

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Pemiakan *Escherichia coli* pada media *Lactose Broth*

Bakteri dalam bentuk *kwik stick*

- Diambil 1-2x dengan kawat ose
- Dilarutkan kedalam 10mL larutan media cair LB steril
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam dengan aerasi *shaker* pada 150 rpm

Biakan bakteri (media keruh)

### Lampiran 2. Pemiakan *Shigella flexneri* pada media *Lactose broth*

Bakteri dalam bentuk *kwik stick*

- Diambil 1-2x dengan kawat ose
- Dilarutkan kedalam 10mL larutan media cair LB steril
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam dengan aerasi *shaker* pada 150 rpm

Biakan bakteri (media keruh)

### Lampiran 3. Pemiakan *Escherichia coli* pada media *Salmonella Shigella Agar (SSA)*

500µL *Overnight Culture* Bakteri

- Diambil menggunakan mikropipet 1000µL
- Dituang lalu diratakan ke seluruh permukaan agar menggunakan ose berbentuk L (*spread plate method*) pada medium SSA

Media agar tersuspensi

- Diinkubasi selama 24 jam (waktu optimum pertumbuhan bakteri) pada suhu 37°C
- Diamati hasil inkubasi

Hasil berupa koloni berwarna pink

#### Lampiran 4. Pemiakan *Shigella flexneri* pada media Mac Conkey Agar (MCA)

500 $\mu$ L Overnight Culture bakteri

- Diambil menggunakan mikropipet 1000 $\mu$ L
- Dituang lalu diratakan ke seluruh permukaan agar menggunakan ose berbentuk L (*spread plate method*) pada medium MCA

Media agar tersuspensi

- Diinkubasi selama 24 jam (waktu optimum pertumbuhan bakteri) pada suhu 37°C
- Diamati hasil inkubasi

Hasil biakan berupa koloni tidak berwarna

#### Lampiran 5. Pembuatan *lysis buffer* bakteri gram positif

Tris HCl pH 8

- Ditambahkan sebanyak 0,02 mL
- Ditambahkan 0,004 mL EDTA 0,5 M
- Diaduk hingga homogen
- Ditambahkan 0,012 mL Triton X-100
- Diaduk hingga homogen
- Ditambahkan lisozim hingga mencapai 1 mL
- Diaduk hingga homogen
- Disaring menggunakan *syringe* dan *micro filter*

Lysis buffer

#### Lampiran 6. Persiapan Sampel Pangan

10 g Daging dan Jamur

- Dibersihkan lalu dicacah
- Dimasukkan kedalam gelas kimia
- Disemprot alkohol 70%
- Ditambah 200 mL aquades
- Direbus sampai dihasilkan kaldu

5 mL Susu, Kaldu Daging dan Kaldu Jamur

- Dimasukkan kedalam 2 erlenmeyer

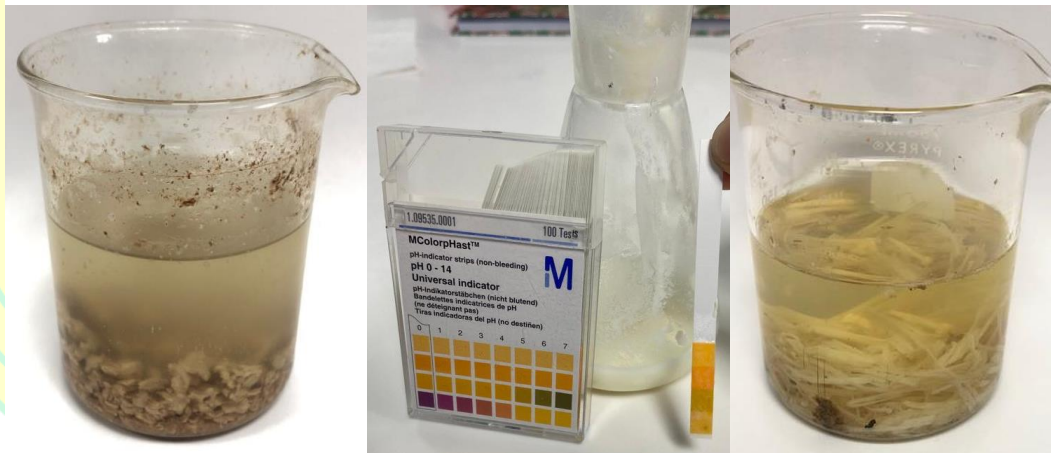
Erlenmeyer 1

- Ditambahkan 5 mL *Latose broth*
- Diinkubasi pada 37°C, 18 jam
- Diisolasi menggunakan kit komersil dengan protokol isolasi untuk bakteri gram positif
- Isolat dijadikan *template* sampel pangan *fresh*

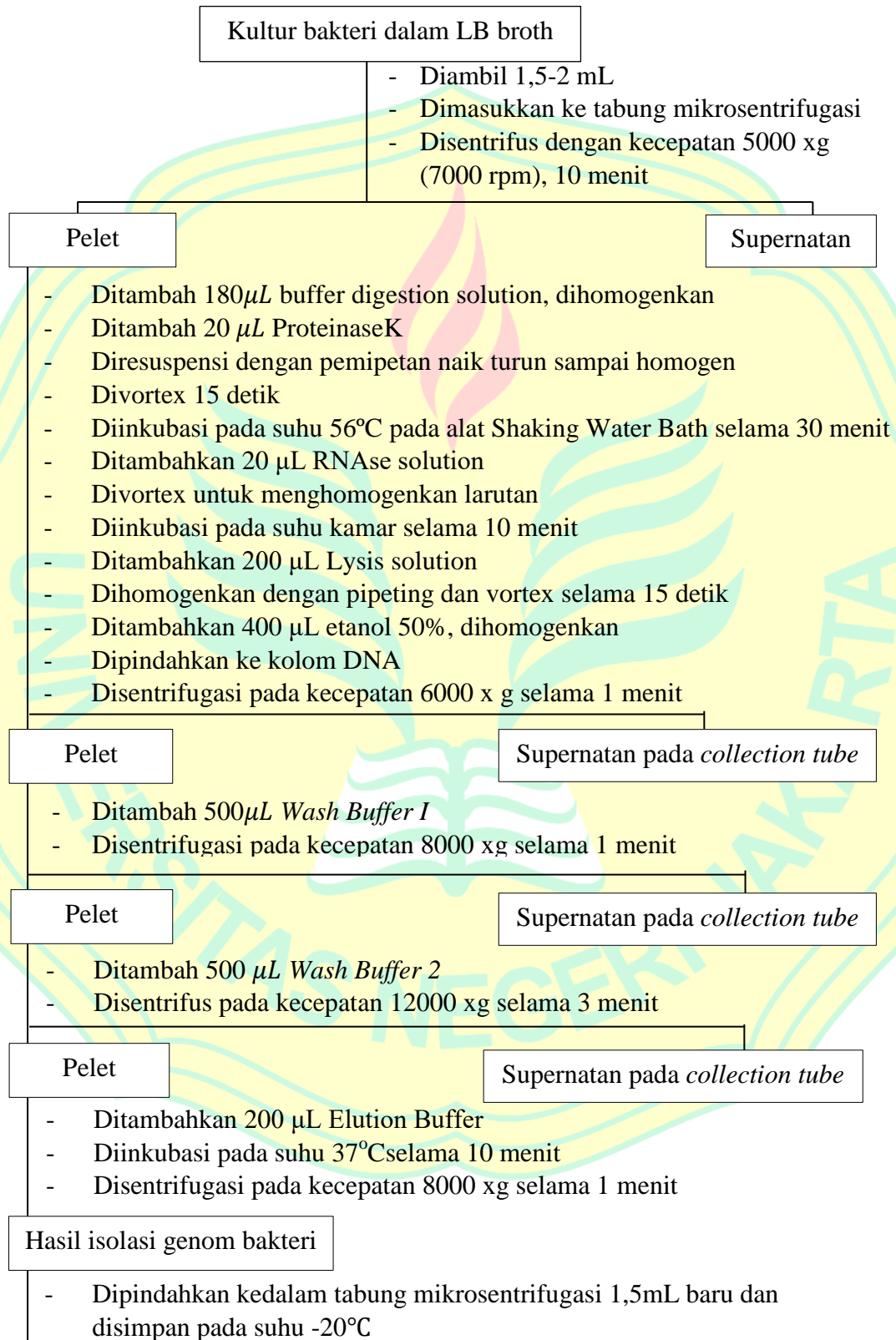
Erlenmeyer 2

- Didiamkan pada ruangan terbuka selama 3 hari
- Ditambahkan 5 mL Lactose broth
- Diinkubasi pada 37°C, 18 jam
- Diisolasi menggunakan kit komersil dengan protokol isolasi untuk bakteri gram positif
- Isolat dijadikan *template* sampel pangan basi

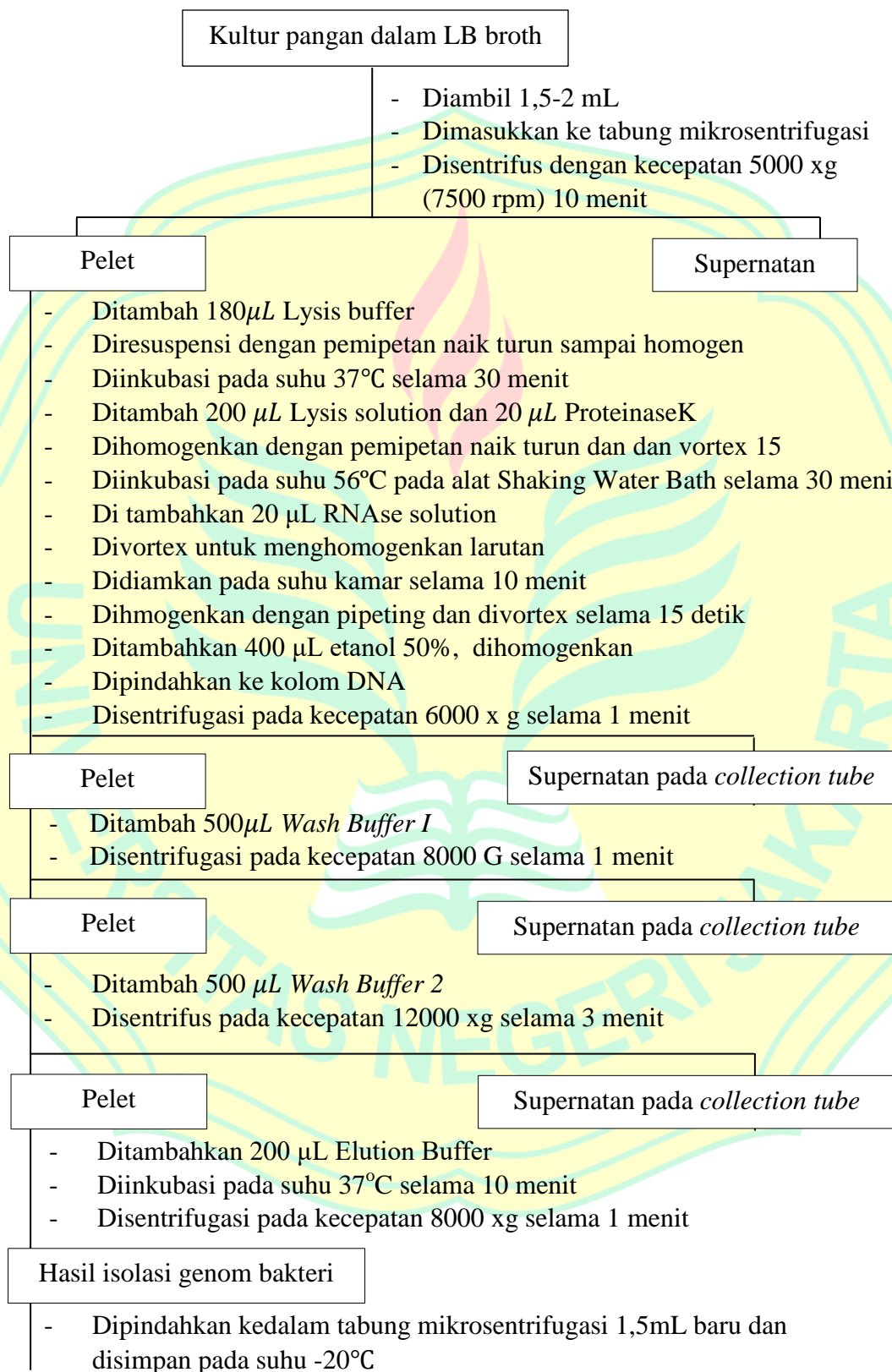
### Lampiran 7. Sampel pangan basi



**Lampiran 8. Isolasi DNA Bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri* dari Biakan Murni menggunakan *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* Protokol Isolasi Bakteri Gram Negatif**



**Lampiran 9. Isolasi DNA Sampel Pangan menggunakan *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* Protokol Isolasi Bakteri Gram Positif**



**Lampiran 10. Komposisi Campuran Reaksi pada Tahap PCR Gradien dan Real-Time PCR**

**Tabel 10. Komposisi campuran reaksi pada validasi suhu *annealing***

Sampel	Volume ( $\mu\text{L}$ )					Total Volume ( $\mu\text{L}$ )
	Master Mix	Primer forward	Primer reverse	Isolat DNA	Nuclease Free Water	
Kultur murni <i>Escherichia coli</i> primer <i>fim-C</i> 10 pmol	12,5	1	1	2	8,5	25
Kultur murni <i>Shigella flexneri</i> primer <i>ipaH</i> 10 pmol	12,5	1	1	2	8,5	25
No Template Control (NTC) Primer 1 pmol	12,5	1	1	-	10,5	25
NFW+MM	12,5	-	-	-	12,5	25

**Tabel 11. Komposisi campuran reaksi pada validasi Real-Time PCR, optimasi waktu pra-denaturasi dan konsentrasi primer, dan uji pada sampel pangan di pasaran**

Sampel	Volume ( $\mu\text{L}$ )					Total Volume ( $\mu\text{L}$ )
	Master Mix	Primer forward	Primer reverse	Isolat DNA	NFW	
Kultur murni <i>Escherichia coli</i> primer <i>fim-C</i> (variasi konsentrasi 5;10;15 pmol)	10	1	1	2	6	20
Kultur murni <i>Shigella flexneri</i> primer <i>ipaH</i> (variasi konsentrasi 5;10;15 pmol)	10	1	1	2	6	20
Sampel Pangan Basi dan fresh dengan primer <i>fim-C Escherichia coli</i> 5 pmol	10	1	1	2	6	20
Sampel Pangan Basi dan fresh dengan primer <i>ipaH Shigella flexneri</i> 10 pmol	10	1	1	2	6	20
No Template Control (NTC) primer 1 pmol	10	1	1	-	8	20
NFW+MM	10	-	-	-	10	20



**Lampiran 11. Proses PCR Gradien**

## Tube PCR

- Ditambahkan komponen reaksi berikut:

*Master Mix* 12,5  $\mu\text{L}$

*Nuclease Free Water* 8,5  $\mu\text{L}$

*Forward primer* 1  $\mu\text{L}$

*Reverse primer* 1  $\mu\text{L}$

*Template DNA* 2  $\mu\text{L}$

Total volume 25  $\mu\text{L}$

- Diresuspensi dengan pipetkan naik turun untuk menghomogenkan larutan

## Tabung PCR berisi campuran reaksi

- Jalankan program PCR sebanyak 40 siklus dengan kondisi berikut:

*Initial denaturation*, 95°C, 3 menit

*Denaturation*, 95°C, 10 detik

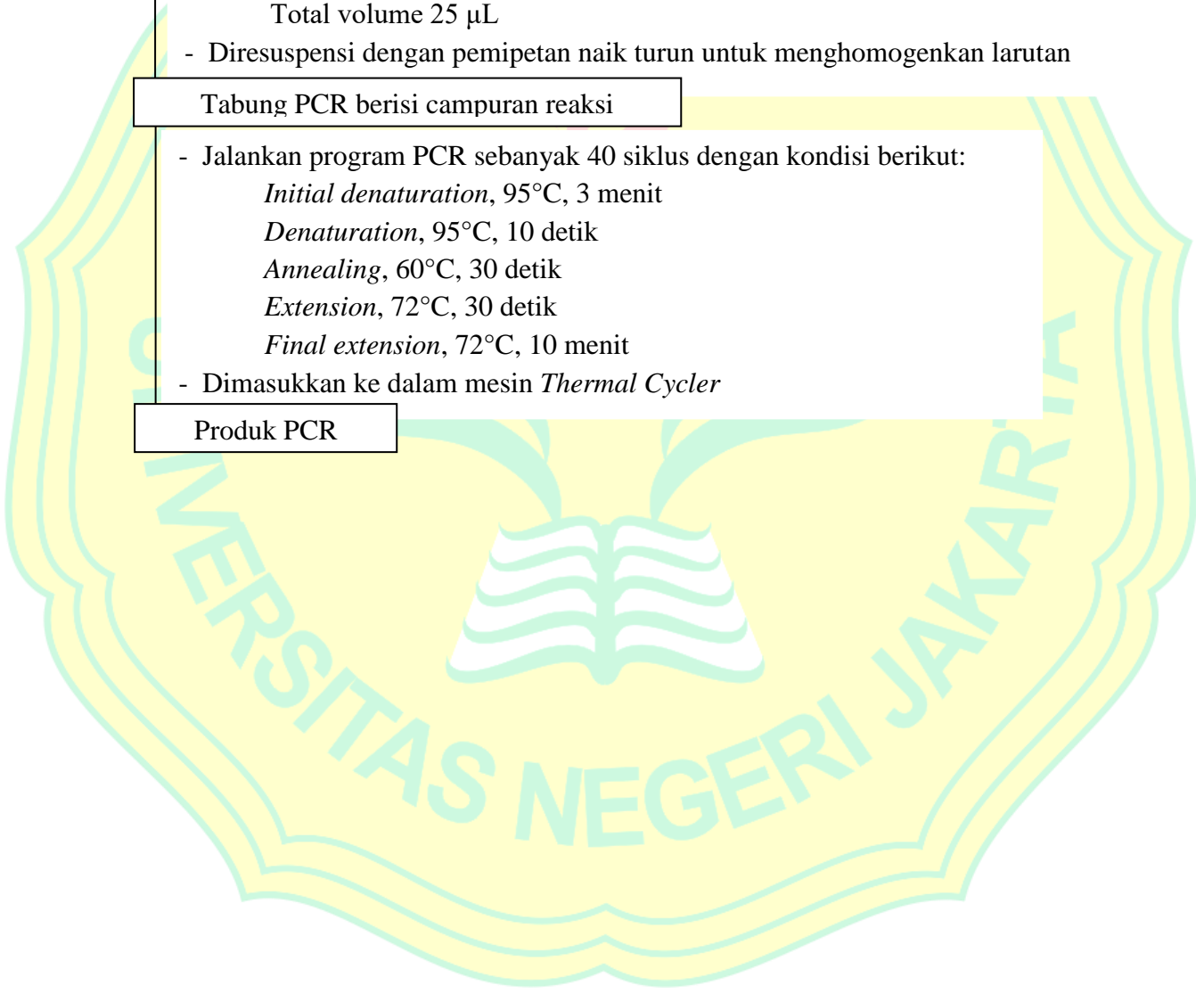
*Annealing*, 60°C, 30 detik

*Extension*, 72°C, 30 detik

*Final extension*, 72°C, 10 menit

- Dimasukkan ke dalam mesin *Thermal Cycler*

## Produk PCR



## Lampiran 12. Pembuatan Gel Agarose dan Tahapan Elektroforesis

0,28 g bubuk agarosa

- Dilarutkan dalam 40 mL buffer TAE 1x
- Dididihkan
- Didinginkan sampai suhu 60°C
- Ditambahkan 2  $\mu$ L *Fluorovue*
- Dihomogenkan
- Dituangkan kedalam baki gel agarosa yang telah dilengkapi *comb* (sisir)
- Didiamkan

Gel yang telah mengeras

- Dipindahkan dan direndam dalam apparatus berisi buffer TAE 1x

Hasil amplifikasi dan DNA *Ladder* 100 bp 7  $\mu$ L

- Dicampur dengan 3 $\mu$ L *loading dye* 6x
- Dimasukkan ke dalam *well* agarosa yang telah disiapkan sebelumnya

Agarosa yang sudah ditambahkan sampel hasil amplifikasi

- Dilakukan elektroforesis pada arus 70 volt dan 400 A selama 70 menit

Hasil elektroforesis

- Dilakukan dokumentasi diatas lampu UV menggunakan alat dokumentasi

Foto hasil elektroforesis



**Lampiran 13. Proses Reaksi *Real-Time* PCR**

## Tube PCR

- Ditambahkan komponen reaksi berikut:
  - Master Mix SYBR ROX* 10  $\mu\text{L}$
  - Nuclease Free Water* 6  $\mu\text{L}$
  - Forward primer* 1  $\mu\text{L}$
  - Reverse primer* 1  $\mu\text{L}$
  - Template DNA* 2  $\mu\text{L}$
  - Total volume 20  $\mu\text{L}$
- Diresuspensi dengan pipetkan naik turun untuk menghomogenkan larutan

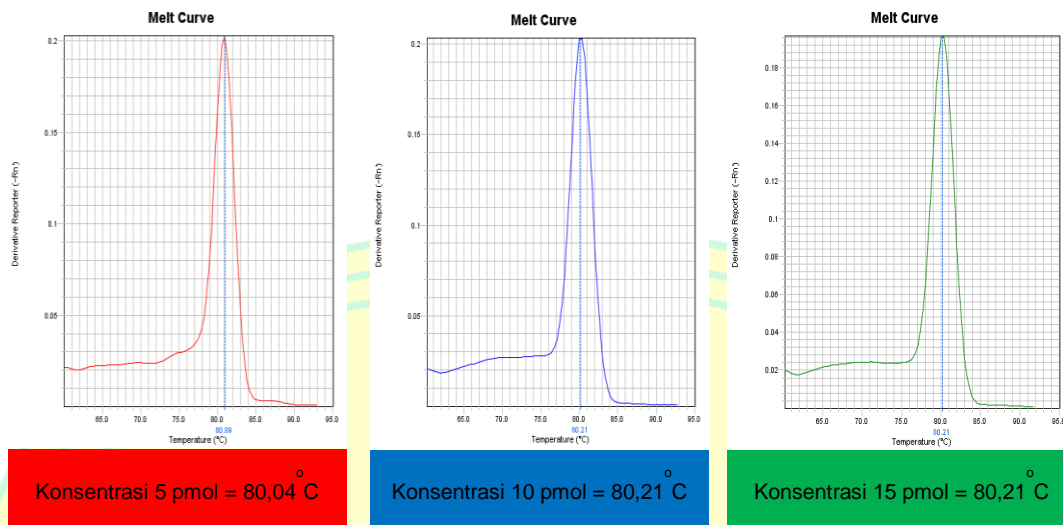
## Tube PCR berisi campuran reaksi

- Dipindahkan hasil komponen ke *well plate 96 tube*
- Disentifugasi
- Dimasukkan kedalam alat *Thermal Cycler Real-Time PCR*
- Diatur pengaturan pada *software Real-Time PCR* sesuai uji yang dilakukan
- Jalankan program PCR sebanyak 40 siklus dengan kondisi berikut:
  - Initial denaturation*, 95°C, variasi waktu (3, 4, 5 menit)
  - Denaturation*, 95°C, 30 detik
  - Annealing*, 60°C, 30 detik
  - Extension*, 72°C, 1 menit
  - Final extension*, 72°C, 10 menit

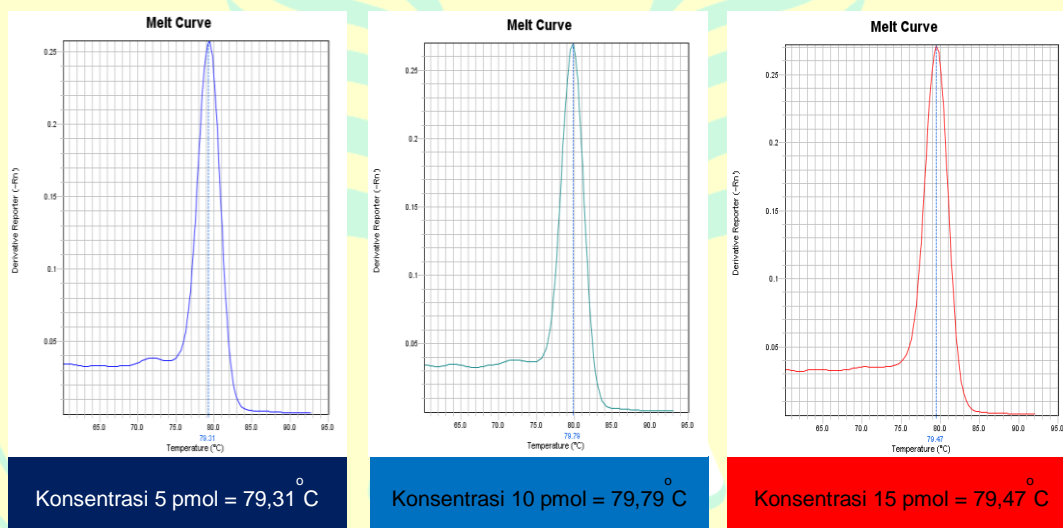
## Produk PCR

- Hasil dapat dimonitori secara langsung

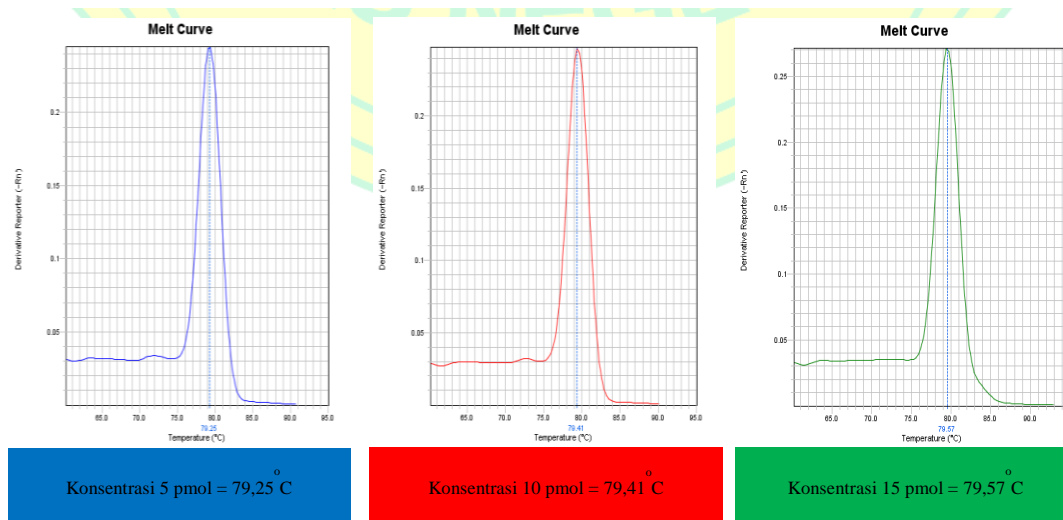
**Lampiran 14. Kurva pelelehan (*melting curve*) *fim-C Escherichia coli* pada variasi konsentrasi dan waktu pra-denaturasi 3,4,5 menit**



**Gambar 25. Kurva pelelehan (*melting curve*) *fim-C Escherichia coli* variasi konsentrasi waktu pra-denaturasi 3 menit**

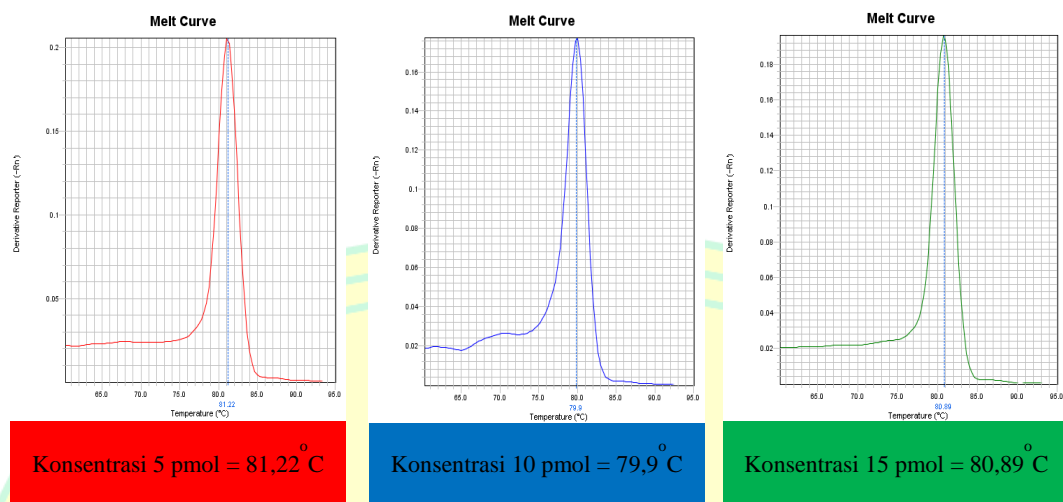


**Gambar 26. Kurva pelelehan (*melting curve*) *fim-C Escherichia coli* variasi konsentrasi waktu pra-denaturasi 4 menit**

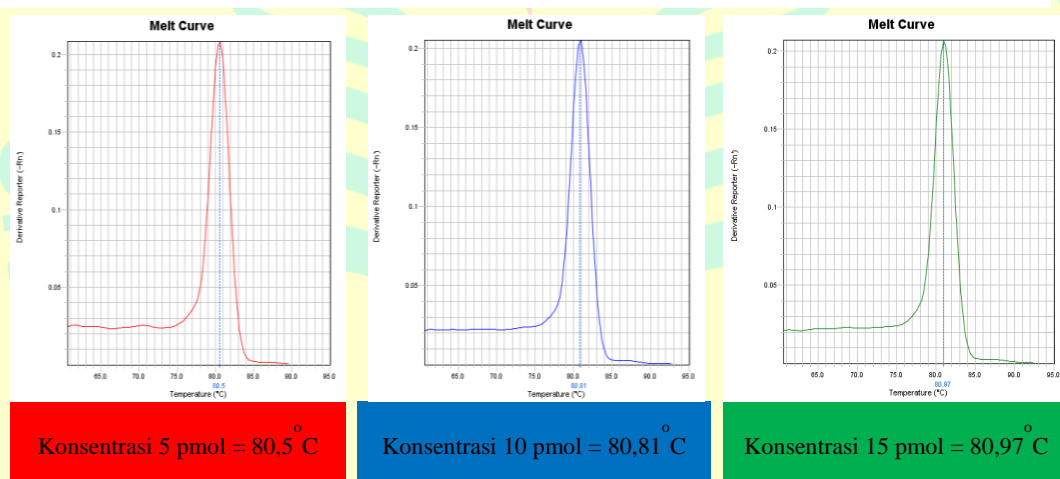


**Gambar 27. Kurva pelelehan (*melting curve*) *fim-C Escherichia coli* variasi konsentrasi waktu pra-denaturasi 5 menit**

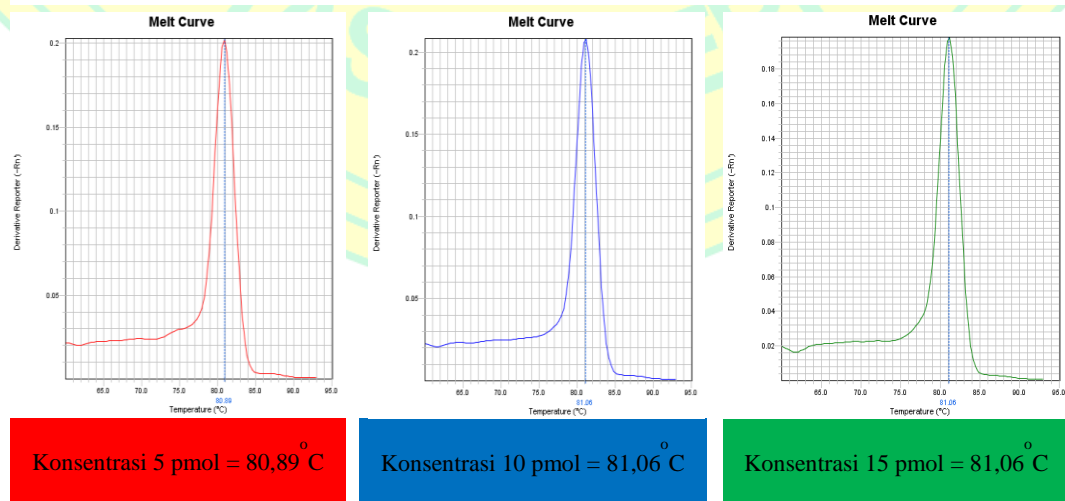
**Lampiran 15. Kurva pelelehan (*melting curve*) *ipaH* *Shigella flexneri* pada variasi konsentrasi dan waktu pra-denaturasi 3,4,5 menit**



**Gambar 30. Kurva pelelehan (*melting curve*) *ipaH* *Shigella flexneri* variasi konsentrasi waktu pra-denaturasi 3 menit**



**Gambar 29. Kurva pelelehan (*melting curve*) *ipaH* *Shigella flexneri* variasi konsentrasi waktu pra-denaturasi 4 menit**



**Gambar 28. Kurva pelelehan (*melting curve*) *ipaH* *Shigella flexneri* variasi konsentrasi waktu pra-denaturasi 5 menit**

## Lampiran 16. Perhitungan Jumlah Bakteri berdasarkan metode *Real-Time* PCR

- *Escherichia coli*

Diketahui persamaan garis  $y = -3,137x + 17,053$ . Melalui kurva standar penelitian sebelumnya diperoleh jumlah bakteri sebesar :

- **Kultur murni pada sampel susu sapi nonpasteurisasi dan kaldu jamur** (Ct = 12,39)

$$y = -3,137x + 17,053$$

$$12,39 = -3,137x + 17,053$$

$$-4,663 = -3,137x$$

$$x = 1,486$$

$$\text{Jumlah bakteri } \log_{10}x = 1,486$$

$$x = 10^{1,486} \text{ atau } 30,61 \text{ CFU/mL}$$

- **Kultur murni pada sampel kaldu daging** (Ct = 12,22)

$$y = -3,137x + 17,053$$

$$12,22 = -3,137x + 17,053$$

$$-4,833 = -3,137x$$

$$x = 1,54$$

$$\text{Jumlah bakteri } \log_{10}x = 1,54$$

$$x = 10^{1,54} \text{ atau } 34,67 \text{ CFU/mL}$$

- **Sampel susu basi** (Ct = 20,21)

$$y = -3,137x + 17,053$$

$$20,21 = -3,137x + 17,053$$

$$3,157 = -3,137x$$

$$x = -1,006$$

$$\text{Jumlah bakteri } \log_{10}x = -1,006$$

$$x = 10^{-1,006} \text{ atau } 0,098 \approx 9,8 \times 10^{-2} \text{ CFU/mL}$$

- **Sampel susu fresh** (Ct = 22,6)

$$y = -3,137x + 17,053$$

$$22,6 = -3,137x + 17,053$$

$$5,547 = -3,137x$$

$$x = -1,768$$

$$\text{Jumlah bakteri } \log_{10}x = -1,768$$

$$x = 10^{-1,768} \text{ atau } 0,017 \approx 1,7 \times 10^{-2} \text{ CFU/mL}$$

- **Sampel kaldu jamur basi** (Ct = 27,22)

$$y = -3,137x + 17,053$$

$$27,22 = -3,137x + 17,053$$

$$10,167 = -3,137x$$

$$x = -3,24$$

$$\text{Jumlah bakteri } \log_{10}x = -3,24$$

$$x = 10^{-3,24} \text{ atau } 0,000575 \approx 5,75 \times 10^{-4} \text{ CFU/mL}$$

- **Sampel kaldu jamur fresh** (Ct = 29,28)

$$y = -3,137x + 17,053$$

$$29,28 = -3,137x + 17,053$$

$$12,227 = -3,137x$$

$$x = -3,897$$

$$\text{Jumlah bakteri } \log_{10}x = -3,897$$

$$x = 10^{-3,897} \text{ atau } 0,000126 \approx 1,26 \times 10^{-4} \text{ CFU/mL}$$

- **Sampel kaldu daging basi (Ct = 25,53)**

$$y = -3,137x + 17,053$$

$$25,53 = -3,137x + 17,053$$

$$8,477 = -3,137x$$

$$x = -2,702$$

$$\text{Jumlah bakteri } \log_{10}x = -2,702$$

$$x = 10^{-2,702} \text{ atau } 0,001986 \approx 1,986 \times 10^{-3} \text{ CFU/mL}$$

- **Sampel kaldu daging fresh (Ct = 24,49)**

$$y = -3,137x + 17,053$$

$$24,49 = -3,137x + 17,053$$

$$7,237 = -3,137x$$

$$x = -2,3069$$

$$\text{Jumlah bakteri } \log_{10}x = -2,3069$$

$$x = 10^{-2,3069} \text{ atau } 0,004932 \approx 4,932 \times 10^{-3} \text{ CFU/mL}$$

• ***Shigella flexneri***

Diketahui persamaan garis  $y = -2,4741x + 27,14$ . Melalui kurva standar penelitian sebelumnya diperoleh jumlah bakteri sebesar :

- **Kultur Murni Sampel Susu sapi non pasteurisasi (Ct = 11,85)**

$$y = -2,4741x + 27,14$$

$$11,85 = -2,4741x + 27,14$$

$$-15,29 = -2,4741x$$

$$x = 6,18$$

$$\text{Jumlah bakteri } \log_{10}x = 6,18$$

$$x = 10^{6,18} \text{ atau } 1.513.561 \approx 1,5 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$$

- **Kultur Murni Sampel kaldu daging dan kaldu jamur (Ct = 11,77)**

$$y = -2,4741x + 27,14$$

$$11,77 = -2,4741x + 27,14$$

$$-15,37 = -2,4741x$$

$$x = 6,212$$

$$\text{Jumlah bakteri } \log_{10}x = 6,212$$

$$x = 10^{6,212} \text{ atau } 1.629.296 \approx 1,6 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$$

- **Sampel Susu Basi (Ct = 29,32)**

$$y = -2,4741x + 27,14$$

$$29,32 = -2,4741x + 27,14$$

$$2,18 = -2,4741x$$

$$x = -0,88$$

$$\text{Jumlah bakteri } \log_{10}x = -0,88$$

$$x = 10^{-0,88} \text{ atau } 0,131 \approx 1,3 \times 10^{-1} \text{ CFU/mL}$$

- **Sampel Susu Fresh (Ct = 30,52)**

$$y = -2,4741x + 27,14$$

$$30,52 = -2,4741x + 27,14$$

$$3,38 = -2,4741x$$

$$x = -1,366$$

$$\text{Jumlah bakteri } \log_{10}x = -1,366$$

$$x = 10^{-1,366} \text{ atau } 0,043 \approx 4,3 \times 10^{-2} \text{ CFU/mL}$$

- **Sampel kaldu daging basi (Ct = 27,48)**

$$y = -2,4741x + 27,14$$

$$27,48 = -2,4741x + 27,14$$

$$0,34 = -2,4741x$$

$$x = -0,137$$

$$\text{Jumlah bakteri } \log_{10}x = -0,137$$

$$x = 10^{-0,137} \text{ atau } 0,729 \approx 7,29 \times 10^{-1} \text{ CFU/mL}$$

- **Sampel kaldu daging fresh (Ct = 30,57)**

$$y = -2,4741x + 27,14$$

$$30,57 = -2,4741x + 27,14$$

$$3,43 = -2,4741x$$

$$x = -1,386$$

$$\text{Jumlah bakteri } \log_{10}x = -1,386$$

$$x = 10^{-1,386} \text{ atau } 0,041 \approx 4,1 \times 10^{-2} \text{ CFU/mL}$$

- **Sampel kaldu jamur basi (Ct = 24,97)**

$$y = -2,4741x + 27,14$$

$$24,97 = -2,4741x + 27,14$$

$$-2,17 = -2,4741x$$

$$x = 0,877$$

$$\text{Jumlah bakteri } \log_{10}x = 0,877$$

$$x = 10^{0,877} \text{ atau } 7,53 \text{ CFU/mL}$$

- **Sampel kaldu jamur fresh (Ct = 29,41)**

$$y = -2,4741x + 27,14$$

$$29,41 = -2,4741x + 27,14$$

$$2,27 = -2,4741x$$

$$x = -0,917$$

$$\text{Jumlah bakteri } \log_{10}x = -0,917$$

$$x = 10^{-0,917} \text{ atau } 0,121 \approx 1,2 \times 10^{-1} \text{ CFU/mL}$$



## DAFTAR RIWAYAT HIDUP



**Nabilla Alya Pramudiyasih** merupakan anak ketiga dari lima bersaudara dari pasangan Bapak Budi Wahyu dan Ibu Prihatini Asih yang lahir di Serang pada tanggal 14 Agustus 1999. Penulis telah menempuh pendidikan formal di SDIT Al-Izzah Serang (2005-2011), kemudian melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Pertama di MTsN

1 Serang (2011-2014), dan Sekolah Menengah Atas di SMAN 1 Serang (2014-2017). Kemudian penulis melanjutkan pendidikan di Universitas Negeri Jakarta, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Program Studi Kimia pada tahun 2017 melalui jalur Mandiri PENMABA UNJ.

Selama menempuh pendidikan di Universitas Negeri Jakarta, penulis menjadi penerima beasiswa PPA pada tahun 2019. Penulis menjadi asisten dosen Praktikum Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Organik serta Praktikum Identifikasi dan Sintesis Organik. Penulis juga pernah melakukan kegiatan Kunjungan Industri ke PT. Tirta Fresindo Jaya (Mayora Group) pada tahun 2018. Selain itu, penulis aktif dalam organisasi kesenian di tingkat universitas yaitu Unit Kesenian Mahasiswa Universitas Negeri Jakarta yang tergabung dalam *sub-unit* Tari yang juga aktif menjadi pengisi acara baik di internal UNJ maupun eksternal UNJ, serta menjabat sebagai PH inventaris Tari pada tahun 2019 dan Biro Bendahara Umum pada tahun 2020. Penulis juga berkesempatan menjadi MC (*Master of Ceremony*) dalam kegiatan yang ada pada Program Studi Kimia seperti *Studium Generale* dan ISO Temu Kimia. Penulis merupakan bagian dari tim Salmonella 2017 yang berkesempatan melakukan penelitian untuk tugas akhir di Pusat Laboratorium Forensik (PUSLABFOR) selama tahun 2021.