P. aeruginosa* dengan melakukan optimasi secara kualitatif molekuler berbasis PCR dan mendapatkan validitas dari metode tersebut atau membuktikan kinerja metode analisis yang akan digunakan.

D. Manfaat

Manfaat dari penelitian ini yaitu mendapatkan metode secara kualitatif molekuler berbasis PCR yang telah tervaliditas sehingga memberikan hasil pengujian *B. cereus* dan *P. aeruginosa* secara cepat dan tepat dan metode tersebut dapat digunakan untuk deteksi *B. cereus* dan *P. aeruginosa* pada makanan ataupun minuman.

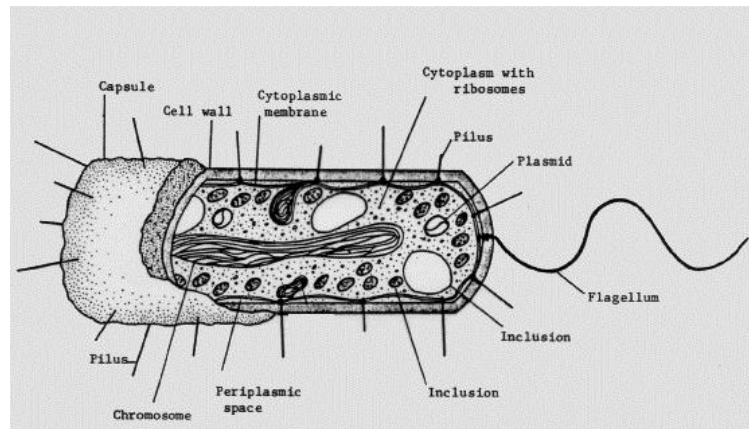
BAB II

KAJIAN PUSTAKA

1. Bakteri

Pangan merupakan kebutuhan esensial yang berguna untuk memulihkan dan memperbaiki jaringan tubuh yang rusak, mengatur proses di dalam tubuh, perkembangbiakan, dan menghasilkan energi untuk kepentingan berbagai metabolisme (Tharir *et al.*, 2005). Kerusakan makanan dapat disebabkan oleh cemaran biologi (bakteri patogenik, parasit, cacing, virus, kapang/cendawan, dan riketsia), kimiawi (mikotoksin, cemaran logam berat, dan residu antibiotika), fisika (serpihan kaca, potongan kayu, logam, batu, rambut, benang, dll), atau lainnya yang dapat mengganggu, merugikan, dan membahayakan kesehatan (Schmidt *et al.*, 2003; Bahri *et al.*, 2005).

Bakteri merupakan salah satu penyebab kerusakan makanan yang ditemukan dimana saja baik di tanah, air, udara, maupun proses pengolahan. Bakteri adalah salah satu golongan organisme prokariotik yaitu tidak mempunyai selubung inti, berkembang biak dengan cara membelah diri, dan bahan-bahan genetiknya tidak terbungkus dalam membran inti. Bakteri memiliki ukuran diameter antara 0,5-1,0 μ m dan panjang 2,0-5,0 μ m, dan terdiri dari tiga bentuk dasar yaitu bentuk bulat atau kokus, batang atau basil, dan spiral (Dwidjoseputro, 1985). Bakteri memiliki dua pembagian struktur, yaitu struktur dasar yang dimiliki oleh hampir semua jenis bakteri meliputi: dinding sel, membran plasma, sitoplasma, ribosom, DNA, serta granula penyimpanan dan struktur tambahan yang dimiliki oleh jenis bakteri tertentu meliputi: kapsul, flagelum, pilus (pili), klorosom, vakuola gas dan endospora, seperti pada Gambar 1 (Soemarno, 2000).



Gambar 1. Gambaran umum struktur sel bakteri (Todar, 2012).

Dinding sel pada bakteri mengandung kompleks karbohidrat dan protein yang disebut peptidoglikan. Berdasarkan komposisi dinding sel serta sifat pewarnaannya bakteri dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu bakteri Gram positif dan Gram negatif (Yuwono, 2002). Bakteri Gram positif adalah bakteri yang mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan gram sehingga akan berwarna ungu bila di lihat di bawah mikroskop. Perbedaan ini dapat ditentukan dengan prosedur pewarnaan gram yang ditemukan oleh ilmuwan Denmark bernama Christian Gram dan merupakan prosedur penting dalam klasifikasi bakteri (Jawetz, *et al.*, 2005). Salah satu bakteri Gram positif adalah *Bacillus cereus*. Bakteri Gram negatif merupakan bakteri yang tidak mampu mempertahankan warna kristal violet pada dinding selnya saat perwarnaan gram (Radji, 2006). *Pseudomonas aeruginosa* merupakan salah satu bakteri Gram negatif.

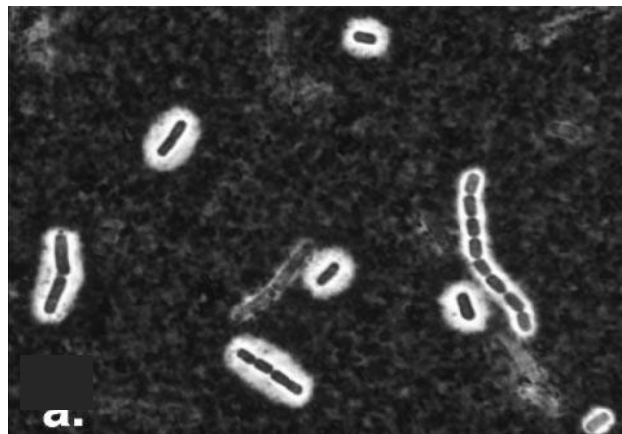
Perbedaan antara bakteri Gram positif dan Gram negatif terletak pada susunan kimia dinding selnya. Bakteri Gram positif dinding sel tersusun atas peptidoglikan yang cukup banyak dan komponen-komponen khusus berupa asam-asam teikhoat dan teikhuronat serta polisakarida. Sebaliknya, dinding sel bakteri Gram negatif tersusun atas sedikit peptidoglikan dan selaput luar yang mengandung tiga polimer yaitu lipoprotein, fosfolipida, dan lipopolisakarida (Pelczar dan Chan, 2008).

Bakteri sebagai makhluk hidup memiliki informasi genetik berupa DNA, tapi tidak terlokalisasi dalam tempat khusus (nukleus). DNA pada bakteri berbentuk

sirkuler, panjang, dan biasa disebut nukleoid. DNA bakteri tidak memiliki intron dan hanya tersusun atas ekson. Bakteri juga memiliki DNA ekstrakromosomal yang tergabung menjadi plasmid yang berbentuk kecil dan sirkuler (Mims *et al.*, 1998).

2. *Bacillus cereus*

Bakteri *Bacillus cereus* secara luas diketahui penyebab keracunan makanan yang kadang-kadang dapat menjadi patogen oportunistik, yaitu memanfaatkan kerusakan pada mekanisme pertahanan inang untuk memulai infeksi (Arnesen *et al.*, 2008). *Bacillus cereus* merupakan bakteri yang berbentuk batang (Gambar 1), tergolong Gram positif, dapat membentuk endospora, bersifat aerobik, dan fakultatif anaerob (Vilain *et al.*, 2006). Struktur selnya terdiri dari membran dalam dan peptidoglikan tebal yang berfungsi untuk mempertahankan bentuk (Ticknor *et al.*, 2001).



Gambar 2. Morfologi *B. cereus* (Sue *et al.*, 2006)

Terdapat dua tipe toksin yang dihasilkan *B. cereus*, yaitu tipe pertama enterotoksin yang menyebabkan diare, yaitu toksin yang mengandung protein dengan berat molekul sebesar 38-39 kDa, akan hancur pada suhu 56⁰C selama 5 menit (tidak tahan panas) dan biasanya timbul pada produk pangan nabati dan makanan siap saji bila dikonsumsi oleh manusia dalam jumlah 10⁵-10⁷ sel/gram (Soejoedono, 2002). Toksin tipe kedua yaitu enterotoksin yang menyebabkan muntah/emesis, yaitu toksin yang mengandung peptida dengan berat molekul <10 kDa, relatif tahan panas karena tidak hancur pada suhu yang mencapai 120⁰C

selama 1 jam dan dapat ditemukan pada nasi, susu, beserta produknya bila dikonsumsi oleh manusia dalam jumlah 10^5 - 10^8 sel/gram (Harmon *et al.*, 1992; Paweli, 2015). *Bacillus cereus* menghasilkan satu toksin emetis (ETE) dan tiga enterotoksin yang berbeda, yaitu HBL (menyebabkan hemolisis), Nhe (tidak menyebabkan hemolisis), dan EntK (protein komponen tunggal yang belum terbukti terlibat dalam keracunan makanan) (Todar, 2011).

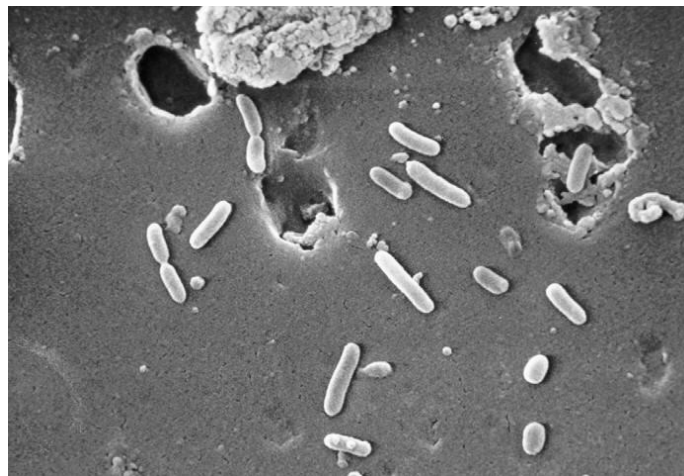
Enterotoksin *non-hemolitik* (Nhe) adalah salah satu enterotoksin yang menyebabkan diare pada keracunan makanan *B. cereus*. Pangan yang mengandung $\geq 10^5$ sel atau spora per gram tidak aman untuk dikonsumsi karena dosis infeksi diperkirakan berkisar antara 10^5 - 10^8 sel atau spora per gram. Gejala yang ditimbulkan antara lain gangguan saluran pencernaan berupa sakit perut dan diare tipe sedang (Fatmasari, 2015).

Keracunan makanan dapat terjadi jika makanan dibiarkan terlalu lama pada suhu kamar. Bakteri penyebab keracunan makanan dapat ditemukan di makanan dan dalam kondisi yang tepat, satu bakteri dapat berkembang menjadi lebih dari 2 juta bakteri hanya dalam kurun waktu 7 jam (WHO, 2015). Spora bakteri pada makanan yang terkontaminasi setelah perlakuan panas, tumbuh dengan baik setelah pendinginan dan merupakan sumber dari keracunan makanan. *Bacillus cereus* membentuk spora ketika nutrisi yang ada dalam lingkungan kurang dan berkecambah menjadi sel vegetatif ketika nutrisi tersedia dalam lingkungan (Wijnands *et al.*, 2006). *Bacillus cereus* dapat menyebar dengan mudah ke berbagai jenis makanan seperti tanaman, telur, daging, dan produk susu, dan menyebabkan 2-5% dari intoksikasi kerusakan makanan karena sekresi racun emetik dan enterotoksin.

Gejala keracunan yang disebabkan oleh pangan yang sudah terkontaminasi *B. cereus* dapat terjadi dalam jangka waktu 4-6 jam, berupa mual, muntah (lebih dari 24 jam), diare, hilangnya nafsu makan, kram perut hebat, distensi abdominal, demam ringan dan pada beberapa kasus yang berat dapat timbul sakit kepala, kram otot, dan perubahan tekanan darah (BPOM, 2014).

3. *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri *P. aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif yang sering kali menjadi penyebab infeksi dengan ciri khasnya berbentuk batang, motil, dan berukuran 0,6 x 2 mm (Gambar 2). Bakteri tersebut dapat tumbuh dengan baik pada suhu 37-42⁰C. Bakteri ini memiliki kecenderungan hidup di lingkungan yang lembab mudah ditemukan di air, tanah, tanaman, buah-buahan, sayur-sayuran.



Gambar 3. Morfologi *P. aeruginosa* (CDC, 2016)

Bakteri *P. aeruginosa* termasuk kelompok *Pseudomonas* dan tergolong kelompok patogen terbesar yang dapat menimbulkan penyakit pada manusia, kadang membentuk koloni dalam tubuh manusia. Bakteri tersebut bersifat invasif dan toksigenik sehingga menyebabkan infeksi dan merupakan patogen nosokomial pada pasien dengan daya tahan tubuh yang rendah (Brooks *et al.*, 2007).

Bakteri *P. aeruginosa* memproduksi enterotoksin yang menyebabkan terjadinya mual, muntah, dan diare (Dzen *et al.*, 2003). Eksotoksin A yang dihasilkan *P. aeruginosa* dapat menghambat sintesis protein eukaryotik dengan cara mengkatalisis pemindahan sebagian ADP-ribosil dari NAD (nicotinamide adenine dinucleotida) kepada EF-2 (*elongation factor 2*). Hasil dari kompleks ADP-ribosil-EF-2 adalah inaktivasi sintesis protein sehingga mengacaukan fungsi fisiologik sel normal (Mayasari, 2005). Bakteri *P. aeruginosa* menjadi patogenik hanya jika berada pada tempat dengan daya tahan tidak normal, misalnya

menempel dan menyerang selaput lendir atau kulit yang rusak akibat kerusakan jaringan, menyebar dari tempat tersebut dan berakibat penyakit sistemik.

4. Deteksi Bakteri Menggunakan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan metode molekuler dengan menggunakan reaksi enzimatik untuk amplifikasi DNA secara *in vitro*. PCR digunakan untuk mengamplifikasi jumlah molekul DNA pada *template* tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target melalui bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu *thermocycle* (Vivikananda, 2014).

Teknik PCR sangat sensitif, dapat menggandakan sampai lebih dari sejuta kali sehingga menghasilkan DNA dalam jumlah yang sangat banyak. Oleh karena itu, teknik ini hanya membutuhkan DNA *template* dalam jumlah kecil. Komponen-komponen yang dibutuhkan untuk proses PCR menurut Gaffar (2007), Sulistyaningsih (2007), dan Yusuf (2007), antara lain:

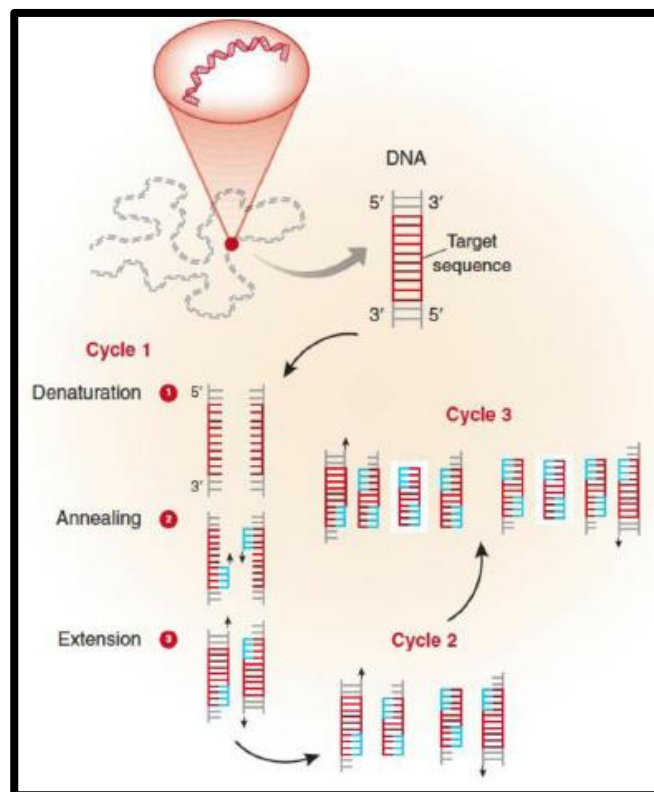
- 1) DNA *template* adalah molekul DNA untai ganda yang mengandung urutan/*sequence* target yang akan diamplifikasi. Ukuran DNA bukan merupakan faktor utama keberhasilan PCR, berapa pun panjangnya jika tidak ada *sequence* yang diinginkan maka tidak akan berhasil proses suatu PCR, namun sebaliknya jika ukuran DNA tidak terlalu panjang tapi mengandung *sequence* yang diinginkan maka PCR akan berhasil (Sulistyaningsih, 2007). DNA *template* yang digunakan sebaiknya berkisar antara 105-106 molekul, karena terdapat dua hal penting pada *template*, yaitu kemurnian dan kuantitas atau konsentrasi (Yusuf, 2010)
- 2) Primer yaitu suatu potongan atau *sequence* dari oligonukleotida pendek yang digunakan untuk mengawali sintesis DNA. Pasangan primer terdiri dari dua oligonukleotida yang memiliki 18-28 nukleotida dan mempunyai 45-60% *GC content* (Yusuf, 2010). Spesifisitas PCR sangat tergantung pada suhu *melting* (*T_m*) primer, yaitu suhu yang diperlukan oleh primer untuk mengalami disosiasi/lepas ikatan. Konsentrasi primer biasanya optimal pada 0,1-0,5 μM , jika konsentrasi primer terlalu tinggi akan menyebabkan *mispriming*

(penempelan pada tempat yang tidak spesifik) dan akumulasi produk *non*-spesifik serta meningkatkan kemungkinan terbentuknya primer-dimer, sebaliknya bila konsentrasi terlalu sedikit maka PCR menjadi tidak efisien sehingga hasilnya rendah (Sulistyaningsih, 2007).

- 3) Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP. dNTP mengikat ion Mg^{2+} sehingga dapat mengubah konsentrasi efektif ion dan ini yang diperlukan untuk reaksi polimerase (Yusuf, 2010). Konsentrasi dNTP masing-masing sebesar 20-200 μ M dapat menghasilkan keseimbangan optimal antara hasil, spesifisitas, dan ketepatan PCR. Konsentrasi dNTP yang rendah akan meminimalkan *mispriming* pada daerah *non*-target dan menurunkan kemungkinan perpanjangan nukleotida yang salah. Oleh karena itu, spesifisitas dan ketepatan PCR meningkat pada konsentrasi dNTP yang lebih rendah (Sulistyaningsih, 2007).
- 4) Enzim *Taq* DNA *polymerase* yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Biasanya enzim *Taq* DNA *polymerase* yang memiliki keaktifan pada suhu yang tinggi sehingga penambahan enzim tidak perlu dilakukan pada setiap siklus dan proses PCR dapat dilakukan dalam satu mesin (Gaffar, 2007). Enzim *Taq* *polymerase* tahan terhadap pemanasan berulang-ulang karena akan membantu melepaskan ikatan primer yang tepat dan meluruskan wilayah yang mempunyai struktur sekunder (Yusuf, 2010).
- 5) Larutan *buffer* yang biasanya digunakan untuk reaksi PCR mengandung 10-50 mM Tris-HCl pH 8,3-8,8 (suhu 20^oC); 50 mM KCl; 0,1% gelatin atau BSA (Bovine Serum Albumin); Tween 20 sebanyak 0,01% atau dapat diganti dengan Triton X-100 sebanyak 0,1%; disamping itu perlu ditambahkan 1,5 mM $MgCl_2$ (Yusuf, 2010).

Reaksi PCR melibatkan banyak siklus yang masing-masing terdiri dari tiga tahap berurutan, berikut ini merupakan tahapan yang terjadi pada proses PCR menurut Degen *et al.* (2006), antara lain:

- (1) Denaturasi (minimal suhu 90°C) adalah tahapan untuk memisahkan untai ganda DNA menjadi dua untai tunggal. Ikatan hidrogen antara satu untai dengan untai lainnya menjadi lemah dan rusak pada suhu tinggi.
- (2) *Annealing* (suhu 40°C - 65°C) adalah penempelan primer pada urutan DNA yang ditargetkan. Umumnya urutan target DNA memiliki panjang 100-35000 pasang basa (pb), sedangkan primer hanya memiliki panjang 20-30 basa. Namun, primer ini dapat menempel pada urutan target yang spesifik dan mirip dengan susunan nukleotida pada primer.
- (3) Elongasi (suhu 72°C) adalah pemanjangan urutan target oleh enzim DNA polimerase hingga posisi target yang diinginkan. DNA polimerase ini akan memulai sintesis molekul DNA baru secara identik sama dengan DNA target. Proses ini dibantu dengan nukleotida bebas yang telah tersedia di dalam campuran (dNTPs).



Gambar 4. Siklus PCR (Garibyan *et al.*, 2014)

Keterbatasan utama dari setiap pengujian PCR adalah dengan menggunakan desain primer, munculnya DNA kontrol negatif (reaksi negatif palsu) yang signifikan karena hibridisasi yang kurang, inhibitor dalam PCR, dan tidak berhasilnya ekstraksi DNA bakteri. Namun, faktor yang paling penting dalam analisis molekuler dengan menggunakan teknik PCR adalah target harus universal dalam distribusi target spesies dan keharusan variasi *sequence* yang cukup (Stasiak *et al.*, 2009).

5. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan teknik pemisahan molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik (Westermeier, 2004). Media yang umum digunakan adalah gel agarose. Elektroforesis gel agarose digunakan untuk memisahkan fragmen DNA yang berukuran lebih besar dari 100 bp dan dijalankan secara horizontal (Gaffar, 2007). Konsentrasi gel agarosa yang digunakan untuk elektroforesis harus disesuaikan dengan panjang *amplicon* yang diharapkan.

Pengaturan kapilaritas gel elektroforesis akan meningkatkan resolusi analisis hasil PCR secara signifikan, hal ini menyebabkan terjadinya pemisahan molekul DNA berdasarkan ukuran molekul secara sempurna (Lo *et al.*, 2006). Faktor-faktor yang menentukan jarak migrasi DNA melalui gel agarose (Sambrook dan Russel, 2001), antara lain:

- 1) Ukuran molekul DNA, molekul yang besar berpindah lebih lambat karena membutuhkan usaha yang besar dan kurang efisien melewati pori-pori dibandingkan dengan molekul yang kecil.
- 2) Konsentrasi agarose, fragmen DNA linear memberikan jarak perpindahan yang berbeda melalui gel yang mengandung konsentrasi yang berbeda.

Tabel 1. Ukuran pemisahan molekul DNA linear pada standar gel agarose

Konsentrasi Agarose (%) [w/v]	Jarak Pemisahan DNA Linear (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10

Konsentrasi Agarose (%) [w/v]	Jarak Pemisahan DNA Linear (kb)
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

- 3) Konformasi DNA, DNA bentuk I (*superhelical circular*), bentuk II (*nicked circular*), dan bentuk III (linear) berpindah melalui gel agarosa pada jarak yang berbeda. Pergerakan relatif dari ketiga bentuk utamanya bergantung pada konsentrasi dan tipe agarosa yang digunakan, selain itu dipengaruhi juga oleh kekuatan arus listrik yang digunakan, kekuatan *buffer* ionik dan bentuk *superhelical* dari DNA bentuk I.
- 4) Voltase yang digunakan, perpindahan molekul DNA di dalam gel dirangsang oleh arus listrik yang mengalir dari kutub negatif menuju kutub positif. Voltase yang rendah dan DNA linear mengalami perpindahan secara proporsional. Semakin besar tegangan arus listrik, maka perpindahan molekul DNA semakin cepat, demikian pula sebaliknya.
- 5) Tipe agarosa, terdapat dua tipe utama dari agarosa yaitu agarosa standar dan agarosa pada suhu rendah (*low-melting temperature*).
- 6) *Buffer* elektroforesis, mobilitas elektroforesis DNA dipengaruhi oleh komposisi dan kekuatan ionik *buffer* elektroforesis.

6. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi syarat untuk penggunaannya (Harmita, 2006). Menurut ISO/IEC 17025 (2005), validasi adalah konfirmasi melalui pengujian dan pengadaan bukti yang objektif bahwa persyaratan tertentu untuk suatu maksud terpenuhi.

Validasi metode analisis bertujuan untuk membuktikan bahwa semua metode analisis yang digunakan dalam pengujian maupun pengawasan mutu senantiasa mencapai hasil yang diinginkan secara konsisten (Priyambodo, 2007). Penentuan

validasi metode mikrobiologi secara kualitatif molekuler dengan menggunakan metode yang memenuhi persyaratan yang telah ditentukan dan sesuai dengan tujuan penggunaannya dan diperolehnya data yang valid. Suatu metode analisis dikatakan absah jika telah memenuhi syarat keberterimaan parameter validasi. Parameter yang dimaksud yaitu spesifisitas, *limit of detection* (LOD), tingkat positif palsu, tingkat negatif palsu.

- 1) Spesifisitas merupakan kemampuan metode PCR untuk membedakan antara target *sequence* dengan organisme lain. Terdapat banyak faktor yang dapat mempengaruhi spesifisitas metode PCR seperti desain primer; degenerasi primer; kehadiran asam nukleat heterolog yang berasal dari sampel; jumlah total asam nukleat dalam eksperimen PCR; kualitas asam nukleat diekstrak; kondisi amplifikasi PCR seperti komposisi penyangga, konsentrasi primer, dan parameter siklus termal; efek matriks seperti kotoran hasil ekstraksi yang dapat menyebabkan penghambatan; spesifik fragmen amplifikasi, dan kualitas sampel referensi yang tersedia (USEPA, 2009).
- 2) LOD (*Limit of Detection*) adalah konsentrasi terendah dari mikroorganisme dalam contoh yang dapat terdeteksi, tetapi tidak dihitung sebagai nilai yang sebenarnya, di bawah kondisi pengujian yang disepakati (ISO 16140, 2003). LOD dinyatakan dalam konsentrasi DNA terendah dalam sampel yang dapat di deteksi. Pengukuran LOD membangun nilai deteksi awal di bawah kondisi yang optimal. Metode kultur biasanya diharapkan mampu mendeteksi sasaran organisme tunggal dalam sampel besar, di mana tidak ada organisme lain yang terdeteksi, hasilnya dilaporkan sebagai <1 organisme per volume sampel atau massa (USEPA, 2009).
- 3) Tingkat negatif palsu, yaitu hasil positif ketika target *sequence* tidak terdeteksi atau terdeteksi dalam jumlah yang kurang dari batas (FDA, 2015).
- 4) Tingkat positif palsu, yaitu hasil negatif ketika target *sequence* terdeteksi (FDA, 2015).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Agustus 2016-April 2017 di Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Pusat Riset Obat dan Makanan (PROM), BPOM, Jl. Percetakan Negara No. 23, Jakarta Pusat.

B. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Parameter yang diamati meliputi pertumbuhan *B. cereus* dan *P. aeruginosa* pada media selektif, optimasi dan validasi metode analisis bakteri secara kualitatif PCR, serta melakukan pengujian pada isolat pangan dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pusat Riset Obat dan Makanan (PROM). Isolat yang digunakan untuk optimasi dan validasi metode analisis adalah *B. cereus* ATCC 11778 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853 dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pusat Riset Obat dan Makanan (PROM).

1. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Laminar Air Flow* (Vision), autoklaf, inkubator (*Shel Lab*), *waterbath*, *refrigerated centrifuge*, *Nanodrop Spectrophotometer (BioDrop TOUCH)*, *submarine electrophoresis system* Advanced Mupid®-exU, *Thermo-Shaker* untuk microtubes, *PCR Thermal Cycler*, timbangan analitik (*Sartorius*), *hot plate (Barnstead Thermolyne)*, vortex (*Barnstead Thermolyne*), *dry block heating thermostat* Biosan Bio TDB-100, *Deep freezer*, jarum ose, bunsen, mikropipet (*Eppendorf*), dan peralatan gelas lainnya. Bahan habis pakai antara lain, ose *sterile disposable*, aluminium foil, *Eppendorf tips*, tabung mikrosentrifus (*Eppendorf*), *micro tube*, *PCR-tube*

Media dan pereaksi yang digunakan *Mannitol Egg Yolk Polymyxin* (MYP) agar, *Pseudomonas Agar Base* (PAB) agar, *Xylose Lysine Deoxycholate Agar* (XLDA), *Eosin Metylen Blue Agar* (EMBA), *Mannitol Salt Agar* (MSA),

PALCAM Agar Base, *Thiosulfate citrate bile salts sucrose* (TCBS) Agar, Nutrient Broth (NB), *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA), Gliserol 1%, *Pseudomonas CN Supplement*, *Polymyxin B Supplement*, PALCAM *Selective Supplement*, Natrium klorida (NaCl) 0,85%, akuades steril, alkohol 70%, agarose (1st base), DNA Ladder 100 bp (100bp-3000bp) (*Gene aid*), Florosafe DNA Stain (1st base Tris Borat EDTA (TBE) 0,5x untuk *B. cereus* dan Tris Borat EDTA (TBE) 1x untuk *P. aeruginosa*, PCR Master Mix, dan pasangan primer untuk *B.cereus* dan *P. aeruginosa* sesuai dengan Tabel 2.

Tabel 2. Primer untuk *B. cereus* dan *P. aeruginosa*

Bakteri	Primer	Target	Sekuens DNA (5'-3')	Target Sekuens (bp)	Referensi
<i>B. cereus</i>	BCFomp1 (Forward)	Gen <i>motB</i>	ATC GCC TCG TTG GAT GAC GA	575	Stasiak <i>et al.</i> , 2009
	BCRomp1 (Reverse)		CTG CAT ATC CTA CCG CAG CTA		
<i>P.aeruginosa</i>	PA-SS-F (Forward)	Gen 16 rRNA	GGG GGA TCT TCG GAC CTC A	956	Afifi <i>et al.</i> , 2013
	PA-SS-R (Reverse)		TCC TTA GAG TGC CCA CCC G		

2. Cara Kerja

Cara kerja dalam penelitian ini meliputi 5 (lima) tahapan kerja, yaitu :

a. Peremajaan dan Purifikasi Kultur Bakteri

Isolat bakteri yang digunakan merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pusat Riset Obat dan Makanan (PROM) dan Balai-POM. Bakteri *B. cereus* ATCC 11778 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853, serta bakteri pembanding lainnya di inokulasi 2-3 ose ke dalam media *Nutrient Broth* (NB), dihomogenkan dengan menggunakan vortex, kemudian diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24 jam. Isolat bakteri umur 24 jam di inokulasi pada masing-masing media selektif (Tabel 3) dengan menggunakan teknik *streak plate* untuk pengecekan kemurnian kultur

dan diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24 jam. Berdasarkan tipikal koloni pada Tabel 3 dan Tabel 4, masing-masing bakteri *B. cereus* ATCC 11778 dan *P.aeruginosa* ATCC 27853, serta bakteri pembanding lainnya di inokulasi 1 ose dan digores pada media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) untuk di perbanyak.

Tabel 3. Media selektif untuk *B. cereus* ATCC 11778 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Media	Kontrol Positif	Koloni Tipikal
<i>Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) Agar</i>	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	Merah muda dikelilingi daerah keruh
<i>Pseudomonas Agar Base (PAB)</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Krim-kuning dengan pigmentasi kehijauan

Tabel 4. Media selektif untuk bakteri pembanding.

Media	Bakteri Pembanding	Koloni Tipikal
<i>Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLDA)</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Translucent</i> dengan bintik hitam di tengahnya
<i>Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLDA)</i>	<i>Shigella sonnei</i>	Merah
<i>Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) Agar</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Kuning
<i>Eosin Metylen Blue Agar (EMBA)</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , EHEC	Hijau metalik
<i>Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) Agar</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	Kuning
<i>Mannitol Salt Agar (MSA)</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Kuning
<i>Mannitol Salt Agar (MSA)</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Merah muda
<i>PALCAM Agar Base</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Abu-abu hijau dikelilingi halo

b. Ekstraksi DNA

Masing-masing kultur murni bakteri umur 24 jam di ambil 1-2 ose dari media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) ke dalam *microtube* (1,5 ml) steril yang berisi 500 µL NaCl 0,85% untuk di ekstraksi DNA-nya, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Teknik *boiling* (pendidihan) dilakukan dengan cara

perebusan selama 15 menit dalam suhu 100⁰C (ISO 20837, 2006), kemudian dimasukkan ke dalam *freezer* selama 2 menit sebagai *cold shock*. Suspensi tersebut disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam *microtube* (1,5 ml) steril yang baru.

Supernatan DNA diukur absorbansinya dengan menggunakan *Nanodrop Spectrophotometer (BioDrop TOUCH)* pada panjang gelombang 260 dan 280, sehingga dapat diketahui konsentrasi DNA dengan tingkat kemurnian 1,8-2,0. Supernatan DNA yang diperoleh digunakan sebagai DNA *template* pada reaksi PCR.

c. Optimasi Metode PCR

1) Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu *Annealing*

1.a). *Bacillus cereus* ATCC 11778

Amplifikasi PCR dilakukan dengan volume akhir 25 µL yang terdiri dari *Nuclease Free Water* (NFW), primer (BCFomp1 dan BCRomp1) dengan gradien konsentrasi primer (10 µM; 20 µM; 30 µM; 40 µM; 50 µM) untuk mendapatkan konsentrasi primer yang tepat, *GoTaq Green Master Mix* (Promega, Madison, USA), dan DNA (Tabel 5). *GoTaq Green Master Mix* adalah campuran reaksi yang siap pakai dan telah mengandung enzim *Taq DNA Polymerase*, dNTPs, MgCl₂, dan *buffer* reaksi (Hidayat *et al.*, 2014).

Tabel 5. Komposisi Reaksi PCR

Bahan	Volume
NFW	9 µl
BCFomp1 (Forward)	0,5 µl
BCRomp1 (Reverse)	0,5 µl
<i>Go Taq Green</i>	12,5 µl
DNA	2,5 µl
Total	25 µl

Kondisi PCR yang digunakan sesuai protokol PCR Stasiak *et al.*, (2009) terdiri dari 35 siklus dengan mengamplifikasi gen *motB* (motility B protein) yaitu pra–denaturasi (94°C, selama 2 menit), denaturasi (94°C, selama 1 detik), *annealing* (55-58°C, selama 1 menit), elongasi (72°C, selama 2 menit),

kemudian dilanjutkan dengan *final extention* pada suhu 72°C selama 5 menit. Optimasi suhu *annealing* pada kondisi PCR dilakukan dengan pembuatan gradien suhu, yaitu 55°C-58°C. Hasil yang diperoleh dari deteksi *B. cereus* ATCC 11778 secara molekuler adalah produk PCR.

1.b). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Amplifikasi PCR dilakukan dengan volume akhir 25 µL yang terdiri dari *Nuclease Free Water* (NFW), primer (PA-SS-F dan PA-SS-R) dengan gradien konsentrasi primer (5 µM; 10 µM; 15 µM; 20 µM; 25 µM) untuk mendapatkan konsentrasi primer yang tepat, *GoTaq Green Master Mix* (Promega, Madison, USA), dan DNA (Tabel 6).

Tabel 6. Komposisi Reaksi PCR

Bahan	Volume
NFW	9 µl
PA-SS-F (Forward)	0,5 µl
PA-SS-R (Reverse)	0,5 µl
<i>Go Taq Green</i>	12,5 µl
DNA	2,5 µl
Total	25 µl

Kondisi PCR yang digunakan sesuai protokol PCR Afifi *et al.*, (2013) terdiri dari 25 siklus untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA, yaitu pra-denaturasi (95°C, selama 2 menit), denaturasi (94°C, selama 20 detik), *annealing* (57-60°C, selama 20 detik), elongasi (72°C, selama 40 detik). Kemudian dilanjutkan dengan *final extention* pada suhu 72°C selama 1 menit. Optimasi suhu *annealing* pada kondisi PCR dilakukan dengan pembuatan gradien suhu, yaitu 57°C-60°C. Hasil yang diperoleh dari deteksi *P.aeruginosa* ATCC 27853 secara molekuler adalah produk PCR.

2) Visualisasi Produk PCR

Elektroforesis diawali dengan melarutkan agarose 1,5% hingga mendidih dan larut sempurna, kemudian didinginkan hingga suhu larutan agar mencapai sekitar 50°C, ditambahkan *fluorosafe* sebanyak 4-6 µL per 100 mL dan diaduk hingga

homogen. Agarose yang telah larut dituang ke dalam cetakan elektroforesis yang sudah terpasang (*comb*) sisir dengan posisi tegak lurus dalam cetakan dan dibiarkan hingga memadat.

Larutan TBE 0,5X untuk *B. cereus* dan TBE 1X untuk *P. aeruginosa* dituang ke dalam wadah elektroforesis sampai tanda tera. Gel agarosa yang sudah memadat diletakkan ke dalam tempat elektroforesis sehingga terendam dalam larutan TBE. Produk PCR dimasukkan sebanyak 10 μ L ke dalam sumur yang terdapat pada gel agarosa secara perlahan-lahan agar sumur tidak bocor. DNA marker yang digunakan adalah DNA *Ladder* 100 bp sebanyak 5 μ L. Elektroforesis dilakukan selama \pm 60 menit dengan tegangan 70 volt. Proses elektroforesis dihentikan bila warna kuning hampir mendekati batas bawah agar. Hasil elektroforesis diamati dan didokumentasikan dengan menggunakan *Molecular Imager Gel Doc XR System* (Bio-Rad) untuk mengetahui ukuran fragmen DNA.

d. Validasi Metode Secara Molekuler

1) *Limit of Detection* (LOD)

Limit of detection (LOD) dengan melakukan pengenceran DNA kontrol positif (*B. cereus* ATCC 11778 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853) sampai pita DNA tidak dapat diamati di gel elektroforesis, untuk menentukan konsentrasi DNA terendah dari *B. cereus* dan *P. aeruginosa*. Setelah itu, melakukan amplifikasi PCR dan elektroforesis sesuai cara kerja amplifikasi DNA bakteri dengan menggunakan PCR dan visualisasi produk PCR dengan menggunakan teknik elektroforesis. Pita dari konsentrasi DNA terkecil yang masih dapat diamati merupakan *Limit of Detection* (LOD). Penentuan *Limit of Detection* (LOD) dilakukan sebanyak 10x pengulangan.

2) Penentuan Spesifisitas

Spesifisitas bertujuan untuk mengetahui metode analisis yang dikembangkan apakah spesifik membedakan pita DNA target dengan DNA bakteri lainnya. Bakteri *B. cereus* ATCC 11778 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853 sebagai bakteri kontrol positif, sedangkan bakteri kontrol negatif yang digunakan adalah *Bacillus*

subtilis, *Escherichia coli*, EHEC, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella sonnei*, dan *Listeria monocytogenes*. Bakteri-bakteri tersebut diisolasi DNA nya menggunakan teknik *boiling* dan dilakukan amplifikasi DNA dengan teknik PCR menggunakan primer BCFomp1/BCRomp1 (deteksi *B. cereus*) dan PA-SS-F/PA-SS-R (deteksi *P. aeruginosa*), serta visualisasi produk PCR dengan teknik elektroforesis.

Pita yang terbentuk diamati dengan kriteria keberterimaan, yaitu tidak ada pita DNA bakteri kontrol negatif yang terbentuk pada posisi yang sama dengan kontrol positif *B. cereus* ATCC 11778 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853. Primer yang spesifik terhadap deteksi *B. cereus* dan *P. aeruginosa* akan dianalisis dengan program BLAST.

3) Penentuan Sensitivitas, Spesifisitas, Positif Palsu dan Negatif Palsu

Penentuan ini dengan melakukan pengenceran DNA terlebih dahulu sesuai dengan Tabel 7 dan 8. Setelah itu, dilakukan amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR dan visualisasi produk PCR dengan teknik elektroforesis. Bakteri yang digunakan dalam penentuan ini adalah *B. cereus* ATCC 11778 dan *P.aeruginosa* ATCC 27853 sebagai kontrol positif, *E. coli* ATCC 25922 sebagai kontrol negatif, serta tanpa penambahan bakteri dalam larutan pengencer NaCl 0,85%.

Tabel 7. Kondisi validasi metode untuk *B. cereus*

Jenis Bakteri	Jumlah Ulangan	Konsentrasi DNA (ng)	Keterangan
Kontrol positif	10	50, 40, 30, 20, 10	50 positif
Kontrol negatif	5	50, 40, 30, 20, 10	25 negatif
Tanpa bakteri	15	-	15 negatif

Tabel 8. Kondisi validasi metode untuk *P. aeruginosa*

Jenis Bakteri	Jumlah Ulangan	Konsentrasi DNA (ng)	Keterangan
Kontrol positif	10	50, 40, 30, 20, 10	50 positif
Kontrol negatif	5	50, 40, 30, 20, 10	25 negatif
Tanpa bakteri	15	-	15 negatif

Tabel 9. Perhitungan hasil PCR untuk validasi metode

Respon	Jumlah Presumtif		
	+	-	
Terkonfirmasi (+)	a	b	a + b
Terkonfirmasi (-)	c	d	c + d
	a + c	b + d	n

Keterangan :

a = jumlah presumptive positif terkonfirmasi positif

b = jumlah presumptive negatif terkonfirmasi positif

c = jumlah presumptive positif terkonfirmasi negatif

d = jumlah presumptive negatif terkonfirmasi negatif

n = jumlah keseluruhan uji

Parameter Validasi

1. Sensitivitas = $a/(a+b)$ (kriteria keberterimaan $\geq 70\%$)
2. Spesifisitas = $d/(c+d)$ (kriteria keberterimaan $\geq 70\%$)
3. Tingkat positif palsu = $c/(a+c)$ (kriteria keberterimaan $\leq 30\%$)
4. Tingkat negatif palsu = $b/(b+d)$ (kriteria keberterimaan $\leq 30\%$)

4) Penentuan Homologi *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*

Produk amplifikasi dari hasil PCR *B. cereus* dan *P. aeruginosa* digunakan untuk proses *sequencing*. Produk PCR, *cycle sequencing* dan *sequencing* dikirim ke jasa pelayanan servis *sequencing* (1 st BASE, Malaysia) melalui PT. Genetika Science, Indonesia.

Data hasil *sequencing* diedit secara manual dengan menggunakan program *ChromasPro* versi 2.6.2 (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>). Setelah itu, dilakukan pencarian homologi *sequence* spesies terdekat dengan program *BLAST* pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

e. Deteksi *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada Sampel

Pengujian sampel dilakukan dengan menggunakan isolat bakteri dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pusat Riset Obat dan Makanan (PROM) yang berasal dari makanan. Pengujian sampel meliputi peremajaan dan purifikasi kultur bakteri yang berasal dari pangan dengan melakukan peremajaan ke media NB untuk mendapatkan kultur murni, kemudian di inokulasi ke media selektif karena dapat menumbuhkan bakteri tertentu dengan pesat, sementara bakteri yang lain

terhambat dan memperbanyak kultur murni ke media BHIA. Setelah itu, melakukan ekstraksi DNA untuk memisahkan DNA dengan komponen lain seperti lemak, karbohidrat, dan protein, serta mendeteksi *B. cereus* dan *P.aeruginosa* dengan metode PCR yang telah di optimasi dan di visualisasi produk PCR dengan elektroforesis.

3. Analisis Data

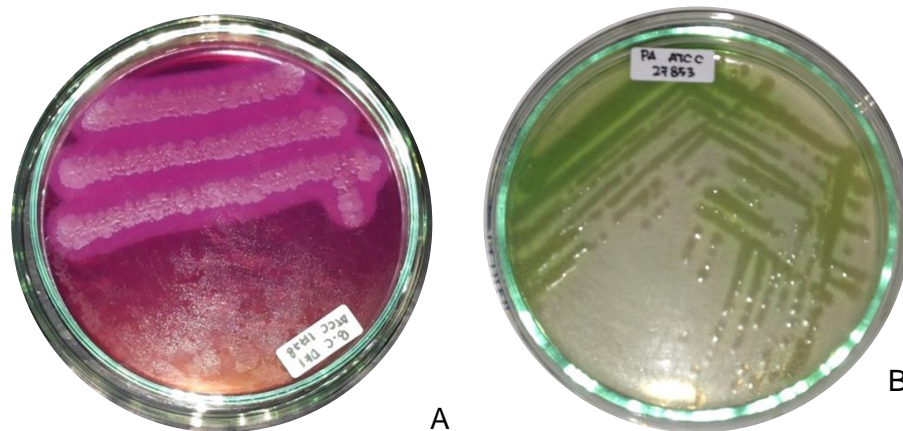
Data hasil analisis molekuler disajikan secara deskriptif. Analisis data dilakukan dengan mengamati fragmen pita DNA secara visual dari hasil elektroforesis pada berbagai parameter dan menentukan validasi metode secara molekuler pada berbagai pengujian. Parameter yang diuji adalah menentukan konsentrasi primer dan konsentrasi DNA yang akan digunakan dalam kondisi PCR, serta suhu *annealing*. Optimasi dan validasi dan dalam pegujian terhadap isolat bakteri dari sampel pangan untuk menentukan status kelayakan dari makanan tersebut.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Peremajaan dan Purifikasi Kultur Bakteri

Isolat bakteri *B. cereus* ATCC 11778 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853 diperoleh dari koleksi isolat di Laboratorium Mikrobiologi Pusat Riset dan Makanan (PROM). Bakteri tersebut memiliki karakter spesifik pada masing-masing media selektif *Mannitol Egg Yolk Polymyxin* (MYP) Agar dan *Pseudomonas Agar Base* (PAB), yaitu *B. cereus* tumbuh pada media *Mannitol Egg Yolk Polymyxin* (MYP) Agar dan memiliki tipe koloni tipikal berwarna merah muda dengan presipitasi di sekelilingnya, sedangkan *P. aeruginosa* tumbuh pada media *Pseudomonas Agar Base* (PAB) memiliki tipe koloni tipikal, yaitu berwarna krim-kuning dengan pigmentasi kehijauan (Gambar 5).



Gambar 5. Hasil isolasi: (A) *B. cereus* di media MYPA; (B) *P. aeruginosa* di media PAB.

Media MYPA merupakan media selektif *B. cereus*. Media yang akan digunakan, sebelumnya ditambahkan *egg yolk emulsion* dan *polymyxin B supplement*. Penambahan *egg yolk emulsion* atau kuning telur dapat memperjelas koloni tipikal *B. cereus* karena *egg yolk emulsion* memiliki lesitin dan *B. cereus* menghasilkan enzim fosfatidilkolin hidrolase dan fosfolipase C yang menghidrolisis lesitin, sehingga koloni tipikal *B. cereus* akan mendegradasi lesitin yang terlihat sebagai zona presipitasi di sekeliling koloni (Schraft dan Griffiths,

1995). Penambahan *polymyxin B supplement* ditujukan untuk menekan atau menghambat pertumbuhan bakteri lain, sedangkan *B. cereus* sangat resisten terhadap *polymyxin B* (Fatmasari, 2015).

Komposisi pada media MYPA adalah ekstraksi daging sapi, pepton, dan manitol. Bakteri yang memfermentasi manitol mengakibatkan produksi asam dan menghasilkan koloni tipikal berwarna kuning, sedangkan *B. cereus* tidak memfermentasi manitol/manitol negatif, sehingga menghasilkan koloni tipikal yang berwarna merah muda dengan dikelilingi zona presipitasi di sekitar koloni. Ekstrak daging sapi dan pepton yang ada di dalam media MYPA berfungsi sebagai sumber nitrogen, vitamin, mineral, dan asam amino esensial yang digunakan untuk pertumbuhan *B. cereus* (Batt, 2000). Pepton juga terdapat pada media selektif *Pseudomonas agar base* (PAB) untuk mendukung pertumbuhan *P.aeruginosa*.

Media selektif PAB mengandung nutrisi untuk pembentukan pigmen piosianin, yaitu pigmen yang diproduksi khusus oleh *P. aeruginosa* karena penambahan *Pseudomonas CN (Cetrimide-Nalidixic) Supplement*. Penambahan *Pseudomonas CN Supplement* bertujuan untuk menekan bakteri lain tumbuh pada media PAB, seperti *Klebsiella*, *Proteus*, dan *Providencia* spp. (Thermo scientific, 2017). Masing-masing satu koloni spesifik tersebut kemudian diisolasi ke dalam media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C sebagai kultur murni bakteri spesifik *B. cereus* ATCC 11778 dan *P.aeruginosa* ATCC 27853 yang selanjutnya akan dilakukan ekstraksi DNA untuk digunakan dalam teknik PCR.

B. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dari dalam sel bertujuan untuk mendapatkan DNA bakteri yang murni tanpa pengotor karena adanya pengotor akan mengganggu tahap amplifikasi. Keberhasilan ekstraksi DNA ditunjukkan dengan kualitas DNA dari visualisasi elektroforesis. Hasil ekstraksi DNA dikatakan murni jika rasio absorbansi pada panjang gelombang 260-280 berkisar 1,8-2,0 (Nolan *et al.*, 2007).

Berikut ini merupakan hasil pengukuran kemurnian isolat/*template* DNA yang diperoleh dengan metode pendidihan (Tabel 10).

Tabel 10. Nilai absorbansi *B. cereus* dan *P. aeruginosa* hasil ekstraksi DNA

Sampel	A260	A280	Rasio A260/A280	[DNA] ng/ μ L
KM BC 1	0,489	0,229	2,200	476,7
KM BC 2	0,510	0,240	2,197	495,6
KM PA 1	0,350	0,188	2,102	309,0
KM PA 2	0,328	0,175	2,105	291,4

Ket : KM BC1 & 2 (kultur murni *B. cereus* ATCC 11778 ulangan 1 dan 2); KM PA1 & 2 (kultur murni *P. aeruginosa* ATCC 27853 ulangan 1 dan 2).

Nilai absorbansi DNA *B. cereus* dan *P. aeruginosa* hasil ekstraksi DNA menunjukkan bahwa konsentrasi DNA berkisar antara 291,4 ng/ μ l sampai 495,6 ng/ μ l (Tabel 10). Banyak sedikitnya DNA yang dihasilkan dipengaruhi oleh beberapa faktor jumlah sel koloni yang diambil pada kondisi isolat dan ekstraksi. Konsentrasi hasil ekstraksi DNA dipengaruhi oleh kecepatan ekstraksi pada waktu ekstraksi (Komalasari, 2009). Faktor kecepatan ekstraksi berpengaruh pada tahap lisis sel dan presipitasi pengambilan supernatan yang dilakukan perisolat, sehingga beberapa isolat terjadi pengendapan DNA.

Berdasarkan hasil dari ekstraksi DNA menunjukkan tingkat kemurnian DNA pada isolat *B. cereus* adalah 2,197-2,200, sedangkan isolat *P. aeruginosa* adalah 2,102-2,105 (Tabel 10). Hasil ekstraksi dengan rasio 1,8-2,0 merupakan DNA dengan kemurnian yang tinggi dan tidak terkontaminasi dengan residu protein. Hasil dari ekstraksi pada isolat *B. cereus* dan *P. aeruginosa* menunjukkan nilai kemurnian di atas 2,0. Hal tersebut menunjukkan bahwa masih adanya kontaminasi senyawa berat molekul kecil misalnya RNA (Yulinery *et al.*, 2015).

Penggunaan garam fisiologis dan metode *boiling* dapat digunakan untuk merusak dan melisis dinding sel bakteri Gram positif berupa peptidoglikan yang bersifat tebal dan kaku dan Gram negatif dengan dinding sel yang tipis. Garam fisiologis digunakan untuk menghilangkan polisakarida karena garam dapat menyebabkan polisakarida terpresipitasi, sedangkan pendidihan dengan suhu yang tinggi selama beberapa menit akan menyebabkan peningkatan

permeabilitas dinding sel yang berakibat masuknya cairan dan materi lain di sekitar sel dan keluarnya materi-materi dari dalam sel, serta menginaktifkan enzim terutama DNA-ase yang dapat merusak DNA (Sunarno *et al.*, 2014).

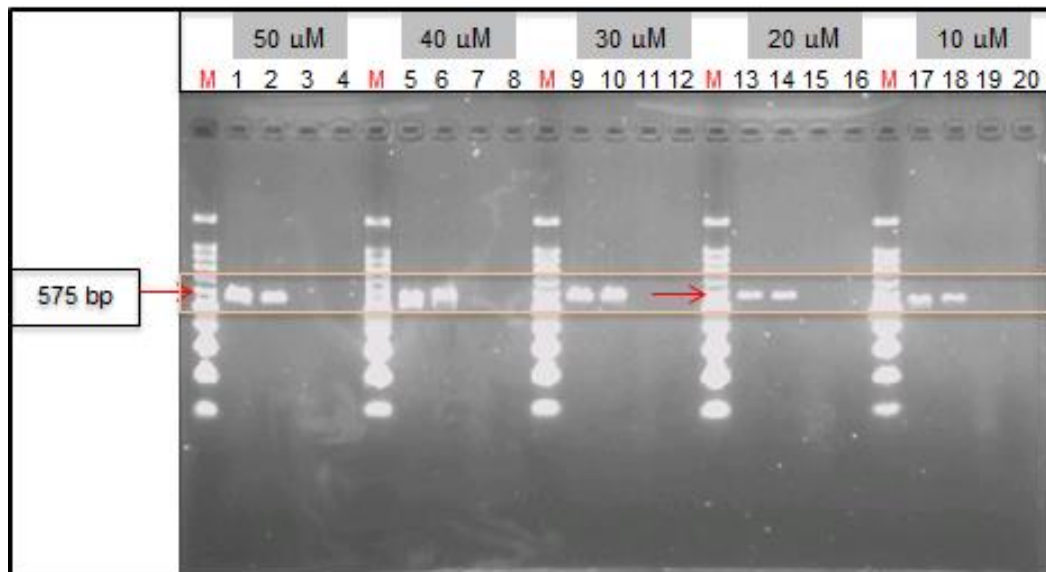
Pendidihan cukup dilakukan sekali karena denaturasi berulang dikhawatirkan dapat merusak struktur DNA ataupun DNA menjadi sulit renaturasi kembali saat didinginkan. Waktu pendidihan yang semakin panjang, denaturasi DNA akan menjadi irreversibel (Sambrook *et al.*, 1989). Oleh karena itu, suhu yang digunakan dan lamanya pendidihan adalah 100⁰C selama 15 menit (ISO 20837, 2006).

Konsentrasi DNA yang diperoleh dari hasil ekstraksi tidak seragam (Tabel 10), sehingga konsentrasi DNA diseragamkan dengan pengenceran. Hal tersebut dilakukan untuk menjamin bahwa jumlah DNA yang akan diamplifikasi dengan teknik PCR mempunyai konsentrasi yang sama. Konsentrasi DNA diseragamkan menjadi 50 ng/ μ L dengan pengenceran dan digunakan sebagai *template* pada proses amplifikasi dengan menggunakan PCR. Analisis produk PCR menggunakan gel agarose 1,5%, dengan TBE 0,5X untuk *B. cereus* dan TBE 1X untuk *P. aeruginosa*. Hasil elektroforesis diamati dan didokumentasikan dengan menggunakan *Molecular Imager Gel Doc XR System* (Bio-Rad) untuk mengetahui ukuran fragmen DNA.

C. Optimasi Metode PCR

1. Optimasi Konsentrasi Primer

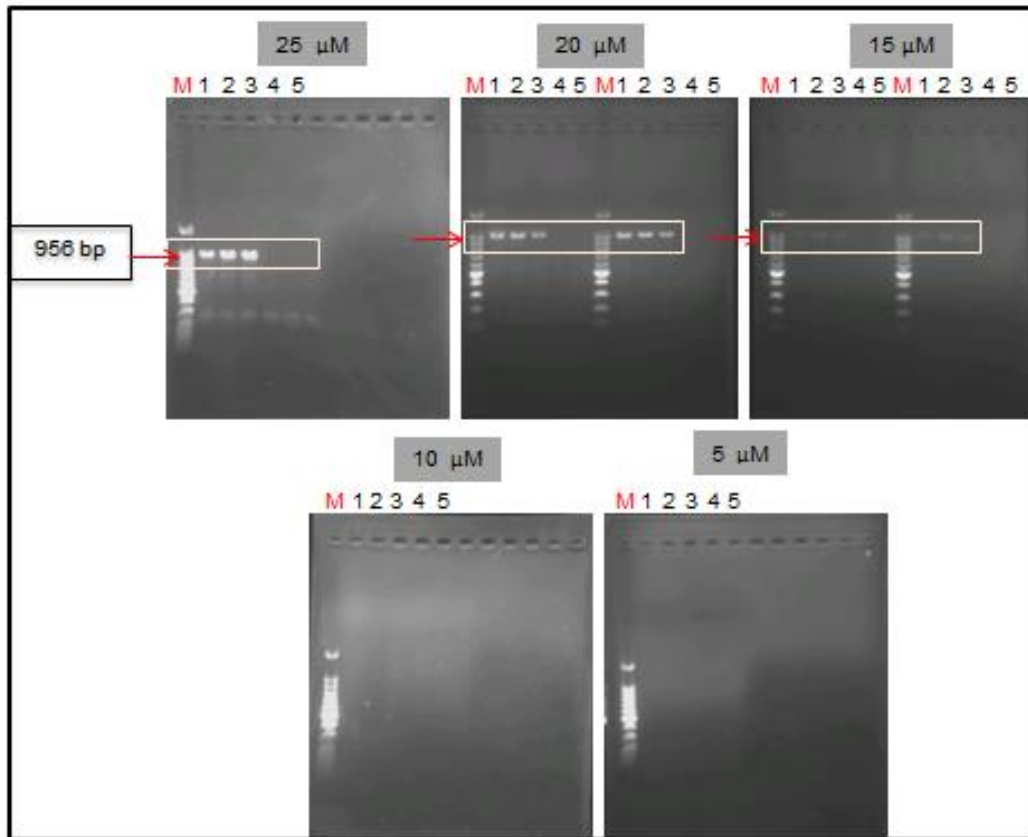
Hasil optimasi konsentrasi primer untuk deteksi *B. cereus* pada variasi konsentrasi primer (10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, dan 50 μ M) dengan menggunakan konsentrasi DNA 50 ng/ μ L menunjukkan bahwa kelima variasi tersebut dapat mengamplifikasi pada gen *motB* (motility protein B) dengan ketebalan pita DNA yang hampir sama pada ukuran produk PCR (amplikon) 575 bp (Gambar 6). Berdasarkan hasil tersebut, konsentrasi primer 20 μ M menghasilkan pita yang lebih jelas dibandingkan dengan konsentrasi primer lainnya.



Gambar 6. Hasil optimasi konsentrasi primer untuk deteksi *B. cereus*. Lajur M: ladder marker 100 bp; lajur 1-2, 5-6, 9-10, 13-14 dan 17-18 (*B. cereus*); lajur 3, 7, 11, 15, dan 19 (*non-template control/NTC*); lajur 4, 8, 12, 16, dan 20 (*master mix*).

Hasil optimasi konsentrasi primer *B. cereus* dapat dikatakan bahwa konsentrasi primer sangat berpengaruh terhadap ketebalan dan kejelasan pita DNA. Pita DNA yang tebal dan mengumpul (tidak menyebar) menunjukkan konsentrasi komponen PCR yang tinggi dan DNA yang diekstraksi dalam kondisi utuh (Irmawati, 2003).

Hasil optimasi konsentrasi primer untuk deteksi *P. aeruginosa* pada gen 16S rRNA dengan variasi konsentrasi primer (5 μM , 10 μM , 15 μM , 20 μM , dan 25 μM) dan konsentrasi DNA 50 ng/ μL menunjukkan bahwa pada konsentrasi primer 20 μM menghasilkan pita DNA yang lebih jelas dengan ukuran produk PCR (amplikon) 956 bp (Gambar 7).



Gambar 7. Hasil optimasi konsentrasi primer untuk deteksi *P. aeruginosa*. Lajur M: ladder marker 100 bp; lajur 1-3 (*P. aeruginosa*); lajur 4 (non-template control/NTC); dan lajur 5 (master mix).

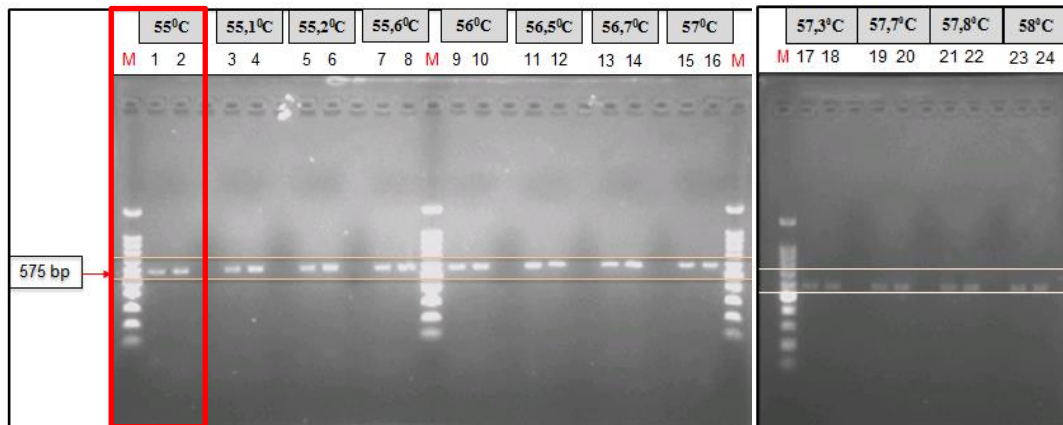
Hasil amplifikasi pada konsentrasi primer 5 μM dan 10 μM tidak menghasilkan pita DNA, sedangkan pada konsentrasi primer 15 μM menghasilkan pita DNA yang tidak terlalu jelas dan konsentrasi 25 μM menghasilkan pita DNA dengan adanya *smear* (Gambar 7). *Smear* dapat disebabkan oleh DNA yang diperoleh ada yang terpotong, sedangkan DNA yang tidak teramplifikasi dapat disebabkan konsentrasi primer yang terlalu rendah sehingga produk DNA yang dihasilkan terlalu rendah dan tidak dapat dilihat secara visual (Padmadi, 2009). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Angelia (2009) bahwa optimasi konsentrasi primer perlu dilakukan karena penggunaan konsentrasi primer yang terlalu rendah proses amplifikasi tidak akan berlangsung.

Perbedaan hasil optimasi konsentrasi primer dapat disebabkan oleh kondisi PCR yang belum optimal dan primer yang terlalu rendah. Keberhasilan isolat dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik untuk *B. cereus* dan

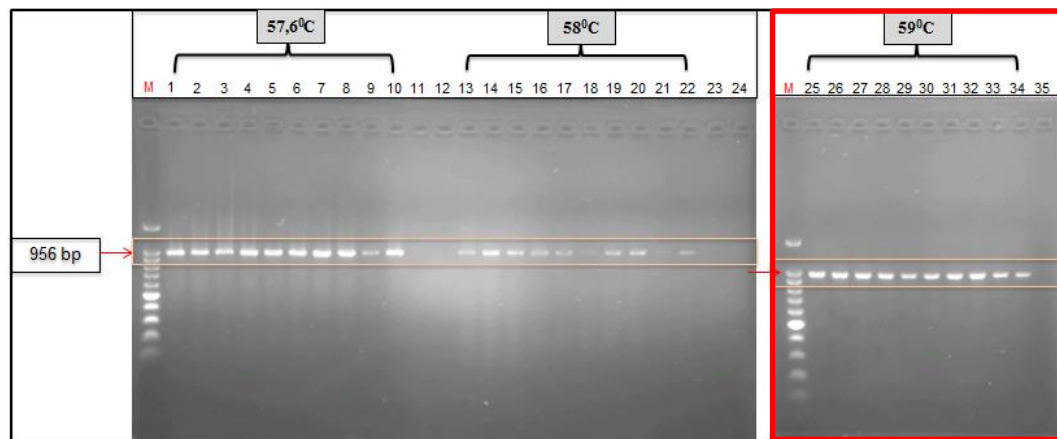
P.aeruginosa ditentukan oleh beberapa faktor, yaitu faktor teknis dan non teknis misalnya keahlian dan ketetapan memipet dalam volume sangat kecil, jumlah komponen dalam larutan premix PCR, jumlah dan kemurnian DNA, dan primer oligonukleotida gen (Purnami, 2009).

2. Optimasi Suhu *Annealing*

Hal lain yang masih memerlukan optimasi adalah suhu *annealing*. Optimasi suhu *annealing* dilakukan dengan menggunakan metode gradien suhu, sehingga akan terlihat suhu yang menghasilkan amplifikasi yang positif. Hasil visualisasi PCR untuk optimasi suhu *annealing B. cereus* menunjukkan pita DNA yang optimal dan sejajar pada ukuran 575 bp adalah pada suhu *annealing* 55⁰C (Gambar 8), sedangkan optimasi suhu *annealing P. aeruginosa* menghasilkan pita DNA pada suhu 57⁰C; 57,1⁰C; 57,2⁰C; 57,6⁰C; 58⁰C; 58,5⁰C; 58,7⁰C; 59⁰C; 59,3⁰C, 59,7⁰C; 59,8⁰C; dan 60⁰C. Namun, hasil amplifikasi PCR dilakukan uji ulang dengan suhu *annealing* 57,6⁰C; 58⁰C; dan 59⁰C dan menghasilkan pita DNA yang lebih jelas, tidak adanya *smear* dan sejajar pada suhu *annealing* 59⁰C (Gambar 9).



Gambar 8. Hasil amplifikasi optimasi suhu *annealing B. cereus*. Lajur M: *ladder marker* 100 bp.



Gambar 9. Hasil amplifikasi optimasi suhu *annealing* *P. aeruginosa*. Lajur M: ladder marker 100 bp.

Optimasi suhu *annealing* perlu dilakukan, karena suhu *annealing* yang terlalu tinggi akan menyebabkan primer tidak akan menempel, sedangkan suhu *annealing* yang terlalu rendah menyebabkan primer akan menempel dimana saja dan terbentuklah produk *non*-spesifik. Penggunaan metode gradien suhu *annealing* merupakan salah satu alternatif untuk mengetahui suhu optimal pada DNA, serta memungkinkan melakukan kombinasi dua belas suhu denaturasi, *annealing*, dan elongasi yang berbeda dalam satu kali menjalankan PCR (Sambrook dan Russell, 2001; Prezioso dan Jahns, 2013). Suhu *annealing* yang lebih tinggi dari 37°C, yaitu 55°C hingga 65°C, maka spesifisitas reaksi amplifikasi akan meningkat (Yuwono, 2006).

Suhu *annealing* dengan suhu tinggi akan berhubungan dengan stabilitas molekul primer yang berikatan dengan molekul DNA dan akan sangat mempengaruhi produk PCR, sehingga akan mengganggu stabilitas ikatan hidrogen antar nukleotida primer terhadap komplemennya pada DNA *template*. Suhu akan mempengaruhi tingkat pergerakan dari untai nukleotida dan berikatan dengan kekuatan ikatan hidrogen antara nukleotida (primer dengan DNA cetakan) (Mulya, 2011).

Suhu yang lebih rendah membuat molekul material memiliki energi kinetik lebih rendah dibandingkan pada suhu yang tinggi, artinya suhu lebih rendah akan menurunkan kecepatan molekuler, sedangkan suhu yang lebih tinggi akan meningkatkan kecepatan molekuler. Sehingga, penggunaan suhu *annealing* yang

tinggi yaitu 55⁰C (deteksi *B. cereus*) dan 59⁰C (deteksi *P. aeruginosa*) merupakan kondisi yang optimal dalam menghasilkan produk PCR (Gambar 8 dan Gambar 9). Jika atom dan molekul berada pada suhu yang sama, maka atom dan molekulnya memiliki energi kinetik yang sama dan hal yang menjadi penting adalah semakin tinggi suhu suatu objek maka semakin cepat atom dan molekulnya bergerak (Trefil dan hazen, 2004).

Suhu *annealing* yang optimal merupakan suhu yang sesuai untuk primer secara tepat berikatan pada komplemennya, membuat pergerakan atom yang tinggi, mengakibatkan pasangan primer yang sesuai dengan komplemennya akan berikatan pada DNA target dan melanjutkan proses perpanjangan DNA, sedangkan pasangan primer yang tidak sepenuhnya komplemen akan cenderung terlepas kembali dan gagal untuk melanjutkan proses perpanjangan DNA. Tidak munculnya pita DNA pada proses PCR dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain suhu *annealing* yang terlalu rendah atau terlalu tinggi, waktu denaturasi terlalu singkat, jumlah reaksi PCR terlalu banyak, dan adanya kontaminasi DNA asing (Priambodo, 2011).

D. Validasi Metode Secara Molekuler

Berdasarkan kondisi PCR yang telah di optimasi, maka digunakan volume total untuk teknik PCR adalah 25 µL dengan komposisi *master mix* yang digunakan yaitu *Nuclease Free Water* (NFW) 9 µl, primer *forward* dan *reverse* 0,5 µl (BCFomp1/BCRomp1 atau PA-SS-F/PA-SS-R), *Go Taq Green* 12,5 µl, dan DNA *template* 2,5 µl.

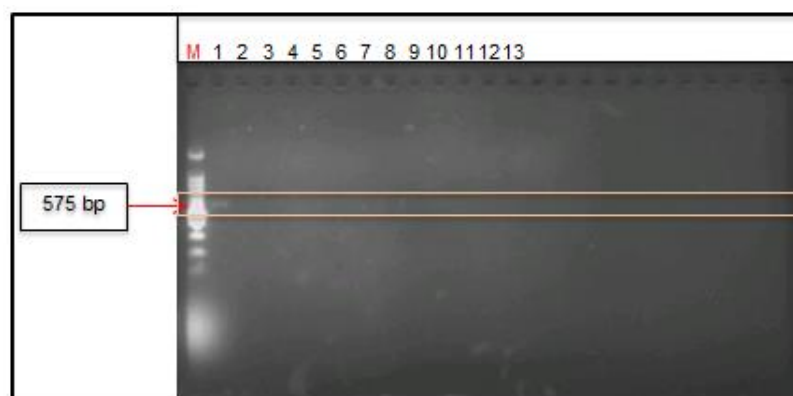
Konsentrasi primer dan konsentrasi DNA yang digunakan untuk masing-masing *B. cereus* dan *P. aeruginosa* adalah 20 µM dan 50 ng/µl. Kondisi PCR optimum untuk deteksi *B. cereus* dengan 35 siklus adalah pra-denaturasi (94°C, selama 2 menit), denaturasi (94°C, selama 1 detik), *annealing* (55°C, selama 1 menit), elongasi (72°C, selama 2 menit), kemudian dilanjutkan dengan *final extention* pada suhu 72°C selama 5 menit. Deteksi *P. aeruginosa* dengan 25 siklus adalah pra-denaturasi (95°C, selama 2 menit), denaturasi (94°C, selama 20 detik),

annealing (59°C, selama 20 detik), *elongasi* (72°C, selama 40 detik). Kemudian dilanjutkan dengan *final extention* pada suhu 72°C selama 1 menit.

1. Penentuan Spesifisitas

Spesifisitas merupakan kemampuan suatu primer untuk mengidentifikasi DNA target dengan hasil positif secara teknik PCR. Uji spesifisitas dipengaruhi oleh sepasang primer yang digunakan, mencakup susunan nukleotida, panjang nukleotida, primer, *annealing temperature*, dan konsentrasi primer. Primer yang spesifik terhadap *B. cereus* dan *P. aeruginosa* dianalisis dengan program BLAST. Spesifisitas diuji pula dengan menggunakan bakteri pembanding lainnya, yaitu *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, EHEC, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella sonnei*, dan *Listeria monocytogenes* (Tabel 4).

Hasil amplifikasi PCR menunjukkan bahwa primer BCFomp1/BCRomp1 dan PA-SS-F/PA-SS-R yang digunakan hanya dapat mengamplifikasi DNA *B. cereus* dan *P. aeruginosa* dengan membentuk pita DNA masing-masing berukuran 575 bp dan 956 bp. DNA bakteri pembanding lainnya tidak teramplifikasi, sehingga dapat dikatakan bahwa primer BCFomp1/BCRomp1 dan PA-SS-F/PA-SS-R yang digunakan spesifik untuk mendeteksi *B. cereus* dan *P. aeruginosa*, seperti pada Gambar 10 dan Gambar 11.



Gambar 10. Hasil elektroforesis dibawah sinar UV menunjukkan pita DNA *B.cereus*. Lajur M: *ladder marker* 100 bp; lajur 1 (*B. cereus*); lajur 2-11 (bakteri lainnya); lajur 12 (*non-template control*); lajur 13 (*master mix*).



Gambar 11. Hasil elektroforesis dibawah sinar UV menunjukkan pita DNA *P.aeruginosa*. Lajur 2, 11, dan 12 (*P. aeruginosa*); lajur 3-9 dan 13-16 (bakteri lainnya); lajur 17 (*non-template control*); lajur 18 (*master mix*).

Berdasarkan Gambar 10 dan 11, hasil deteksi *B. cereus* ATCC 11778 dan *P.aeruginosa* ATCC 27853 dengan menggunakan teknik PCR menunjukkan hasil positif karena menghasilkan pita DNA yang terbentuk sejajar pada ukuran 575 bp dan 956 bp (Stasiak *et al*, 2009; El-Ross *et al.*, 2013). Primer yang digunakan kemudian diuji dengan menggunakan program *Primer BLAST* dari *gene bank*. Program tersebut bertujuan melihat spesifisitas dari primer yang digunakan. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa masing-masing primer hanya dapat menempel secara spesifik terhadap gen *motB* *B. cereus* dan gen 16S rRNA *P. aeruginosa*.

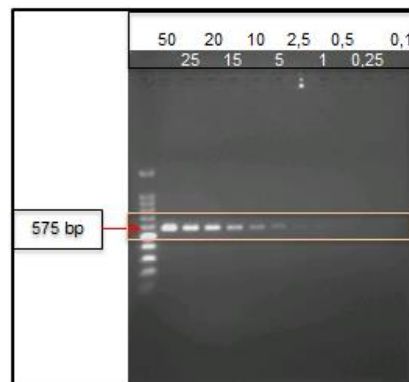
Program *Primer BLAST* memberikan informasi mengenai kualitas primer yang digunakan, yaitu panjang produk PCR yang diamplifikasi dan panjang primer yang digunakan, yaitu 20 bp untuk *B. cereus* dan 19 bp untuk *P.aeruginosa*. Ukuran ini sudah sesuai untuk persyaratan primer yang baik. Selain itu juga, memberikan informasi mengenai persentase GC, dimana nilai persentase GC yang baik adalah 45%-60% (Priambodo, 2011).

2. Penentuan *Limit of Detection* (LOD)

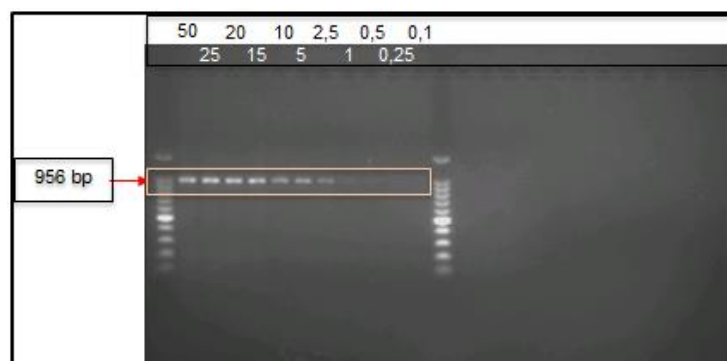
Limit of detection (LOD) ini dimaksudkan untuk mengukur kemampuan dari primer yang digunakan pada kondisi tertentu dalam mengamplifikasi konsentrasi terendah dari DNA *B. cereus* dan *P. aeruginosa* yang masih dapat terdeteksi.

Limit deteksi dilakukan dengan konsentrasi DNA yang digunakan adalah 50 ng/ μ l, 25 ng/ μ l, 20 ng/ μ l, 15 ng/ μ l, 10 ng/ μ l, 5 ng/ μ l, 2,5 ng/ μ l, 1 ng/ μ l, 0,5 ng/ μ l, 0,25 ng/ μ l, dan 0,1 ng/ μ l.

Hasil amplifikasi PCR untuk menentukan limit deteksi DNA *B. cereus* sampai konsentrasi 1 ng/ μ l, karena pada konsentrasi DNA 0,5-0,1 ng/ μ l sudah tidak terlihat pita DNA. Limit deteksi primer yang digunakan dapat dinyatakan sensitif karena mampu mendeteksi DNA *B. cereus* sampai konsentrasi 1 ng/ μ l (Gambar 12). Penentuan limit deteksi untuk DNA *P. aeruginosa* sebesar 0,5 ng/ μ l, karena pada konsentrasi DNA 0,25 ng/ μ l dan 0,1 ng/ μ l tidak terlihat adanya pita DNA. (Gambar 13).



Gambar 12. Hasil amplifikasi PCR *Limit of Detection* (LOD) DNA *B. cereus*.



Gambar 13. Hasil amplifikasi PCR *Limit of Detection* (LOD) DNA *P. aeruginosa*

3. Penentuan Sensitivitas, Spesifisitas, Positif Palsu dan Negatif Palsu

Perhitungan parameter sensitivitas, spesifisitas, positif palsu dan negatif palsu dilakukan dengan membandingkan hasil positif dan negatif yang diperoleh dengan teknik PCR (SAC, 2002; Brodsky, 2005). Sensitivitas dan spesifisitas akan memperlihatkan parameter positif palsu dan negatif palsu. Negatif palsu adalah hasil positif ketika target *sequence* tidak terdeteksi atau terdeteksi dalam jumlah yang kurang dari batas, sedangkan positif palsu adalah hasil negatif ketika target *sequence* terdeteksi (FDA, 2015). Hasil dari uji sensitivitas, spesifisitas, positif palsu dan negatif palsu dapat dihitung berdasarkan data pada Tabel 11.

Tabel 11. Hasil amplifikasi parameter sensitivitas, spesifisitas, positif palsu dan negatif palsu

Respon	Jumlah Presumtif		
	Positif	Negatif	
Terkonfirmasi (+)	50	0 (negatif palsu)	50
Terkonfirmasi (-)	0 (positif palsu)	25	25
	50	25	75

Keterangan :

a. Sensitivitas : $\frac{50}{50} \times 100\% = 100\%$

b. Spesifisitas : $\frac{25}{25} \times 100\% = 100\%$

c. Tingkat positif palsu : $\frac{0}{50} \times 100\% = 0\%$

d. Tingkat negatif palsu : $\frac{0}{25} \times 100\% = 0\%$

Berdasarkan Tabel 11 diketahui bahwa sensitivitas dan spesifisitas dari pengujian dengan metode PCR mencapai 100% , sedangkan tingkat positif palsu dan negatif palsu yaitu sebesar 0%. Nilai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi maka akan menurunkan angka negatif palsu dan positif palsu, serta menunjukkan bahwa metode secara molekuler ini dapat mengidentifikasi *B. cereus* dan *P.aeruginosa* dengan akurat dan dapat membedakan dengan mikroorganisme *non-target*.

4. Penentuan Homologi *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*

Hasil identifikasi secara molekuler dengan teknik PCR dan *sequencing* untuk mengkonfirmasi bahwa isolat tersebut merupakan bakteri *B. cereus* dan *P.aeruginosa*. Identifikasi diperoleh berdasarkan nilai homologi sekuen DNA pada gen *motB* dan gen 16S rRNA dengan sekuen spesies terdekatnya dapat diketahui dengan melakukan BLAST pada situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Hasil BLAST dari situs NCBI menunjukkan bahwa *similarity* tertinggi pada isolat *B. cereus* adalah 97% dengan spesies terdekatnya *B. cereus* ATCC 14579 dan *P. aeruginosa* adalah 99% dengan spesies terdekatnya *P. aeruginosa* ATCC 10145. Hal ini dapat dilihat dari nilai *Maximum identity* masing-masing isolat *B. cereus* dan *P. aeruginosa* mencapai 99% dan 100% (Tabel 12).

Tabel 12. Hasil identifikasi isolat *B. cereus* dan *P. aeruginosa* berdasarkan *sekuensing* dengan metode BLAST dan NCBI.

isolat	Takson terdekat hasil BLAST di NCBI	Max score	Query (%)	E-value	Accesion	Similarity (%)	Gaps
<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	837	99	0.0	AE01687 7.1	97	7/499 (1%)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 10145	1474	100	0.0	NR 114471.1	99	6/819 (0%)

Hasil penjajaran sekuen isolat *B. cereus* dan *P. aeruginosa* menunjukkan adanya gaps pada urutan basa nukleotida *B. cereus* (1%) dan *P. aeruginosa* (0%). Selain itu, nilai *E-value* sebesar nol menunjukkan bahwa data memiliki kecocokan yang signifikan. Analisis filogenetik dilakukan dengan membuat pohon filogeni dengan membandingkan *B. cereus* dengan beberapa spesies pada genus *Bacillus* dan *P. aeruginosa* pada genus *Pseudomonas*. Pohon filogeni menunjukkan kekerabatan *B. cereus* (Bc) atau *P. aeruginosa* (Pa) dengan spesies lain . Hal ini

ditunjukkan dengan *B. cereus* (Bc) atau *P. aeruginosa* (Pa) berada didalam satu *clade B. cereus* (Lampiran 9) atau *P. aeruginosa* (Lampiran 10).

E. Deteksi *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada Sampel

Pengujian sampel dilakukan dengan menggunakan isolat *B. cereus* dan *P.aeruginosa* yang berasal dari pangan (koleksi Laboratorium Mikrobiologi PROM) dan bertujuan untuk membuktikan bahwa penggunaan kondisi PCR yang sudah optimal dapat mengamplifikasi DNA pada gen *motB B. cereus* dan gen 16S rRNA *P. aeruginosa* pada sampel pangan. Pengujian ini terlebih dahulu dilakukan tahap purifikasi dan permurnian dan ekstraksi DNA untuk mendapat DNA *B.cereus* dan *P. aeruginosa* yang murni. Kemudian, konsentrasi DNA bakteri yang dihasilkan dapat diketahui dengan mengukurnya pada nanodrop spektrofotometer. Hasil konsentrasi dan kemurnian DNA dapat dilihat pada Tabel 13.

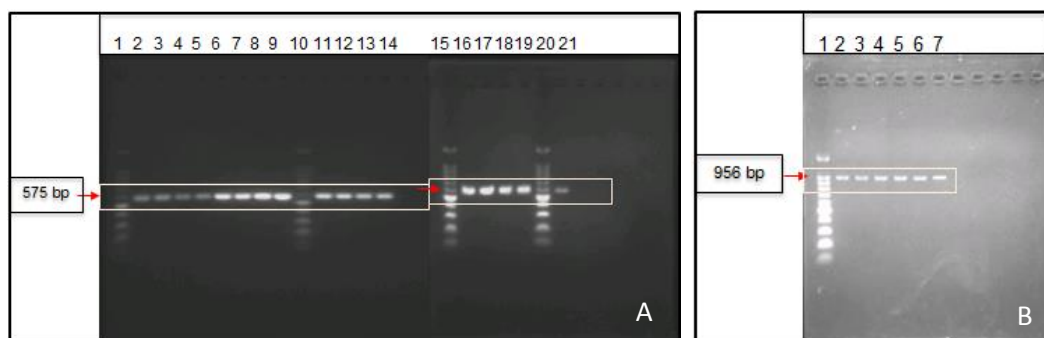
Tabel 13. Nilai absorbansi sampel hasil ekstraksi DNA

Sampel	A260	A280	Rasio A260/ A280	[DNA] ng/ μ l
Tepung mocaf	2,725	1,740	1,607	2607,6
Tepung mocaf	2,478	1,594	1,588	2388,7
Susu formula	2,927	1,902	1,565	2840,6
Susu formula	2,744	1,720	1,623	2667,9
Susu formula	2,856	1,838	1,590	2744,1
Susu formula	2,937	2,145	1,395	2795,8
Dendeng kaujon	2,645	1,690	1,598	2551,6
Dendeng kaujon	2,536	1,638	1,581	2443,5
Air minum	1,380	0,670	2,133	1336,4
Air minum	1,513	0,740	2,116	1465,9
Air minum	1,202	0,589	2,116	1162,3
Air minum	1,300	0,663	2,096	1218,3

Berdasarkan Tabel 13, nilai absorbansi sampel hasil ekstraksi DNA menunjukkan bahwa konsentrasi DNA berkisar 1162,3 ng/ μ L sampai 2840,6 ng/ μ L dengan tingkat kemurnian DNA masing-masing sampel berkisar antara 1,395 hingga 2,133. Hasil ini menunjukkan nilai kemurnian dibawah 1,8, artinya masih terdapat kontaminasi protein yaitu pada isolat bakteri dari tepung mocaf

(1,607 dan 1,588), dendeng kaujon (1,598 dan 1,581), dan susu formula (1,395-1,623). Hasil ekstraksi yang menunjukkan nilai kemurnian di atas 2,0 yang artinya masih terdapat RNA adalah isolat bakteri dari air minum dalam kemasan (AMDK) yang berkisar antara 2,096-2,133.

Kualitas DNA dari hasil ekstraksi DNA digunakan sebagai *template* pada proses amplifikasi dengan menggunakan teknik PCR. Sebelum dilakukan amplifikasi, dilakukan pengenceran DNA hingga 50 ng/ μ L. Proses amplifikasi dilakukan dengan prosedur yang sudah di optimasi dan tervalidasi sebelumnya, yaitu dengan menggunakan konsentrasi primer 20 μ M untuk primer *B. cereus* dan *P. aeruginosa*, serta suhu *annealing* yang digunakan pada masing-masing bakteri *B. cereus* dan *P. aeruginosa* adalah 55⁰C dan 59⁰C. Hasil visualisasi elektroforesis dengan menggunakan agarose 1,5% ini dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Hasil amplifikasi PCR isolat bakteri dari; (A) tepung mocaf (lajur 2-5), dendeng kaujon (lajur 6-9), susu formula (lajur 11-19), kontrol *B.cereus* (lajur 21); (B) air minum dalam kemasan (lajur 2-5), kontrol *P. aeruginosa* (lajur 6-7).

Isolat bakteri diuji untuk memastikan *B. cereus* dan *P. aeruginosa* terdapat pada sampel tepung mocaf, susu formula, dendeng kaujon, dan air minum dalam kemasan (AMDK). Hasil amplifikasi isolat bakteri menggunakan teknik PCR yang telah dioptimasi dan tervalidasi menunjukkan hasil yang positif benar merupakan *B. cereus* pada isolat sampel tepung mocaf, susu formula, dan dendeng kaujon, sedangkan hasil positif *P. aeruginosa* pada isolat sampel air minum dalam kemasan (AMDK).

Bakteri *B. cereus* mampu membentuk spora pada kondisi lingkungan yang ekstrim dan lebih tahan dalam bentuk sel vegetatifnya terhadap pemanasan,

kekeringan, bahan pengawet makanan dan pengaruh lingkungan lainnya. Oleh sebab itu, spora *B. cereus* sering ditemukan pada makanan seperti susu, sereal, permukaan daging yang kemungkinan disebabkan adanya kontaminasi debu atau tanah setelah proses pemotongan hewan (Soejoedono, 2002). Spora *B. cereus* dapat bertahan untuk waktu yang lama di produk kering (FSANZ, 2003).

Bakteri *B. cereus* memproduksi enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis protein, lemak, pati, dan karbohidrat lainnya. Protein yang terdapat pada sampel dendeng kaujon dan susu formula lebih tinggi dibandingkan sampel tepung mocaf. Dendeng kaujon merupakan dendeng sapi yang memiliki protein yang tinggi. Penyimpanan dendeng dilakukan pada suhu kamar (15-20⁰C). Susu formula memiliki komposisi yang mengandung sereal dan susu, merupakan media yang paling mendukung untuk pertumbuhan bakteri *B. cereus*. Pengolahan susu segar menjadi susu bubuk yang nantinya akan digunakan untuk formulasi produk makanan bayi dan balita ternyata tidak dapat menghilangkan keberadaan spora *B.cereus*. Susu segar tersebut dapat terkontaminasi oleh *B. cereus* sesaat setelah proses pemerasan susu, dimana susu dibiarkan terbuka dan terpapar udara serta debu. Sampel yang mengandung karbohidrat yang tinggi seperti sampel tepung mocaf, bakteri tersebut tumbuh dengan cepat. Bakteri ini dapat memanfaatkan berbagai jenis pangan untuk mendukung pertumbuhannya, tetapi pangan yang mengandung pati merupakan sumber optimal untuk pertumbuhannya (Gibbs, 2005).

Metode analisis juga digunakan untuk adanya *P. aeruginosa* yang mengkontaminasi air minum dalam kemasan (AMDK). Air merupakan materi esensial di dalam kehidupan. Kebutuhan air bersih, khususnya air minum selama ini diperoleh dari berbagai sumber, yakni air tanah, air sungai, air hujan, dan air pegunungan. Berbagai upaya dilakukan guna mendapatkan air minum yang layak di konsumsi, seperti air minum dalam kemasan (AMDK). Air minum dalam kemasan menjadi salah satu alternatif guna memenuhi kebutuhan air minum secara praktis. Namun, tidak sedikit air minum dalam kemasan yang beredar dapat diragukan kualitasnya karena diduga terkontaminasi bakteri patogen jika

pengolahannya tidak benar, seperti terkontaminasinya oleh bakteri patogen *P.aeruginosa*.

Proses yang tidak memenuhi standar diduga menjadi faktor penyebab produk tersebut tercemar. Selain itu, penanganan produk secara tidak tepat saat distribusi hingga sampai ke pedagang dan konsumen juga berpengaruh pada kualitas air minum dalam kemasan (AMDK). Kemasan yang rusak atau bocor akibat guncangan karena penanganan yang kurang tepat, dapat memicu perkembangan bakteri didalamnya. Penyimpanan yang tidak baik, seperti dalam keadaan yang tidak tertutup rapat dapat memicu perkembangan bakteri, salah satunya *P.aeruginosa* dan dapat merusak mutu dari kualitas air tersebut. Meminum air minum yang sudah terkontaminasi bakteri *P. aeruginosa* dalam jumlah tertentu merupakan salah satu faktor utama terjadinya penyakit diare.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan data hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa metode analisa untuk deteksi gen *motB* pada *B. cereus* dan gen 16S rRNA pada *P. aeruginosa* telah dapat di optimasi dan tervaliditas dengan metode PCR yang optimal pada kondisi konsentrasi primer 20 μM dan konsentrasi DNA 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Hasil validasi terhadap metode analisa menunjukkan bahwa masing-masing metode spesifik untuk deteksi *B. cereus* dan *P. aeruginosa* dengan menghasilkan LOD adalah 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (*B. cereus*) dan 0,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (*P. aeruginosa*). Metode analisa ini juga membuktikan deteksi *B. cereus* dan *P. aeruginosa* secara spesifik dan sensitif dengan nilai 100%.

B. Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah:

1. Metode analisa ini dapat diujicobakan untuk identifikasi *B. cereus* dan *P.aeruginosa* dari sampel pangan langsung.
2. Metode analisa ini dapat diujicobakan terhadap sampel pangan, tanpa menumbuhkan bakteri target pada media spesifik untuk mempersingkat waktu.

DAFTAR PUSTAKA

- Afifi, Magdy M., Suelam I.I.A., Soliman M.T.A. dan El-Gohary M.G.S. 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from environmental and clinical samples in Upper Egypt. *Int. J. of Bio. Chemistry*.
- Angelia, Tri O. *Kajian metode deteksi bakteri patogen penyebab penyakit asal pangan di Pusat Riset Obat dan Makanan Badan POM RI*. Bogor: ITB.
- Aris, M. 2011. *Identifikasi, patogenisitas bakteri dan pemanfaatan gen 16S-rRNA untuk deteksi penyakit ice-ice pada budidaya rumput laut*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Arnesen, L. P., A. Fagerlund & P.E. Granum. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32:579–606.
- Aqzayunarsih, A., R. Agus, O. Nurrahman, dan Maryawana. 2015. *Optimasi PCR: konsentrasi primer dan volume templat DNA pada amplifikasi mtDNA ikan medaka *Oryzias* spp. di daerah aliran sungai (DAS) Maros*. Makassar: Universitas Hasanuddin.
- [BPOM RI] Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2014. *Keracunan Pangan Akibat Bakteri Patogen*. Jakarta: BPOM.
- Bahri, S., Y. Sani dan Indraningsih. 2005. Beberapa faktor yang mempengaruhi keamanan pangan asal ternak di Indonesia. *Wartazoa*, 16(1): 1-13.
- Batt, C.A. 2000. *Encyclopedia of food microbiology*. San Diego: Academic Press.
- Brodsky, M. 2005. *Verification and Validation of Methods in an Accreditation Environment. A microbiological perspective FPAC*.
<http://www.flworkshop.com>.
- Brooks, G. F., J. S. Butel, S. A. Morse. 2007. *Jawetz, Melnick, Adelberg, Mikrobiologi kedokteran, edisi 23, diterjemahkan oleh Hartanto, H*. Jakarta: Kedokteran EGC.
- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2016. *Public health image library (PHIL)*. [Internet] U.S.A (ID): [Diunduh 27 Juli 2017]. Tersedia pada : https://phil.cdc.gov/phil/details_linked.asp?pid=229.
- Degen, H. J., A. Deufel, D. Eisel, S. Grunewald-Janho, J. Keesey. 2006. *PCR applications manual, 3rd ed*. Germany.

- Dwidjoseputro, D. 1985. *Dasar-dasar mikrobiologi*. Malang: Djembatan.
- Dzen, S. M., Roekistiningsih, S. S. Winarsih. 2003. *Bakteriologi Medik*. Malang: Bayumedia.
- El-Ross, Nahla A. Abou, Ebtessam M. Mazid, Eman M. Zakary, dan Kayri F. Abou El Yazid. 2013. Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from milk. *Assiut. Vet. Med. J.*, 59(139).
- Fatmasari. 2015. *Uji sensitivitas antibiotik klorampenikol, siprofloksasin, eritromisin, dan klindamisin terhadap Bacillus cereus yang diisolasi dari daging sapi di pasar tradisional dan pasar modern kota Makassar*. Makassar: Universitas Hasanuddin.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2015. *Guidelines for the validation of chemical methods for the FDA FVM program 2nd ed*. U.S. Food and Drug Administration.
- [FSANZ] Food Standar Austria and New Zealand. 2003. *Application A 454: Bacillus cereus limits in infant formula*. Assesment Report. Canberra-Wellington.
- Gaffar, S. 2007. *Buku ajar bioteknologi molekul*. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Garibyan, Lilit dan Nidhi A. 2014. Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *J. Invest. Dermatol.*, 133(3).
- Gibbs, P. 2005. *Characteristics of spore-forming bacteria*. Di dalam: Blackburn, C de W. And McClure, P.J. (eds). *Foodborne pathogens hazards, risk analysis and control*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Harmita. 2006. *Buku ajar analisis fisikokimia*. Depok: Universitas Indonesia.
- Harmon S.M., Goepfert J.M., dan Bennet R.W. 1992. *Compendium of methods for the microbiological examination of food, 3rd ed*. Washington: American Public Health Association.
- Herman, M. R. Napirah, dan Sherlina. 2015. Faktor-faktor perilaku hidup bersih dan sehat yang berhubungan dengan kejadian *food-borne disease* pada anak di Sekolah Dasar Negeri (SDN) Inpres 3 Tondo Kota Palu. *J. Kes. Tadulako.*, 1(2): 1-78.

- Hidayat, I.M, Sulastrini I, Kusandriani Y, Permadi A.H. 2014. Lesio sebagai komponen tanggap buah 20 galur dan atau varietas cabai terhadap inokulasi *Colletotrichum* dan *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Hort.*, 14(3): 161-162.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2005. *Persyaratan umum kompetensi laboratorium pengujian dan laboratorium kalibrasi*. ISO/IEC 17025:2005(E). Geneva, Switzerland.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2003. *Microbiology of food and animal feeding stuffs-protocol for the validation of alternative methods*. ISO/IEC 16140:2003(E). Geneva, Switzerland.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2006. *Microbiology of food and animal feeding stuffs-polymerase chain reaction (PCR) for detection of food-borne pathogens-requirements for sample preparation for qualitative detection*. ISO 20837:2006(E). Geneva, Switzerland.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2011. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – polymerase chain reaction (PCR) for detection and quantification of foodborne pathogens-performance characteristic*. ISO/IEC 22118:2011(E). Geneva, Switzerland.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2014. *Persyaratan umum kompetensi laboratorium pengujian dan laboratorium kalibrasi*. ISO/IEC 22174:2005(E). Geneva, Switzerland.
- Ishmael, F.T., dan Stellato, C. 2008. Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Annals of allergy, Ashtma, and immunology*, 101: 437-443.
- Irmawati, 2003. *Perubahan keragaman genetik ikan kerapu tikus generasi pertama pada stok hatchery*. Bogor: ITB
- Jawetz, E., J. Melnick, dan E. Adelberg. 2005. *Mikrobiologi kedokteran, edisi satu*. Jakarta: Salemba Medika.
- Joko, T., N. Kusumandari, dan S. Hartono. 2011. Optimasi metode PCR untuk deteksi *Pectobacterium carotovorum*, penyebab penyakit busuk lunak angrek. *J. Perlindungan Tanaman Indonesia*, 17(2):54-59.
- Komalasari, K. 2009. *Pengaruh perbandingan volume darah dan lisis buffer dengan kecepatan sentrifugasi terhadap kualitas produk DNA pada sapi Friesian Holstein (FH)*. Bogor: ITB.

- Lo, Y. M. Dennis, R. W. K. Chiu, K. C. Allen Chan. 2006. *Clinical applications of PCR 2nd ed.* Hongkong: Human Press.
- Mayasari, E. 2005. *Pseudomonas aeruginosa: karakteristik, infeksi, dan penanganan.* Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Mims, C.A., J. H. L. Playfair, I. M. Roitt, D. Wakelin, R. Williams. 1998. *Medical microbiology, 2nd edition.* London: Mosby.
- Mulya, M. Arif. 2011. *Amplifikasi gen penyandi hemolysin dari bakteri Vibrio harveyi dengan teknik PCR (Polymerase Chain Reaction).* Bogor: IPB.
- NCBI. 2007. *Bacillus cereus.* [Internet]. U.S.A (ID): [Diunduh 16 Agustus 2016]. Tersedia pada: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Nolan, T., R. Muerller, S. Bustin. 2007. *QPCR: targets preparation in: Mackay IM (ed.). Real-Time PCR in microbiology from diagnosis to characterictization.* UK: Caister Akademik Press.
- Padmadi, B. 2009. *Identifikasi sifat aroma tanaman padi menggunakan marka berbasis gen aromatik.* Bogor: IPB.
- Paweli, N. Elfiana. 2015. *Toksin ETE, Nhe, EntK dan HBL dari Bacillus cereus.* Makassar: Universitas Hasanuddin.
- Pelczar, M. J. dan E. C. S. Chan. 2008. *Dasar-dasar Mikrobiologi I.* Jakarta: UI Press.
- Pelt-Verkuil, E.V., Belkum, A.V., dan Hays, J.P. 2007. *Principles and technical aspects of PCR amplification.* Springer: Netherlands.
- Pracoyo, N.E., Damayanti, D. Parwati. 2006. Analisis mikrobiologik beberapa jenis makanan jajanan (Moko) di DKI Jakarta. *J. CDK*, 152: 41-42.
- Prezioso, Vincent, dan A. Jahns. 2013. *Using gradient PCR to determine the optimum annealing temperature.* USA: Eppendorf Scientific Inc.
- Priambodo, R. 2011. *Rekontruksi primer polymerase chain reaction (PCR) spesifik untuk gen transferin pada ikan nila (Oreochromis niloticus).* Depok: Universitas Indonesia.
- Priyambodo, B. 2007. *Manajemen farmasi industri.* Yogyakarta: Global Pustaka Utama.


- Purnami, S., Syaifuddin, M., dan Giyatmi. 2009. Penandaan DNA dengan 32p untuk deteksi resisten *Mycobacterium Tuberculosis* terhadap isoniazid. *Jfn*, 3(1): 12-18.
- Radji, M. 2006. *Penuntun praktikum mikrobiologi, edisi 2*. Depok: Universitas Indonesia.
- Riyanto. 2014. *Validasi dan verifikasi metode uji sesuai dengan ISO/IEC 17025 laboratorium pengujian dan kalibrasi*. Yogyakarta: Deepublish.
- Roux, K. H. 2009. Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(4): 1-6.
- SAC. Singapore Accreditation Council. 2002. *Method validation of microbiological methods*. SAC-SINGLAS 002. Singapore. <http://www.sac-accreditation.gov.sg>.
- Sambrook, J., Fritschi E.F., dan Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., dan D. W. Russell. 2001. *Molekuler cloning, a laboratory manual 3rd edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt, R.H., Goodrich R.M., Archer D.L., dan Schneider K.R. 2003. *General overview of the causative agents of foodborne illness*. USA: University of Florida.
- Soejoedono, R. 2002. *Bakteri pembentuk spora*. Bahan kuliah mata ajaran penyakit yang ditularkan oleh bahan pangan.
- Soemarno. 2000. *Isolasi dan identifikasi bakteri klinik, edisi ketiga*. Akademi Analis Kesehatan Yogyakarta. Yogyakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Stasiak, K. Oliwa, C.L Molnar, K. Arshak, M. Bartoszcze, dan C.C. Adley. 2009. Development of a PCR assay for identification of The *Bacillus cereus* group species. *J. Appl. Microbiol.*, 108 (2010): 266-273.
- Sudarwanto, M. B. 2011. *Higiene pangan: modul 2 [bahan ajar]*. Bogor: Institute Pertanian Bogor.
- Sue, David, Alex R. Hoffmaster, Tinja Popovic, dan Patricia P. Wilkins. 2006. Capsule production in *Bacillus cereus* strains associated with severe pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 6: 3426-3428.

- Sulistyaningsih, E. 2007. *Polymerase chain reaction (PCR): era baru diagnosis dan manajemen penyakit infeksi*. Jember: Universitas Jember.
- Sunandar, D. dan Imron. 2010. Optimalisasi template DNA genom udang galah, *Macrobrachium rosenbergii* dalam proses PCR-RAPD. *Loka Riset dan Teknologi Budidaya Perikanan Air Tawar*, 561-565.
- Sunarno, F. Muna, N. Fitri, A. Malik, A. Karuniawati, dan A. Soebandrio. 2014. Metode cepat ekstraksi DNA *Corynebacterium diphtheriae* untuk pemeriksaan PCR. *Bul. Penelit. Kesehat.*, 42(2): 85-92.
- Tharir, R., J. Munarso, dan S. Usmiati. 2005. *Review hasil-hasil penelitian keamanan pangan produk peternakan*. Bogor: Puslitbang Peternakan.
- Thermo Fisher Scientific. 2017. *Pseudomonas agar base*. Thermo Fisher Scientific: Wilmington
- Ticknor, L. O., Kolsto, A. B., Hill, K. K., Keim, P., Laker, M. T., Tonks, M., et al. 2001. Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Soil Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(10): 4863–4873.
- Todar, K. 2011. *Bacillus cereus food poisoning*. [Internet]. U.S.A (ID): [Diunduh 13 November 2016]. Tersedia pada: <http://textbookofbacteriology.net/B.cereus.html>.
- Todar, K. 2012. *Structure and function of bacteria cells*. [Internet]. U.S.A (ID): [Diunduh 1 Juni 2017]. Tersedia pada: <http://textbookofbacteriology.net/B.cereus.html>.
- Trefil, J, dan Hazen, R. M. 2004. *Physics matter: an introduction to conceptual physic*. John Wiley an Sons Inc: United States Of America.
- USEPA. 2009. Method validation of U.S. environmental protection agency microbiological methods of analysis. FEM Document Number 2009-01.
- Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M. B., & Brozel, V. S. 2006. Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(7): 4970–4977.
- Vivikananda, E. 2014. Deteksi DNA babi dan DNA sapi dengan menggunakan metode *insulated isothermal polymerase chain reaction* (ii-PCR). Jakarta: Universitas Negeri Syarif Hidayatullah.

- Westermeier. 2004. *Electrophoresis in practice: a guide to theory and practice*. New Jersey: John Wiley and Sons inc.
- World Health Organization (WHO). 2015. Penyakit akibat keracunan makanan. Indonesia.
- Wijnands, L. M., J. B. Dufrenne, M. H. Zwietering, dan F. M. Van Leusden. 2006. Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. *Int. J. Food. Microbiol.*, 112: 120-128.
- Yulinery, Titin dan Novik Nurhidayat. 2015. Uji aktivitas antibakteri *Lactobacillus plantarum* terseleksi dari buah markisa (*Passiflora edulis*) dan kaitannya dengan gen plantarisin A (*plnA*). *J. Pros. Sem. Nas. Masy. Biodiv. Indon.*, 1(2): 270-277.
- Yusuf, Zuhriana K. 2007. Polymerase chain reaction (PCR). *Saintek*, 5(6).
- Yuwono, Triwibowo. 2002. *Biologi Molekuler*. Jakarta: Erlangga.
- Yuwono, Triwibowo. 2006. *Teori dan aplikasi polymerase chain reaction*. Yogyakarta: ANDI.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Izin Penelitian

**BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN**
Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta Pusat 10560 Indonesia
Telp. (021) 4244691, 4209221, 42887465, 42887351; Fax : 42887351
Email : riset.om@pom.go.id; Website : www.pom.go.id

SURAT KETERANGAN
Nomor : B-KP.11.73.08.17.0850

Yang bertanda tangan dibawah ini saya :

Nama : Sunarso, S.IP
NIP : 19600221 198003 1 001
Jabatan : Kepala Sub Bagian Tata Usaha, Pusat Riset Obat dan Makanan

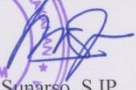
Dengan ini menerangkan bahwa :


Nama : Hazleini Misvayanty
NIM : 3425122202
Program Studi : Biologi
Universitas : Universitas Negeri Jakarta
Pembimbing : Eva Nikastri, STP, M.Si
Judul : Metode Analisis Bakteri *Polymerase Chain Reaction (PCR)* untuk mendeteksi Bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

telah melakukan kegiatan Penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Pusat Riset Obat dan Makanan, Badan Pengawas Obat dan Makanan dari bulan Agustus 2016 sampai dengan bulan April 2017.

Demikian Surat Keterangan ini untuk diketahui dan dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jakarta, 1 Agustus 2017

Pusat Riset Obat dan Makanan
Kepala Sub Bagian Tata Usaha,

Sunarso, S.IP
NIP.19600221 198003 1 001



Lampiran 2. Komposisi dan Pembuatan Media

1. Media *Mannitol Egg Yolk Polymyxin* (MYP) agar

Media MYPA dibuat dengan melarutkan 21,5 g dalam 450 ml akuades berdasarkan cara yang tertera pada kemasan [Merck]. Media dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan hingga larut, selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dan pada tekanan 2 atm selama 15 menit.

Media yang telah disterilkan ditunggu hingga mencapai suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ untuk ditambahkan *egg yolk emulsion* dan *polymyxin B supplement*. *Egg yolk emulsion* tersebut terdiri dari kuning telur (30 ml/100 ml stok) dan *saline sterile* (70 ml/100 ml stok). Komposisi bahan dari media ini adalah 1 g ekstrak daging, 10 g pepton, 10 g manitol, 10 g NaCl, 0,025 g fenol merah, dan 12 g agar. Kemudian media dituang ke dalam cawan petri sebanyak ± 20 mL secara aseptis.

2. Media *Pseudomonas Agar Base* (PAB)

Media PAB dibuat dengan melarutkan 24,2 g media PAB agar dalam 500 ml akuades berdasarkan cara yang tertera pada kemasan [Merck] dan ditambahkan gliserol. Media dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan media ditambahkan gliserol, lalu dipanaskan hingga larut. Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dan pada tekanan 2 atm selama 15 menit.

Media yang telah disterilkan ditunggu hingga mencapai suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ untuk ditambahkan *Pseudomonas CN Supplement*. Komposisi media PAB dari media ini ialah *gelatin peptone* 16 g, *casein hydrolysate* 10 g, K_2SO_4 10 g, MgCl_2 1,4 g, agar 11 g dan komposisi *Pseudomonas CN Supplement* adalah *cetrimide* 100 mg dan sodium nalidixate 7,5 mg. Kemudian medium dituang ke dalam cawan petri sebanyak ± 20 mL secara aseptis.

3. Media *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA)

Media EMBA dibuat dengan melarutkan 37,5 g dalam 1000 ml akuades berdasarkan cara yang tertera pada kemasan [Merck]. Media dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*, lalu dipanaskan hingga larut. Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dan pada tekanan 2 atm selama 15 menit.

Media yang telah disterilkan ditunggu hingga mencapai suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$. Komposisi media EMBA dari media ini ialah pepton 10 g, laktosa 10 g, dipotasium hidrogen fosfat 2 g, eosin 0,4 g, metilen biru 0,065 g, agar 15 g. Kemudian medium dituang ke dalam cawan petri sebanyak ± 20 mL secara aseptis.

4. Media *Mannitol Salt Agar* (MSA)

Media MSA dibuat dengan melarutkan 111 g dalam 1000 ml akuades berdasarkan cara yang tertera pada kemasan [Merck]. Media dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*, lalu dipanaskan hingga larut. Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dan pada tekanan 2 atm selama 15 menit.

Media yang telah disterilkan ditunggu hingga mencapai suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$. Komposisi media MSA dari media ini ialah 'lab-lemco powder' 1 g, pepton 10 g, manitol 10 g, NaCl 75 g, fenol merah 0,025, agar 15 g. Kemudian medium dituang ke dalam cawan petri sebanyak ± 20 mL secara aseptis.

5. Media *PALCAM Agar Base*

Media PALCAM dibuat dengan melarutkan 34,5 g dalam 500 ml akuades berdasarkan cara yang tertera pada kemasan [Merck]. Media dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*, lalu dipanaskan hingga larut. Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dan pada tekanan 2 atm selama 15 menit.

Media yang telah disterilkan ditunggu hingga mencapai suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ untuk ditambahkan *PALCAM Selective Supplement*. Komposisi media PALCAM dari media ini ialah *colombia blood agar base* 39 g, *yeast extract* 3 g, glukosa 0,5 g, *aesculin* 0,8 g, *ferric ammonium citrate* 0,5 g, manitol 10 g, fenol merah 0,08, *lithium chloride* 15 g, dan komposisi *PALCAM selective supplement* adalah *polymyxin B* 10 mg, *acriflavine hydrochloride* 5 mg, *cetrazidime* 20 mg. Kemudian medium dituang ke dalam cawan petri sebanyak ± 20 mL secara aseptis.

6. Media X.L.D. Agar

Media XLDA dibuat dengan melarutkan 53 g dalam 1000 ml akuades berdasarkan cara yang tertera pada kemasan [Merck]. Media dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*, lalu dipanaskan hingga larut. Media ditunggu hingga mencapai suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$. Komposisi media XLDA dari media ini ialah *yeast extract* 3 g, *L-lysine HCL* 5 g, *xylose* 3,75 g, *lactose* 7,5 g, *sucrose* 7,5 g, *sodium desoxycholate* 1 g, *NaCl* 5 g, *sodium thiosulphate* 6,8 g, *ferric ammonium citrate* 0,8 g, . Kemudian medium dituang ke dalam cawan petri sebanyak ± 20 mL secara aseptis.

7. *Thiosulfate citrate bile salts sucrose* (TCBS) Agar

Media TCBS dibuat dengan melarutkan 88 g dalam 1000 ml akuades berdasarkan cara yang tertera pada kemasan [Merck]. Media dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*, lalu dipanaskan hingga larut. Media ditunggu hingga mencapai suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$. Komposisi media TCBS dari media ini ialah *yeast extract* 5 g, *bacteriological peptone* 10 g, *sodium thiosulphate* 10 g, *sodium citrate* 10 g, *ox bile* 8 g, *sucrose* 20 g, *NaCl* 10 g, *ferric citrate* 1 g, *bromothymol blue* 0,04 g, *thymol blue* 0,04 g, agar 14 g. Kemudian medium dituang ke dalam cawan petri sebanyak ± 20 mL secara aseptis.

8. Media *Nutrient Broth*

Media NB dibuat dengan melarutkan 13 g media NB agar dalam 1000 ml akuades berdasarkan cara yang tertera pada kemasan [Merck]. Media dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan pipet media ke dalam tabung reaksi sebanyak ± 5 ml. Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dan pada tekanan 2 atm selama 15 menit. Komposisi bahan per liter dari media ini ialah ekstrak daging 3 g, pepton 5 g, agar 15 g, dan akuades 1000 ml.

9. Media *Brain Heart Infusion Agar*

Media BHIA dibuat dengan melarutkan 47 g media PAB agar dalam 1000 ml akuades berdasarkan cara yang tertera pada kemasan [Merck]. Media dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan hingga larut. Media

disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dan pada tekanan 2 atm selama 15 menit. Komposisi media ini per liter adalah *brain infusion solids* 12,5 g, *beef heart infusion solids* 10 g, *proteose peptone* 10 g, NaCl 5 g, glukosa 2 g, *disodium phosphate* (DSP) 2,5 g, dan agar 10 g. Kemudian medium dituang ke dalam cawan petri sebanyak ±20 mL secara aseptis.

Lampiran 3. Pengenceran Primer 100 μM

Stok primer yang ada memiliki konsentrasi 100 μM sedangkan konsentrasi primer yang dibutuhkan pada reaksi PCR adalah bervariasi. Oleh karena itu, stok primer harus diencerkan dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$M_1 * V_1 = M_2 * V_2$$

$$100 \mu\text{M} * V_1 = 20 \mu\text{M} * 100 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 20 \mu\text{l} \rightarrow \text{primer } 100 \mu\text{M}$$

$$= 100 \mu\text{l} - 20 \mu\text{l} = 80 \mu\text{l} \rightarrow \text{TE}$$

Lampiran 4. Pembuatan TBE

TBE 0,5x untuk *B. cereus*

1. TBE 10x diukur sebanyak 50 ml dan dimasukkan ke dalam botol schott duran 1000 ml.
2. Aquades steril sebanyak 950 ml ditambahkan ke dalam botol schott duran 1000 ml.
3. Botol ditutup dan dikocok hingga TBE 0,5x dan aquades tercampur merata.

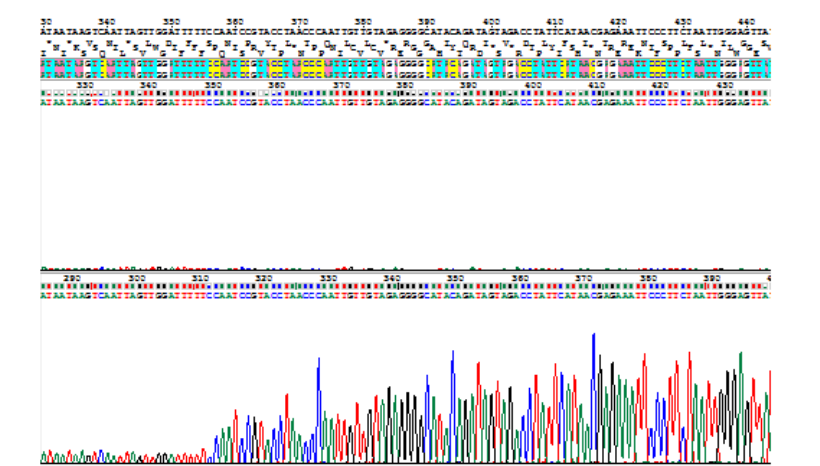
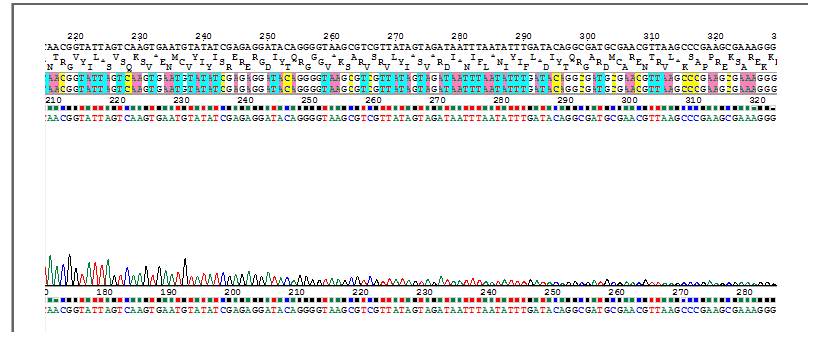
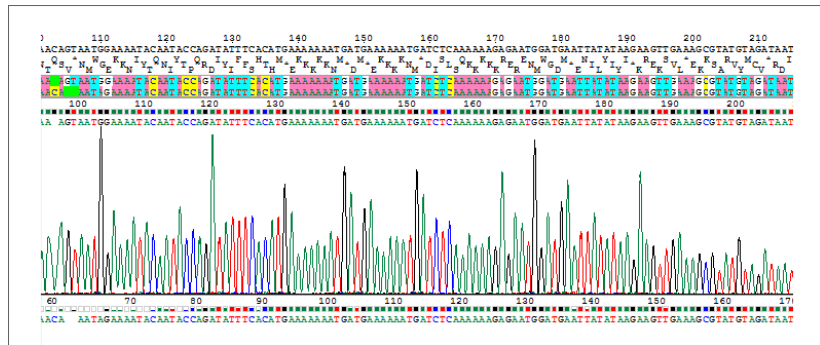
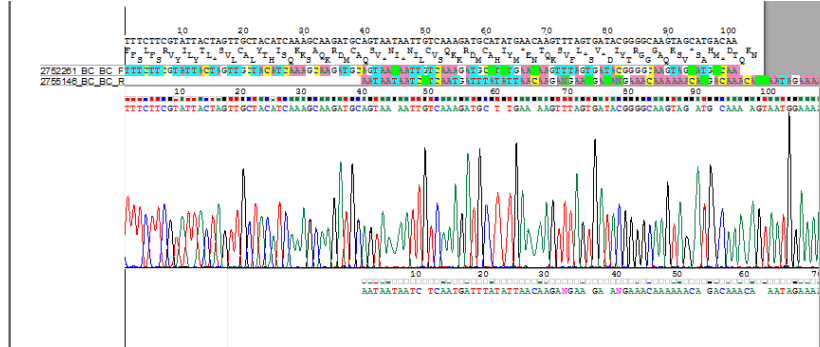
TBE 1x untuk *P. aeruginosa*

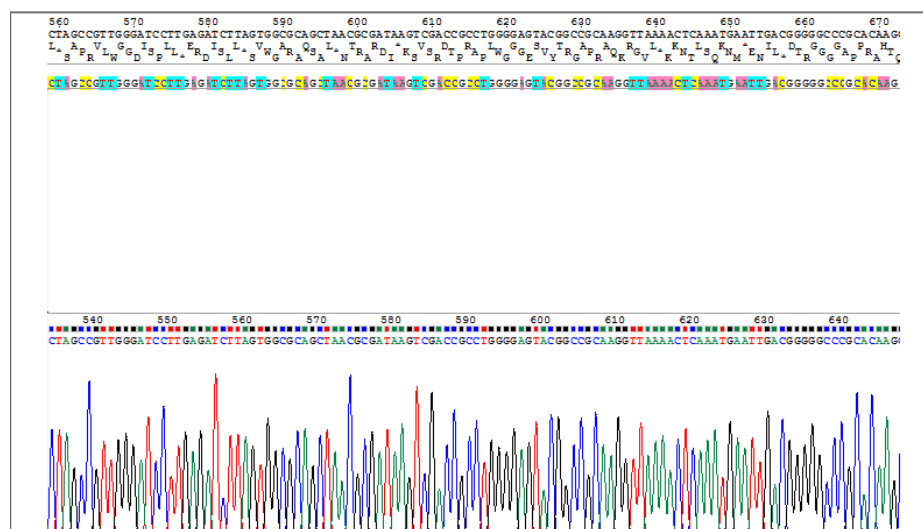
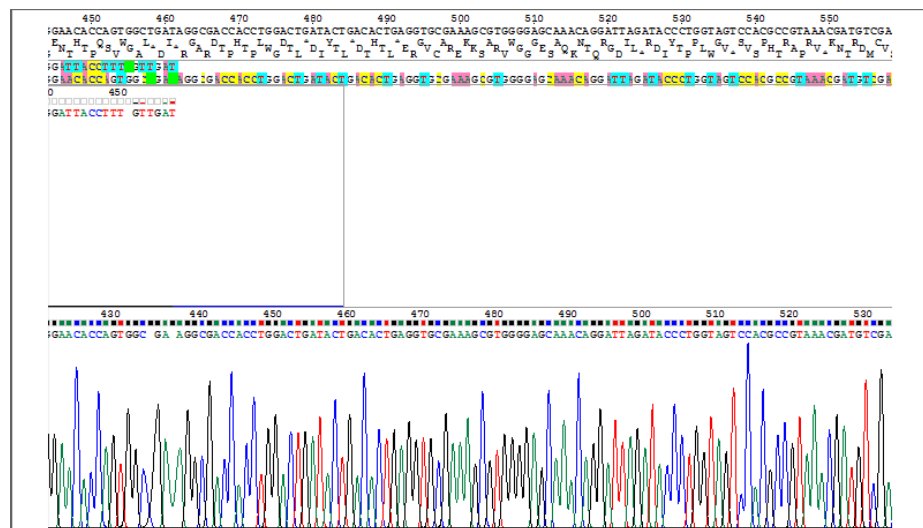
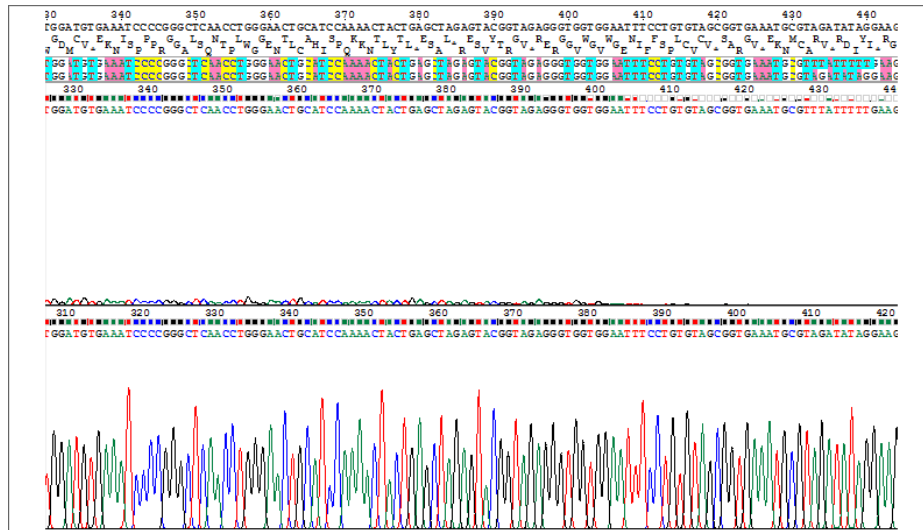
4. TBE 10x diukur sebanyak 100 ml dan dimasukkan ke dalam botol schott duran 1000 ml.
5. Aquades steril sebanyak 900 ml ditambahkan ke dalam botol schott duran 1000 ml.
6. Botol ditutup dan dikocok hingga TBE 1x dan aquades tercampur merata.

Lampiran 5. Pembuatan Gel Agarosa 1,5%

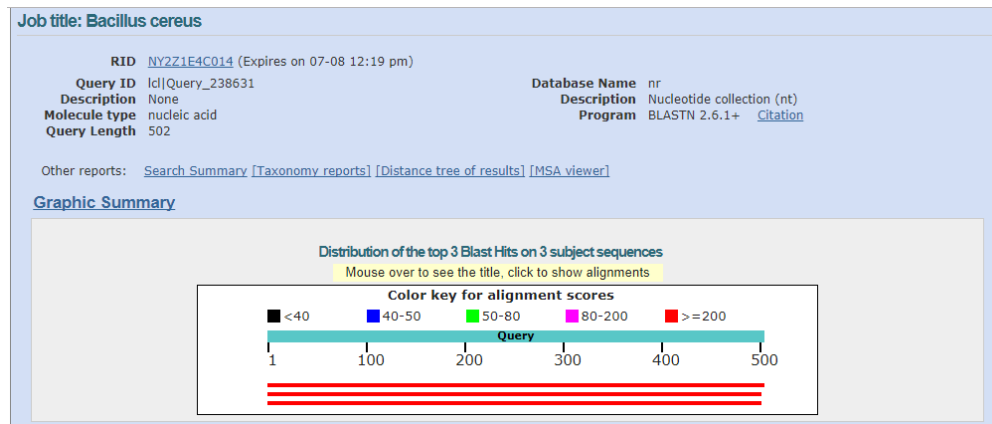
1. Agarosa bubuk ditimbang 1,5 gram untuk pembuatan agarose 100 ml dan dimasukkan ke dalam botol erlenmeyer 250 ml.
2. TBE 0,5x (*B. cereus*) dan TBE 1x (*P. aeruginosa*), ditambahkan sebanyak 100 ml ke dalam botol erlenmeyer.
3. Botol erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil, lalu dihomogenkan dan dipanaskan hingga larut sampai agarosa bubuk benar-benar larut.
4. Tunggu hingga mendidih dan larut sempurna.
5. Diamkan sampai suhu 50⁰C, kemudian ditambahkan fluotosafe 4-6 µL/100 µL.
6. Sisir dimasukkan ke dalam cetakan gel.
7. Gel dituang dan jangan ada gelembung udara. Lalu, ditunggu sekitar 20 menit hingga mengeras.
8. Sisir dilepas dan gel diletakkan ke dalam alat elektroforesis yang kemudian diisi dengan *buffer* TBE 0,5x (*B. cereus*) dan TBE 1x (*P.aeruginosa*) hingga terendam.

Lampiran 6. Hasil Sequencing Isolat *B. cereus*





Lampiran 8. Hasil BLAST *B. cereus*



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792, complete genome	865	865	100%	0.0	98%	CP021061.1
Bacillus cereus ATCC 14579, complete genome	837	837	99%	0.0	97%	AE016877.1
Bacillus toyonensis BCT-7112, complete genome	676	676	99%	0.0	91%	CP008863.1

Bacillus cereus ATCC 14579, complete genome
 Sequence ID: [AE016877.1](#) Length: 5411809 Number of Matches: 1

Range 1: 1582617 to 1583108 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
837 bits (453)	0.0	485/499 (97%)	7/499 (1%)	Plus/Plus

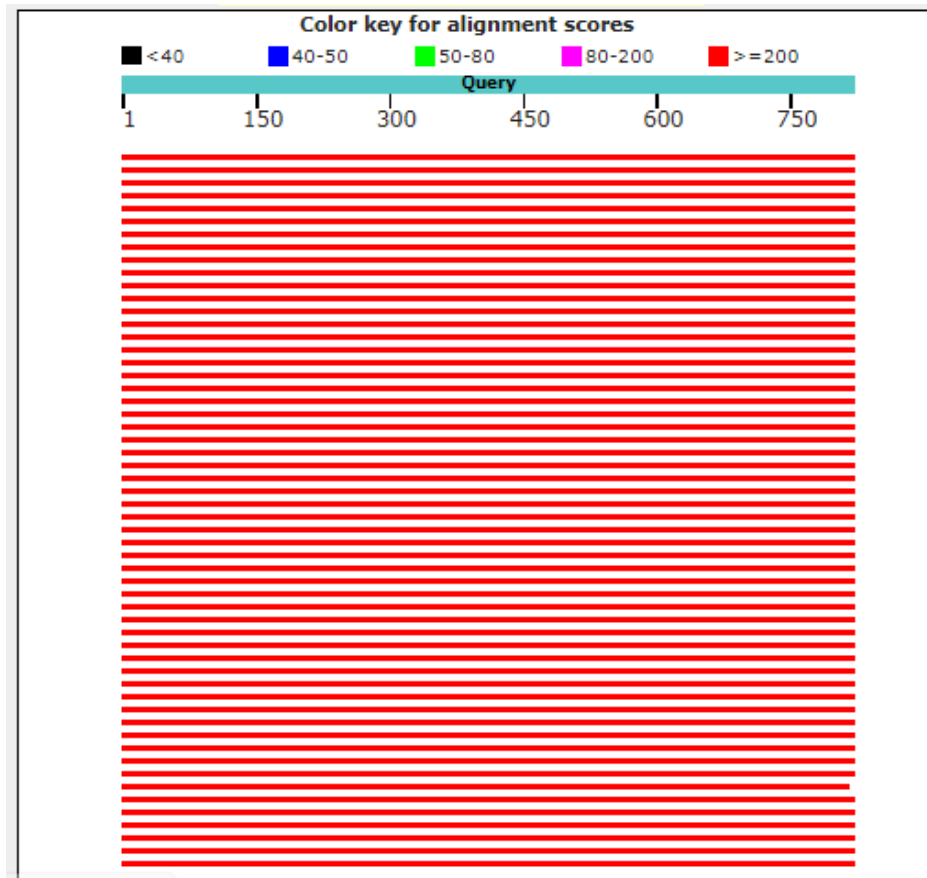
Features: [Chemotaxis motB protein](#)

```

Query 1      TTTCTCGTATTACTAGTTGCTACATCAAAGCAAGTGCAGTAATAATTGTCAAAGATGC 60
Sbjct 1582617 TTTCTTTGTATTACTAGTTGCTACATCAAAGCAAGTGCAGTAA-AAATTGTCAAAGATGC 1582675
Query 61     ATATGAACAAGTTTAAAGTACAGGGGCAAGTAGCATGACAAACAGTAATGGAAAAACAA 120
Sbjct 1582676 -T-TGAA-AAGTTTAAAGTACAGGGGCAAGTAG-ATG-CAAA-AGTAATGGAAAAACAA 1582729
Query 121    TACCAGATATTTACATGAAAAAATGATGAAAAAATGATTTCAAAAAAGAGAATGGATG 180
Sbjct 1582730 TACCGGATATTTACATGAAAAAATGATGAAAAAATGATTTCAAAAAAGAGAATGGATG 1582789
Query 181    AATTATATAAGAAGTTGAAAGCGTATGTAGATAATAACGGTATTAGTCAAGTGAATGTAT 240
Sbjct 1582790 AATTATATAAGAAGTTGAAAGCGTATGTAGATAATAACGGTATTAGTCAAGTGAATGTAT 1582849
Query 241    ATCGAGAGGATACAGGGGTAAGCGTGTATAGTAGATAAATTTAATTTGATACAGGCG 300
Sbjct 1582850 ATCGAGAGGATACAGGGGTAAGCGTGTATAGTAGATAAATTTAATTTGATACAGGCG 1582909
Query 301    ATGCGAACGTTAAGCCCGAAGCGAAAGGGATAAAGTCAATTAGTTGGATTTTCCAAT 360
Sbjct 1582910 ATGCGAACGTTAAGCCCGAAGCGAAAGGGATAAAGTCAATTAGTTGGATTTTCCAAT 1582969
Query 361    CCGTACCTAACCCAAATTTGTTAGAGGGGCATACAGATAGTAGACCTATTCATAACGAGA 420
Sbjct 1582970 CCGTACCTAACCCAAATTTGTTAGAGGGGCATACAGATAGTAGACCTATTCATAACGAGA 1583029
Query 421    AATTCCCTTCTAATTGGGAGTTATCTTCAGCACGAGCGGCAATATGATTCACCAITTTAA 480
Sbjct 1583030 AATTCCCTTCTAATTGGGAGTTATCTTCAGCACGAGCGGCAATATGATTCACCAITTTAA 1583089
Query 481    TTGAAGTGTATAATGTGGA 499
Sbjct 1583090 TTGAAGTGTATAATGTGGA 1583188
  
```

[Related Information](#)

Lampiran 9. Hasil BLAST isolat *P. aeruginosa*



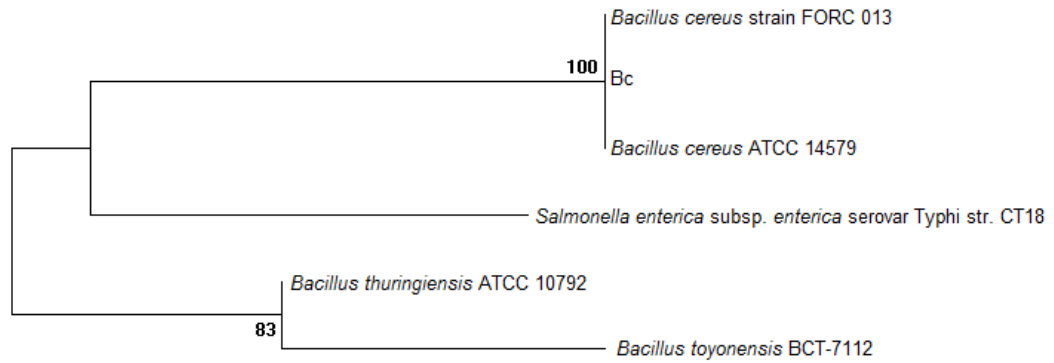
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain JCM5962(T) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1474	1474	100%	0.0	99%	KX946966.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain DSM 50071 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1474	1474	100%	0.0	99%	KT825518.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa DSM 50071, complete genome	1474	5898	100%	0.0	99%	CP012001.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa genome assembly NCTC:10332, chromosome : 1	1474	5898	100%	0.0	99%	LN831024.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa partial 16S rRNA gene, type strain DSM 50071T	1474	1474	100%	0.0	99%	LN681564.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain DSM 50071 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1474	1474	100%	0.0	99%	NR_117678.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain NBRC 12689 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1474	1474	100%	0.0	99%	NR_113599.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 5962	1474	1474	100%	0.0	99%	LC069033.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain ATCC 10145 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1474	1474	100%	0.0	99%	NR_114472.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas quezennai strain RA26 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1447	1447	100%	0.0	99%	NR_114957.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas otitidis strain MCC10330 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1447	1447	100%	0.0	99%	NR_043289.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas resinovorans strain ATCC 14235 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1447	1447	100%	0.0	99%	NR_112062.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas alcaligenes strain ATCC 14909 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1437	1437	100%	0.0	98%	NR_114472.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas alcaligenes strain NBRC 14159 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1437	1437	100%	0.0	98%	NR_113646.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas alcaligenes 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1435	1435	100%	0.0	98%	NR_117827.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas alcaligenes strain IAM 12411 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1400	1400	100%	0.0	98%	NR_043419.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain DSM 50071 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1400	1400	100%	0.0	98%	NR_026078.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas oryzae strain KCTC 32247 genome assembly, chromosome: 1	1397	9763	100%	0.0	98%	LT629751.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas quandonqensis strain SqZ-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1391	1391	100%	0.0	97%	NR_118458.1

Pseudomonas aeruginosa strain ATCC 10145 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [NR_114471.1](#) Length: 1489 Number of Matches: 1

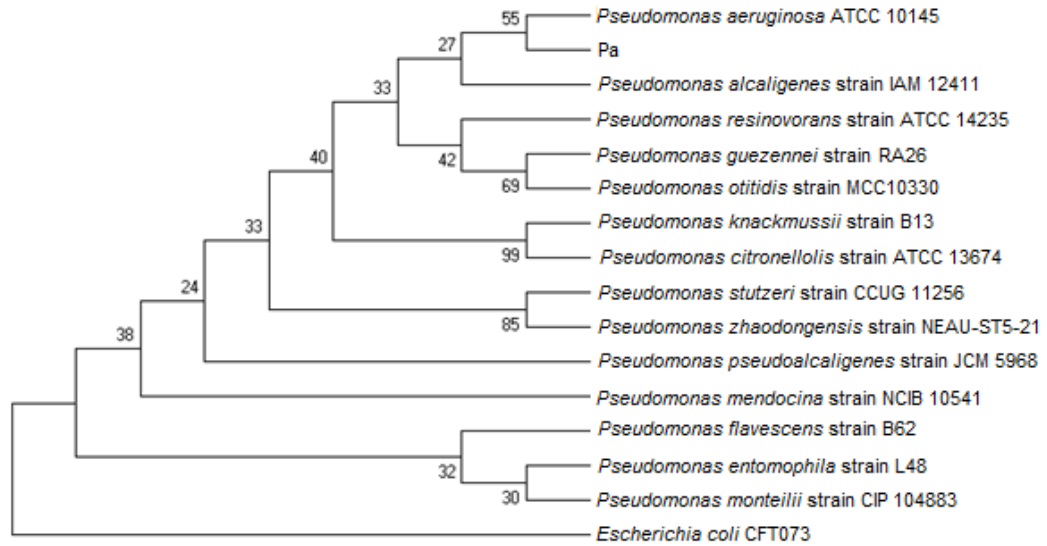
[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 260 to 1072		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1474 bits(798)	0.0	813/819(99%)	6/819(0%)	Plus/Plus	
Query 1	AGGCGACGATCCGTA	ACTGGTCTGAGAGGGATGATTCAGTCACACTGGAACTGAGACACG		60	
Sbjct 260	AGGCGACGATCCGTA	ACTGGTCTGAGAGG-ATGA-TCAGTCACACTGGAACTGAGACACG		317	
Query 61	GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGAT		120		
Sbjct 318	GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAA-GCCTGAT		376		
Query 121	CCAGGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAG		180		
Sbjct 377	CCA-GCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAG		435		
Query 181	GAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTA		240		
Sbjct 436	GAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTA		495		
Query 241	ACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC		300		
Sbjct 496	ACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC		555		
Query 301	GTAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA		360		
Sbjct 556	GTAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA		615		
Query 361	ACTGCATCCAAAACACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGC		420		
Sbjct 616	ACTGCATCCAAAACACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGC		675		
Query 421	GGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCTGATAGGCGACCACTGGACTGA		480		
Sbjct 676	GGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGC-GA-AGGCGACCACTGGACTGA		733		

Lampiran 10. Hasil Pohon Filogeni *B. cereus***Keterangan :**

Pohon filogeni gen *motB* (motility B protein) *Bacillus cereus* dengan kontruksi filogeni menggunakan metode *neighbor-joining* dan analisis *bootstrap* (1.000 *replicates*) menggunakan model *maximum composite likelihood* dalam software MEGA5.

Lampiran 11. Hasil Pohon Filogeni *P. aeruginosa*



Keterangan :

Pohon filogeni gen 16S rRNA *Pseudomonas aeruginosa* dengan kontruksi filogeni menggunakan metode *neighbor-joining* dan analisis *bootstrap* (1.000 replicates) menggunakan model *maximum composite likelihood* dalam software MEGA5.

**Lampiran 12. Hasil Optimasi dan Validasi Metode Analisis untuk Deteksi
B.cereus dan *P. aeruginosa***

Tahapan Kerja	Keterangan
Penyegaran Isolat dan Purifikasi Kultur Bakteri	
<ul style="list-style-type: none"> - Isolat yang digunakan adalah <i>B. cereus</i> ATCC 11778 dan <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 - Media selektif : Media MYPA: <i>B. cereus</i> Media PAB : <i>P. aeruginosa</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Penyegaran isolat dilakukan pada media NB - Media MYPA : koloni tipikal berwarna merah mudah dengan presipitasi disekelilingnya - Media PAB : koloni tipikal berwarna krim–kuning dengan pigmentasi kehijauan
Ekstraksi DNA	
<ul style="list-style-type: none"> - Ekstraksi DNA dengan menggunakan teknik <i>boiling</i> selama 15 menit dalam suhu 100⁰C - kemudian dimasukkan ke dalam <i>freezer</i> selama 2 menit sebagai <i>cold shock</i> - Suspensi tersebut disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipindahkan (larutan yang terlihat bening) ke dalam <i>microtube</i> (1,5 ml) steril yang baru. 	<ul style="list-style-type: none"> - Supernatan DNA diukur absorbansinya A260 nm/A280 nm dengan menggunakan <i>Nanodrop Spectrophotometer</i> - konsentrasi DNA dengan tingkat kemurnian 1,8-2,0 nm
Optimasi Konsentrasi Primer	
Hasil amplifikasi PCR menunjukkan bahwa: <ul style="list-style-type: none"> - konsentrasi primer 20 μM - konsentrasi DNA 50 ng/μl 	Kondisi optimal untuk membentuk pita DNA <i>B. cereus</i> yang berukuran 575 bp dan pita DNA <i>P. aeruginosa</i> berukuran 956 bp
Optimasi Suhu Annealing	
Komposisi Reaksi PCR	Amplifikasi PCR dilakukan dengan volume akhir 25 μ L yang terdiri dari: 9 μ l <i>Nuclease Free Water</i> (NFW), 0,5 μ l primer 0,4 μ M, 12,5 μ l <i>GoTaq Green Master Mix</i> dan 2,5 μ l DNA
Kondisi PCR <i>B. cereus</i> (suhu <i>annealing</i> 55 ⁰ C)	<ul style="list-style-type: none"> - Pra–denaturasi (94°C, selama 2 menit) - Denaturasi (94°C, selama 1 detik) - <i>Annealing</i> (55°C, selama 1 menit) - Elongasi (72°C, selama 2 menit) - <i>Final extention</i> pada suhu 72°C

	selama 5 menit
Kondisi PCR <i>P. aeruginosa</i> (suhu <i>annealing</i> 59°C)	<ul style="list-style-type: none"> - Pra-denaturasi (95°C, selama 2 menit) - Denaturasi (94°C, selama 20 detik) - <i>Annealing</i> (59°C, selama 20 detik) - Elongasi (72°C, selama 40 detik) - <i>Final extention</i> pada suhu 72°C selama 1 menit.
Visualisasi Produk PCR	
Agarose 1,5%	Larutan TBE 0,5X untuk <i>B. cereus</i> dan TBE 1X untuk <i>P. aeruginosa</i>
Validasi Metode Secara Molekuler	
Spesifisitas	<p>Hasil amplifikasi primer</p> <ul style="list-style-type: none"> - BCFomp1/BCRomp1 mengamplifikasi DNA <i>B. cereus</i> dengan membentuk pita DNA berukuran 575 bp - PA-SS-F/PA-SS-R mengamplifikasi DNA <i>P. aeruginosa</i> dengan membentuk pita DNA berukuran 956 bp
Penentuan <i>Limit of Detection</i> (LOD)	<ul style="list-style-type: none"> - Hasil amplifikasi PCR untuk menentukan DNA <i>B. cereus</i> sampai dengan konsentrasi 1 ng/μl - Hasil amplifikasi PCR untuk menunjukkan konsentrasi DNA <i>P. aeruginosa</i> adalah 0,5 ng/μl
Penentuan Sensitivitas, Spesifisitas, Positif Palsu dan Negatif Palsu	Uji sensitivitas dan spesifisitas dengan metode PCR mencapai 100% dengan tingkat positif palsu dan negatif palsu yaitu sebesar 0%.
<i>Sequencing</i> Produk PCR dan BLAST	<p>Berdasarkan hasil BLAST dari situs NCBI menunjukkan bahwa:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>similarity</i> tertinggi isolat <i>B. cereus</i> adalah 97% dengan spesies terdekatnya <i>B. cereus</i> ATCC 14579 - 99% dengan spesies terdekatnya <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145. - <i>Maximum identity</i> masing-masing isolat <i>B. cereus</i> dan <i>P. aeruginosa</i>

	<p>mencapai 99% dan 100%</p> <ul style="list-style-type: none">- Gaps pada urutan basa nukleotida <i>B. cereus</i> (1%) dan <i>P. aeruginosa</i> (0%)- <i>E-value</i> sebesar nol menunjukkan bahwa data memiliki kecocokan yang signifikan
--	--

DAFTAR RIWAYAT HIDUP



HAZLEINI MISVAYANTY. Penulis dilahirkan di Padang pada tanggal 31 Maret 1994 dari ayah Drs. H. Hazniel Haroen, M.Si. dan Ibu Misnawati. Penulis adalah anak kedua dari dua bersaudara. Penulis sekarang bertempat tinggal di Jalan Rasamala II Blok. C. 930, Margahayu, Bekasi Timur. Pendidikan formal yang pernah ditempuh adalah SDN Nusa Indah I, lulus tahun 2006. Kemudian melanjutkan di SMP Mandalahayu 304 Bekasi Timur sampai kelas 2 dan melanjutkan kelas 3 di SMPN 232 Jakarta Timur, lulus tahun 2009, lalu melanjutkan di SMA Diponegoro 1 Jakarta Timur, lulus pada tahun 2012. Tahun 2012, penulis diterima sebagai mahasiswa program S1 Biologi di Universitas Negeri Jakarta melalui jalur SNMPTN tulis.

Selama mengikuti perkuliahan, penulis mengikuti organisasi Kelompok Studi Kelautan CMC Acropora Biologi UNJ. Penulis mengikuti kegiatan Cakrawala Biologi di Gunung Bunder pada tahun 2012, Studi Ilmiah Biologi pada tahun 2013. Seminar yang pernah diikuti penulis diantaranya Seminar Nasional Biologi UNJ 2012 “Isu-Isu Kritis Lingkungan”; Workshop “*Analyzing Stem Cell Using Real Time PCR*” 2015.

Penulis pernah sekali mendapat penghargaan atas lomba yang diikuti: Hibah Program Kreativitas Mahasiswa bidang kewirausahaan dari DIKTI, dengan judul “*KERATIN (Masker Daun Pepaya dan Gelatin) Solusi Penghilang Bekas Jerawat dan Komedo*” pada tahun 2015.

Pada tahun 2014, penulis mengikuti kegiatan KKL (Kuliah Kerja Lapangan) dengan judul penelitian “Keberadaan *Escherichia coli* Sebagai Indikator Adanya Bakteri Patogen di Sumber Air Kawasan Karst” di Kawasan Hutan Wanagama, Gunung Kidul, Yogyakarta” dan PKL (Praktek Kerja Lapangan) “Uji Angka Lempeng Total (ALT) pada Pangan dan Obat Tradisional, serta Angka Lempeng Total (APM) pada Pangan” di Laboratorium Mikrobiologi, Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional (PPOMN) Jakarta, pada tahun 2015.

