

DAFTAR ISI

	Halaman
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Keracunan Pangan	5
B. <i>Listeria monocytogenes</i>	7
C. Gen <i>hly</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	8
D. <i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR)	9
1. Tahap Denaturasi	10
2. Tahap <i>Annealing</i>	10
3. Tahap <i>Extension</i>	10
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	15
A. Tempat dan Waktu Penelitian	15
B. Metode Penelitian	15
1. Alat	15
2. Bahan	16
3. Prosedur Kerja	16
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	23
A. Pembiakan Kultur Bakteri <i>Listeria monocytogenes</i>	23
B. Pengenceran Bertingkat dan <i>Artificial Contamination</i>	23
C. Isolasi dan Karakterisasi Isolat DNA <i>Listeria monocytogenes</i>	25
D. Hasil Optimasi Suhu <i>Annealing</i> primer <i>hly</i> dengan PCR Gradien	29
E. Uji Konfirmasi Primer <i>hly</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	30
F. Uji Spesifitas dan Uji Sensitivitas Primer Gen <i>hly</i>	33
G. Uji Konfirmasi Sampel Pangan dengan <i>Real-time</i> PCR	37
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	42
A. Kesimpulan	42
B. Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	51

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Distribusi insiden keracunan berdasarkan kelompok penyebab	6
Tabel 2. Klasifikasi <i>Listeria monocytogenes</i>	8
Tabel 3. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian isolat DNA	28
Tabel 4. Hasil uji spesifitas bakteri <i>Listeria monocytogenes</i>	34
Tabel 5. Konsentrasi dan nilai Ct uji sensitivitas primer <i>hly</i>	36
Tabel 6. Tabel nilai Ct amplifikasi dan Tm.	40

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. <i>Listeria monocytogenes</i> (CDC, 2020).....	7
Gambar 2. Urutan nukleotida gen <i>hly</i> <i>Listeria monocytogenes</i> (NCBI, 2020).....	9
Gambar 3. Tahapan amplifikasi dalam RT-PCR (Yourgenome.org, 2016)	10
Gambar 4. <i>SYBR Green</i> berinterkalasi dengan DNA.....	11
Gambar 5. Kurva amplifikasi RT-PCR Coklat: kurva amplifikasi sampel positif. Biru: threshold. Hitam: <i>baseline</i> (Rodríguez-Lázaro et al., 2013).....	12
Gambar 6. <i>Melting Curve</i> Dapat mendeteksi sampel non-spesifik seperti yang ditunjukkan oleh dua puncak tambahan di sebelah kiri (<i>ThermoFisher</i> , 2012)	13
Gambar 7. Kurva standar. Pengujian sensitifitas menghasilkan persamaan garis sebagai standar untuk kuantifikasi sampel (Tevfik Dorak & Pfaffl, 2007).	14
Gambar 8. <i>GeneJET Genomic DNA Purification Kit</i> (<i>ThermoFisher</i> , 2012).....	18
Gambar 9. Pengenceran bertingkat <i>Listeria monocytogenes</i> pada media BHI Agar. (A) Pengenceran 10^{-5} , (B) Pengenceran 10^{-6} , (C) Pengenceran 10^{-7} . Pengenceran terbaik berada pada pengenceran 10^{-7}	24
Gambar 10. Lisozim membelah peptidoglikan pada posisi β - 1,4 glikosida (Taylor et al., 2019).	26
Gambar 11. Hasil elektroforesis isolat DNA <i>Listeria monocytogenes</i> . (1) DNA Ladder 1 kb; (2) dan (3) Isolat Kultur Murni <i>Listeria monocytogenes</i>	27
Gambar 12. Hasil elektroforesis gel agarosa optimasi suhu <i>annealing</i> primer gen <i>hly</i> . (M) Marker DNA Ladder 100 bp, (-) Kontrol Negatif, (+) Kontrol positif gen <i>pef</i> <i>S. typhimurium</i> dengan ampikon 139 bp, (1) Pita fragmen pada suhu 57°C, (2) Pita fragmen pada suhu 58°C, (3) Pita fragmen pada suhu 59°C, (4) Pita fragmen pada suhu 60°C, (5) Pita fragment pada suhu 61°C.	30
Gambar 13. Kurva amplifikasi hasil uji konfirmasi primer <i>hly</i> <i>Listeria monocytogenes</i> . Nilai Ct Kontrol Positif <i>S.typhimurium</i> yaitu 12,55 dan 12,66 (duplo) sedangkan kultur murni <i>Listeria monocytogenes</i> 11,45 dan 11,62 dengan konsentrasi isolat 50ng/ μ L. Nilai Ct NTC yaitu 33,43 dan NFW+MM tidak muncul kurva sigmoid.	31
Gambar 14. Kurva puncak pelelehan uji konfirmasi. Nilai Tm <i>Listeria monocytogenes</i> 79,9°C dan 79,58°C (duplo). Nilai Tm <i>S.typhimurium</i> 84,15°C dan 84,01°C. Kontrol negatif NTC terbentuk 2 puncak yang dinamakan primer dimer dan tidak spesifik, kontrol negatif NFW+MM tidak terbentuk puncak.	32
Gambar 15. Hasil kurva amplifikasi uji spesifitas primer <i>hly</i> . Primer <i>hly</i> <i>Listeria monocytogenes</i> terhadap bakteri target dan non target.	34
Gambar 16. Kurva puncak pelelehan uji spesifitas primer <i>hly</i> . Primer <i>hly</i> spesifik mengenali <i>Listeria monocytogenes</i> pada Tm 79,51°C dengan konsentrasi isolat 50ng.....	35

Gambar 17. Kurva amplifikasi uji sensitivitas primer <i>hly Listeria monocytogenes</i> . Nilai Ct sampel terendah sebesar 23,96 dengan konsentrasi 0,0208ng/μL.	36
Gambar 18. Kurva standar uji sensitivitas primer <i>hly Listeria monocytogenes</i> . Diperoleh persamaan garis $y = -3.183x + 18.526$ dan $R^2 = 0,999$	37
Gambar 19. Kurva amplifikasi uji konfirmasi pangan dengan primer <i>hly Listeria monocytogenes</i> dengan konsentrasi isolat DNA 50ng/μL.....	38
Gambar 20. Kurva puncak pelelehan uji konfirmasi sampel pangan. Terbentuk satu puncak yang sama pada sampel susu, daging, jamur enoki produk Korea dan China.....	41

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Pemiakan Bakteri pada Media <i>Brain-Heart Infusion Broth</i>	51
Lampiran 2. Pemiakan Bakteri pada Media <i>Brain-Heart Infusion Agar</i>	51
Lampiran 3. Pembuatan <i>Glycerol Stock</i>	52
Lampiran 4. Pembuatan Lisis Buffer Bakteri Gram Positif.....	52
Lampiran 5. Inokulasi Bakteri pada Sampel Pangan.....	53
Lampiran 6. Isolasi Bakteri dengan <i>GeneJET Genomic DNA Purification Kit</i>	54
Lampiran 7. Pembuatan Gel Agarosa dan Tahapan Elektroforesis.....	56
Lampiran 8. Media BHI Agar.....	57
Lampiran 9. Media BHI <i>Broth</i>	57
Lampiran 10. Struktur Triton X-100.....	58
Lampiran 11. Struktur Tris-HCl.....	58
Lampiran 12. Struktur EDTA.....	58
Lampiran 13. Sampel Pangan.....	59
Lampiran 14. Proses Perebusan Sampel Pangan.....	59
Lampiran 15. Pengenceran Bertingkat Kultur Murni <i>Listeria monocytogenes</i>	59
Lampiran 16. Komposisi Bahan Uji <i>Real-Time PCR</i>	60
Lampiran 17. Proses Reaksi <i>Real-Time PCR</i>	60
Lampiran 18. Komposisi bahan untuk Uji PCR Gradien.....	61
Lampiran 19. Proses Reaksi PCR Gradien.	61
Lampiran 20. Membuat Larutan primer <i>hly</i> dari Larutan induk.....	61
Lampiran 21. Perhitungan Konsentrasi akhir primer.....	62
Lampiran 22. Perhitungan konsentrasi pengenceran bertingkat.	62
Lampiran 23. Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri.....	63
Lampiran 24. Kuantifikasi <i>Listeria monocytogenes</i> pada sampel pangan.....	63
Lampiran 25. Kuantifikasi <i>Limit of Detection (LOD)</i> primer <i>hly</i>	64