

**VALIDASI FORMULA KIT DETEKSI BAKTERI
PATOGEN *Salmonella enteritidis* DAN
Staphylococcus aureus PENYEBAB
KERACUNAN PANGAN DENGAN *REAL-
TIME POLYMERASE CHAIN REACTION***

Skripsi

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





**Ratna Nur Kusumawati
1307617005**

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU
PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA
2022**

LEMBAR PENGESAHAN

VALIDASI FORMULA KIT DETEKSI BAKTERI PATOGEN *Salmonella enteritidis* DAN *Staphylococcus aureus* PENYEBAB KERACUNAN PANGAN DENGAN REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

Nama Mahasiswa : Ratna Nur Kusumawati
No Registrasi : 1307617005
Program Studi : Kimia

	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Penanggung Jawab Dekan	Prof. Dr. Muktiningsih N, M.Si NIP. 196405111989032001		01 Maret 2022
Wakil Penanggung Jawab Wakil Dekan I	Dr. Esmar Budi, S.Si, M.T NIP. 197207281999031002		01 Maret 2022
Ketua	: Dr. Yusmaniar, M.Si NIP. 196206261996022001		21 Februari 2022
Sekretaris	: Dr. Zulhipri, M.Si NIP. 195807031989031001		21 Februari 2022
Anggota Penguji	: Yussi Pratiwi, M.Sc NIP. 199202202019032024		19 Februari 2022
Pembimbing I	: Prof. Dr. Muktiningsih N, M.Si NIP. 196405111989032001		22 Februari 2022
Pembimbing II	: Dwi Ana Oktaviani S, S.Si NIP. 198510172008122001		21 Februari 2022

Telah dinyatakan lulus ujian skripsi pada 18 Februari 2022

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul “ Validasi Formula Kit Deteksi Bakteri Patogen *Salmonella enteritidis* dan *Staphylococcus aureus* Penyebab Keracunan Pangan Dengan Metode *Real-Time Polymerase Chain Reaction*” yang disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dari Program Studi Kimia Universitas Negeri Jakarta adalah karya ilmiah saya dengan arahan dari dosen pembimbing.

Sumber informasi yang disebutkan dalam skripsi ini telah dicantumkan dalam lembar daftar pustaka sesuai 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, 3 Februari 2022

Yang membuat pernyataan,



Ratna Nur Kusumawati



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN

UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA

UPT PERPUSTAKAAN

Jalan Rawamangun Muka Jakarta 13220

Telepon/Faksimili: 021-4894221

Laman: lib.unj.ac.id

**LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademika Universitas Negeri Jakarta, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Ratna Nur Kusumawati
NIM : 1307617005
Fakultas/Prodi : FMIPA/Kimia
Alamat email : ratnank99@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada UPT Perpustakaan Universitas Negeri Jakarta, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah:

Skripsi Tesis Disertasi Lain-lain (.....)

yang berjudul :

Validasi Formuka Kit Deteksi Bakteri Patogen *Salmonella enteritidis* dan
Staphylococcus aureus Penyebab Keracunan Pangan dengan *Real Time Polymerase Chain
Reaction*

Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini UPT Perpustakaan Universitas Negeri Jakarta berhak menyimpan, mengalihmediakan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (*database*), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di internet atau media lain secara *fulltext* untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan Universitas Negeri Jakarta, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Jakarta, 28 Februari 2022

Penulis

(Ratna Nur Kusumawati)

ABSTRAK

Ratna Nur Kusumawati. Validasi Formula Kit Deteksi Bakteri Patogen *Salmonella enteritidis* dan *Staphylococcus aureus* Penyebab Keracunan Pangan Dengan Metode *Real-Time Polymerase Chain Reaction*. Skripsi, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta, Januari 2021.

Keracunan pangan menjadi salah satu Kejadian Luar Biasa (KLB) menurut Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Keracunan pangan dapat disebabkan karena pengelolaan makanan ataupun kontaminasi oleh bakteri. Salah satu bakteri patogen penyebab keracunan pangan adalah *Salmonella enteritidis* dan *Staphylococcus aureus*. Sehingga, diperlukan metode yang cepat, sensitif, spesifik, dan akurat untuk mendeteksi kedua bakteri tersebut. Tujuan dari penelitian ini adalah menghasilkan informasi formula kit deteksi yang optimal dalam pelaksanaan deteksi bakteri penyebab keracunan pangan *Salmonella enteritidis* dan *Staphylococcus aureus* sehingga dihasilkan *prototype* kit deteksi yang akurat, spesifik dan sensitif menggunakan *Real-Time PCR*. Validasi tahap PCR pada suhu optimum *annealing* 60 °C dengan konsentrasi kedua bakteri 50 ng/μL menghasilkan amplicon gen *prot6E* *S. enteritidis* dan *fnbA* *S. aureus* berukuran 170 *basepair* (bp) dan 187 bp. Hasil validasi dengan *Real-Time PCR* menggunakan primer *prot6E* dapat mengamplifikasi *S. enteritidis* pada Ct 17,88. Suhu optimum digunakan untuk validasi dan optimasi pada uji konfirmasi dengan waktu pra- denaturasi 5 menit untuk kedua bakteri pada konsentrasi primer *prot6E* 15 pmol dan *fnbA* 10 pmol. Hasil uji spesifisitas menunjukkan primer *fnbA* dapat mengenali *S. aureus* dengan perbedaan sinyal fluoresensi, sehingga dapat dibedakan dari bakteri non target. Hasil uji sensitivitas menunjukkan kemampuan primer *fnbA* mendeteksi bakteri target hingga konsentrasi terkecil 0,0528 ng/μL dengan Ct 26,08 dan *Limit of Detection (LOD)* primer *fnbA* sebesar $4,7 \times 10^{-2}$ CFU/mL. Uji konfirmasi sampel pangan pada skala laboratorium memberikan hasil untuk kedua bakteri *S. enteritidis* dan *S. aureus* terdapat di dalam ketiga sampel pangan yaitu susu *non pasteurisasi*, daging sapi dan jamur enoki. Berdasarkan data yang diperoleh dapat disimpulkan validasi tahap isolasi dan PCR terkonfirmasi menghasilkan data yang konsisten dengan penelitian sebelumnya dan bersifat reproduibel.

Kata Kunci : *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Real-Time PCR*, *Prototype Kit Deteksi*, *Validasi*

ABSTRACT

Ratna Nur Kusumawati. Validation of the kit formula for the detection of pathogenic bacteria *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* that causes food poisoning using the real-time polymerase chain reaction method. Thesis, Chemistry Major, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, State University of Jakarta, January 2022.

Food poisoning is one of the Extraordinary Events (KLB) according to the Ministry of Health of the Republic of Indonesia. Food poisoning can be caused by handling food or contamination by bacteria. Some of the pathogenic bacteria that cause food poisoning are *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus*. Thus, a fast, sensitive, specific, and accurate method is needed to detect these two bacteria. The purpose of this study was to produce information on the optimal detection kit formula for the detection of bacteria causing food poisoning *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* so as to produce an accurate, specific and sensitive prototype detection kit using *Real-Time PCR*. The validation of the PCR step at the optimum annealing temperature of 60 with a concentration of both bacteria 50 ng/ μ L resulted in the *prot6E* gene amplicons of *S. enteritidis* and *S. aureus fnbA* measuring 170 base pairs (bp) and 187 bp. Validation results with *Real-Time PCR* using *prot6E* primer can amplify *S. enteritidis* at Ct 17,88. The optimum temperature was used for validation and optimization of the confirmation test with a pre-denaturation time of 5 minutes for both bacteria at primer concentrations of *prot6E* 15 pmol and *fnbA* 10 pmol. The results of the specificity test showed that *fnbA* primers could recognize *S. aureus* with different fluorescence signals, so that they could be distinguished from non-target bacteria. The results of the sensitivity test showed the ability of the *fnbA* primer to detect the target bacteria to the smallest concentration of 0.0528 ng/ μ L with a Ct of 26.08 and the *Limit of Detection* (LOD) of the *fnbA* primer of 4.7×10^{-2} CFU/mL. The food sample confirmation test on a laboratory scale gave results for both *S. enteritidis* and *S. aureus* bacteria present in the three food samples, namely non-pasteurized milk, beef, and enoki mushrooms. Based on the data obtained, it can be concluded that the validation of the isolation stage and confirmed PCR resulted in data that was consistent with previous studies and was reproducible.

Key Word: *Salmonella enteritidis, Staphylococcus aureus, Real-Time PCR, Prototype Kit Detection, Validation*

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur saya ucapkan atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat serta karunia-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini. Jenis penelitian yang ditulis adalah penelitian Sains yang telah dilaksanakan sejak bulan Maret 2021 dengan judul “ Validasi Formula Kit Deteksi Bakteri Patogen *Salmonella enteritidis* dan *Staphylococcus aureus* Penyebab Keracunan Pangan Dengan Metode *Real-Time Polymerase Chain Reaction*”.

Penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan ucapan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Muktiningsih Nurjayadi, M.Si. selaku dosen pembimbing I yang telah menyediakan waktu, memberikan saran serta masukan selama bimbingan dan dalam penyusunan skripsi ini
2. Dwi Ana Oktaviani, S.Si. selaku dosen pembimbing II yang telah membimbing dan memberikan arahan selama penelitian di Puslabfor
3. Semua anggota keluarga yang telah memberikan doa dan semangat yang memotivasi saya, sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi saya
4. Tim Salmonella 2016 yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing dan memberikan masukan dan arahan selama penelitian dan saya dapat melewati kesulitan tersebut
5. Tidak lupa teman-teman Tim Salmonella 2017 yang beranggotakan Irvan Maulana, Maharaniaska Azzahra, dan Nabilla Alya Pramudiyasih yang telah membantu, mendampingi, memberikan *support* kepada saya selama penelitian di Puslabfor.
6. Terakhir, Iqbal Abdul Qutni yang telah membantu saya dan mendampingi, serta memberikan saran selama penelitian di Puslabfor

Jakarta, 3 Februari 2022

Ratna Nur Kusumawati

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN ORALITAS	iii
LEMBAR PERSEMBAHAN.....	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. <i>Latar Belakang</i>	1
B. <i>Perumusan Masalah</i>	3
C. <i>Tujuan Penelitian</i>	3
D. <i>Manfaat Penelitian</i>	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. <i>Keracunan Pangan</i>	4
B. <i>Salmonella enteritidis</i>	6
C. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
D. <i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>	14
E. <i>Validasi Formula Kit Deteksi</i>	19
F. <i>Formula Kit Deteksi</i>	21
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	22
A. <i>Tempat dan Waktu Penelitian</i>	22
B. <i>Metode Penelitian</i>	22
1. <i>Alat dan Bahan</i>	22
2. <i>Prosedur Penelitian</i>	24
C. <i>Teknik Pengumpulan Data</i>	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	31
A. <i>Pembiakan bakteri Salmonella enteritidis dan Staphylococcus aureus</i>	31
B. <i>Isolasi bakteri dan Sampel Pangan</i>	33

C. <i>Optimasi Suhu Annealing dan Karakterisasi Elektroforesis</i>	37
D. <i>Uji Konfirmasi, Uji Spesifisitas dan Uji Sensitivitas Primer</i>	39
E. <i>Uji Konfirmasi Sampel Pangan</i>	52
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	59
A. <i>Kesimpulan</i>	50
A. <i>Saran</i>	60
DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN	66
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	77



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Bakteri dengan gejala dan sumber pangan yang dikontaminasi	5
Tabel 2. Grup <i>Salmonella</i> dan target host	7
Tabel 3. Hasil kuantifikasi bakteri dan sampel pangan	36
Tabel 4. Uji Spesifisitas <i>S. aureus</i>	48
Tabel 5. Nilai Ct Pengenceran Bertingkat <i>S. aureus</i>	50
Tabel 6. Uji Organoleptik Sampel Pangan.....	52



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Bakteri <i>Salmonella enteritidis</i>	8
Gambar 2. Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	10
Gambar 3. Mekanisme patogen dari enterotoksin <i>S. aureus</i>	13
Gambar 4. Kurva Amplifikasi.....	15
Gambar 5. SYBR® Green berinterkalasi dengan DNA	18
Gambar 6. Kurva puncak leleh	20
Gambar 7. Kurva standar	21
Gambar 8. GeneJET Genomic DNA <i>Purification Kit</i>	25
Gambar 9. Pemiakan Bakteri <i>S. enteritidis</i>	31
Gambar 10. Pertumbuhan Bakteri <i>S. aureus</i>	32
Gambar 11. Lisozim membelah peptidoglikan pada posisi β - 1,4 glikosida	35
Gambar 12. Karakterisasi Hasil Optimasi Suhu <i>Annealing</i> Gen <i>fnbA</i>	38
Gambar 13. Karakterisasi Hasil Optimasi Suhu <i>Annealing</i> Gen <i>prot6E</i>	38
Gambar 14. Kurva Amplifikasi Pra-denaturasi 3 Menit.....	40
Gambar 15. Kurva Puncak Pelelehan.....	41
Gambar 16. Kurva Amplifikasi Pra-denaturasi 4 Menit.....	42
Gambar 17. Kurva Puncak Pelelehan.....	43
Gambar 18. Kurva Amplifikasi Pra-denaturasi 5 Menit.....	44
Gambar 19. Kurva Puncak Pelelehan.....	45
Gambar 20. Kurva Amplifikasi Uji Spesifisitas <i>S. aureus</i>	46
Gambar 21. Kurva Puncak Pelelehan Uji Spesifisitas	48
Gambar 22. Kurva Amplifikasi Uji Sensitivitas <i>S. aureus</i>	49
Gambar 23. Kurva Standar Uji Sensitivitas	51
Gambar 24. Kurva Amplifikasi Sampel Susu	53
Gambar 25. Kurva Amplifikasi Sampel Jamur Enoki	55
Gambar 26. Kurva Amplifikasi Sampel Daging Sapi	57
Gambar 27. Grafik Ekstrapolasi <i>S. aureus</i>	58

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembiakan Bakteri Pada Media Agar	67
Lampiran 2. Inokulasi Bakteri ke Media Broth.....	67
Lampiran 3. Pembuatan <i>Glycerol Stock</i>	67
Lampiran 4. Pembuatan <i>Lysis Buffer</i>	67
Lampiran 5. Persiapan Sampel Pangan <i>Fresh</i> dan Basi	68
Lampiran 6. Isolasi Bakteri <i>Salmonella enteritidis</i> dengan <i>GeneJET Purification Kit</i>	69
Lampiran 7. Isolasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan Sampel Pangan dengan <i>GeneJET Purification Kit</i>	70
Lampiran 8. Komposisi bahan untuk <i>PCR Gradient</i>	71
Lampiran 9. Tahap <i>PCR Gradien</i>	71
Lampiran 10. Pembuatan Gel Agarosa dan Karakterisasi dengan Gel Agarosa	72
Lampiran 11. Komposisi bahan untuk uji <i>Real Time PCR</i>	73
Lampiran 12. Proses reaksi <i>Real Time PCR</i>	73
Lampiran 13. Perhitungan Jumlah Bakteri berdasarkan metode <i>Real Time PCR</i>	74
Lampiran 14. Lampiran Penentuan <i>Limit of Detection (LOD)</i> Primer Gen <i>prot6E</i> <i>Salmonella enteritidis</i> dan <i>fnbA S. aureus</i>	77

