

**PENGEMBANGAN DETEKSI CEPAT BAKTERI
STAPHYLOCOCCUS AUREUS PADA SAMPEL SUSU DAN
DAGING SAPI DENGAN METODE *REAL TIME PCR*
(*POLYMERASE CHAIN REACTION*)**



PROGRAM STUDI KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA

2020

ABSTRAK

HAFIZA MUSLIMAH. Pengembangan Deteksi Cepat Bakteri *Staphylococcus aureus* pada Sampel Susu dan Daging Sapi dengan Metode *Real Time PCR* (*Polymerase Chain Reaction*). Dibawah bimbingan MUKTININGSIH NURJAYADI, VIRA SAAMIA

Keracunan pangan banyak terjadi karena adanya kontaminasi pangan oleh bakteri patogen. Salah satunya adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang terdapat di produk susu dan daging. Sehingga, diperlukan metode deteksi yang cepat, akurat dan spesifik. Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan deteksi cepat bakteri *Staphylococcus aureus* pada sampel susu dan daging sapi dengan menggunakan primer. Penelitian ini menggunakan primer *nuc* yang dirancang dengan panjang amplikon 135 bp dengan suhu *annealing optimum* 58°C. Metode *Real Time PCR* dengan primer *nuc* spesifik untuk mendeteksi *Staphylococcus aureus* dalam susu dan daging sapi dengan nilai Ct ±15 dan Tm yang khas pada 79°C. Hasil uji spesifitas menunjukkan primer dapat mengenali *Staphylococcus aureus* dengan perbedaan sinyal fluorosensi, sehingga dapat dibedakan dari bakteri nontarget. Hasil uji sensitivitas menunjukkan kemampuan primer mendeteksi hingga konsentrasi terkecil 98,4 pg/µL dengan nilai Ct 28,53. *Limit of Detection* (LOD) primer *nuc* sebesar $5,26 \times 10^{-2}$ CFU/mL. Berdasarkan hasil penelitian, metode *Real Time PCR* berhasil dikembangkan untuk mendeteksi *Staphylococcus aureus* dalam susu dan daging sapi dengan primer *nuc* secara cepat, akurat dan spesifik. Sehingga, pengembangan metode cepat *Real Time PCR* diharapkan dapat melindungi masyarakat dari keracunan pangan oleh bakteri.

Kata Kunci: Biokimia, Genomik, *Real Time PCR*, primer *nuc*

ABSTRACT

HAFIZA MUSLIMAH. Development of Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* Bacteria in Milk and Meat Samples by Real Time PCR (Polymerase Chain Reaction) Method. Under the guidance of MUKTININGSIH NURJAYADI, VIRA SAAMIA

Food poisoning often occurs due to food contamination by pathogenic bacteria. One of them is the *Staphylococcus aureus* bacteria found in dairy products and meat. A rapid, accurate and specific detection method is needed. The purpose of this study was to develop rapidly *Staphylococcus aureus* bacteria in milk and beef samples using primers. This study uses a *nuc* primer designed with a 135 bp amplicon length with an optimal annealing temperature of 58°C. Real Time PCR method with a specific primer for *Staphylococcus aureus* in milk and beef with typical Ct ± 15 and Tm values at 79°C. Results of Specificity tests show primers can question *Staphylococcus aureus* with differences in fluorescence signals, so they can be distinguished from non-target bacteria. The sensitivity test results showed the ability of 98,4 pg/µL with a Ct value of 28.53. The primary detection limit (LOD) of *nuc* primer is 5.26×10^{-2} CFU/mL. Based on the results, the Real Time PCR method was successfully developed to support *Staphylococcus aureus* in milk and beef with a rapid, accurate and specific. It is hoped that the rapid development of the Real Time PCR method is expected to protect the public from bacterial food poisoning.

Keywords: Biochemistry, Genomic, *Real Time PCR*, *nuc* primer



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 : HAFIZA MUSLIMAH
NIM : 3325152464
Fakultas/Prodi : FMIPA /KIMIA
Alamat email : hafizamuslimah86@gmail.com

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

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

yang berjudul :

PENGEMBANGAN DETEKSI CEPAT BAKTERI STAPHYLOCOCCUS AUREUS PADA
SAMPEL SUSU DASI DAGING SAPI DENGAN METODE REAL TIME PCR
(POLYMERASE CHAIN REACTION)

Dengan Hak Bebas Royalti Non-Ekslusif 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, 19 FEBRUARI 2020

Penulis

(HAFIZA MUSLIMAH)
nama dan tanda tangan

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul **“Pengembangan Deteksi Cepat Bakteri *Staphylococcus aureus* pada Sampel Susu dan Daging Sapi dengan Metode Real Time PCR (Polymerase Chain Reaction)”** yang disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dari Program Studi Kimia Universitas Negeri Jakarta adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing.

Sumber informasi yang disebutkan dalam teks skripsi ini, atau diperoleh dari penulis lain yang telah dipublikasikan, keseluruhannya 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, 6 Februari 2020

Yang membuat pernyataan,



Hafiza Muslimah

LEMBAR PENGESAHAN

PENGEMBANGAN DETEKSI CEPAT BAKTERI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PADA SAMPEL SUSU DAN DAGING SAPI DENGAN METODE *REAL TIME PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)*

Nama Mahasiswa : HAFIZA MUSLIMAH

No. Registrasi : 3325152464

Program Studi : Kimia

Penanggung Jawab

Dekan : Dr. Adisyahputra, M.S.
NIP 19601111 198703 1 003

Wakil Penanggung Jawab

Wakil Dekan 1 : Dr. Muktiningsih N., M.Si.
NIP 19640511 198903 2 001

Ketua

: Dr. Yusmaniar, M.Si.
NIP 19620626 199602 2 001

Sekretaris

: Dra. Tritiyatma H., M.Si.
NIP 19611225 198701 2 001

Anggota Pengaji

: Arif Rahman, M.Sc.
NIP 19790216 200501 1 003

Pembimbing 1

: Dr. Muktiningsih N., M.Si.
NIP 19640511 198903 2 001

Pembimbing 2

: Vira Saamia S.Si., M. Biomed
NIP 19860519 200812 2 001

Nama



Tanda Tangan

17/2/2020

14/2/2020

12/2/2020

12/2/2020

12/2/2020

13/2/2020

13/2/2020

Dinyatakan lulus ujian skripsi pada tanggal 6 Februari 2020

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pengembangan Deteksi Cepat Bakteri *Staphylococcus aureus* pada Sampel Susu dan Daging Sapi dengan Metode Real Time PCR (Polymerase Chain Reaction)”**. Jenis penelitian ini adalah penelitian Sains yang dilaksanakan sejak bulan November 2018. Skripsi ini disusun untuk memenuhi syarat memperoleh gelar Sarjana Sains dari Program Studi Kimia, FMIPA, UNJ.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dr. Muktiningsih Nurjayadi, M. Si., dan Ibu Vira Saamia, S.Si, M. Biomed selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, saran, serta motivasi dan dukungan dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi ini. Terima kasih kepada Pembimbing Akademik Ibu Irma Ratna Kartika, M.Sc.Tech yang telah membimbing penulis secara akademik selama kuliah di Program Studi Kimia UNJ. Terima kasih juga kepada Ibu Dr. Fera Kurniadewi, M.Si selaku Ketua Program Studi Kimia. Tidak lupa penulis berterima kasih kepada Pusat Laboratorium Forensik Bareskrim POLRI, Laboratorium Kimia dan Biologi serta Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian yang telah banyak membantu dalam penyediaan tempat dan instrumen alat selama penelitian berlangsung.

Ungkapan terima kasih kepada kedua orang tua dan semua anggota keluarga atas segala doa, motivasi dan kasih sayang yang telah diberikan. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada teman-teman seperjuangan Kimia 2015 atas segala bantuan dan semangatnya, senior angkatan 2014 yang memberi masukan dan bantuan dalam menjalani penelitian. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan memberikan kontribusi terhadap perkembangan ilmu pengetahuan.

Jakarta, 6 Februari 2020

Hafiza Muslimah

DAFTAR ISI

halaman

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR ISTILAH.....	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II KAJIAN PUSTAKA	5
A. Keracunan Pangan.....	5
B. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
C. Primer Gen <i>nuc Staphylococcus aureus</i>	11
D. Isolasi DNA	12
E. Elektroforesis Gel Agarosa.....	15
F. <i>Real Time PCR (Polymerase Chain Reaction)</i>	17
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	23
A. Tempat dan Waktu Penelitian	23
B. Metode Penelitian.....	23
C. Alat dan Bahan	23
D. Prosedur Penelitian.....	24
E. Teknik Pengumpulan dan Analisis Data.....	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	31
A. Pembiakan kultur bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	31
B. Kontaminasi kultur bakteri terhadap sampel pangan	32
C. Isolasi DNA	34

D.	Perancangan Primer dan Optimasi Suhu Annealing	37
E.	Uji Konfirmasi Primer <i>nuc Staphylococcus aureus</i>	39
F.	Uji Spesifitas Primer <i>nuc Staphylococcus aureus</i>	41
G.	Uji Sensitivitas Primer <i>nuc Staphylococcus aureus</i>	43
H.	Uji Konfirmasi Pangan Primer <i>nuc Staphylococcus aureus</i>	45
BAB V	KESIMPULAN	49
A.	Kesimpulan.....	49
B.	Saran.....	49
DAFTAR PUSTAKA.....		50
LAMPIRAN		56



DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 1. Bakteri dengan gejala dan sumber pangan yang dikontaminasi	7
Tabel 2. Klasifikasi <i>Staphylococcus aureus</i>	8
Tabel 3. Hasil pengukuran sampel DNA secara kuantitatif	35
Tabel 4. Konsentrasi dan nilai Ct uji sensitivitas primer <i>nuc</i>	44
Tabel 5. Nilai Ct uji konfirmasi pangan pada sampel susu dan daging sapi.....	46



DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 1. Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	8
Gambar 2. Perbedaan gram positif dan gram negatif	9
Gambar 3. Circular map genome DNA <i>Staphylococcus aureus</i>	10
Gambar 4. Urutan nukleotida gen <i>nuc</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	12
Gambar 5. Struktur DNA	13
Gambar 6. Prinsip dan tahapan isolasi DNA	13
Gambar 7. Dinding sel bakteri gram positif	14
Gambar 8. Proses elektroforesis gel agarosa.....	15
Gambar 9. Struktur Etidium bromida.....	16
Gambar 10. Tahapan amplifikasi dalam PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	17
Gambar 11. Kurva Amplifikasi.....	20
Gambar 12. Kurva puncak peleahan/ <i>melt peak curve</i>	21
Gambar 13. Standar kurva diperoleh dari uji sensitivitas	22
Gambar 14. Pembangkitan kultur <i>Staphylococcus aureus</i> dalam media MSA.....	31
Gambar 15. Kultur <i>Staphylococcus aureus</i> dilusi bertingkat pada media NA.....	33
Gambar 16. Elektroforesis Gel Agarosa isolat DNA.....	37
Gambar 17. Elektroforesis Gel Agarosa optimasi suhu annealing primer gen <i>nuc</i>	39
Gambar 18. Kurva amplifikasi uji konfirmasi primer <i>nuc Staphylococcus aureus</i>	40
Gambar 19. Kurva puncak peleahan uji konfirmasi	41
Gambar 20. Kurva amplifikasi uji spesifikasi primer <i>nuc</i>	42
Gambar 21. Kurva puncak peleahan uji spesifikasi primer <i>nuc</i>	43
Gambar 22. Kurva amplifikasi uji sensitivitas primer <i>nuc Staphylococcus aureus</i>	44
Gambar 23. Kurva standar uji sensitivitas primer <i>nuc Staphylococcus aureus</i>	45
Gambar 24. Kurva amplifikasi uji konfirmasi pangan <i>Staphylococcus aureus</i>	47
Gambar 25. Kurva puncak peleahan uji konfirmasi pangan <i>Staphylococcus aureus</i>	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan media agar dan cair untuk bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	56
Lampiran 2. Pembiakan Bakteri di media <i>Mannitol Salt Agar</i> dan <i>Nutrient Agar</i>	56
Lampiran 3. Pembiakan Bakteri di media <i>Brain Heart Infusion</i>	57
Lampiran 4. Pembuatan lysis buffer bakteri gram positif	57
Lampiran 5. Inokulasi bakteri pada sampel pangan	57
Lampiran 6. Isolasi DNA kultur murni dan sampel pangan	58
Lampiran 7. Pembuatan Gel Agarosa dan Tahapan Elektroforesis	59
Lampiran 8. Komposisi bahan untuk uji <i>Real Time PCR</i>	60
Lampiran 9. Proses reaksi <i>Real Time PCR</i>	60
Lampiran 10. Komposisi bahan untuk PCR <i>Gradient</i>	61
Lampiran 11. Proses reaksi <i>PCR Gradient</i>	61
Lampiran 12. Membuat larutan primer nuc dari larutan primer induk.....	62
Lampiran 13. Perhitungan konsentrasii akhir primer.....	62
Lampiran 14. Perhitungan konsentrasi pengenceran isolat DNA untuk uji sensitivitas...	62
Lampiran 15. Perhitungan Jumlah Bakteri.....	63
Lampiran 16. Kuantifikasi <i>Staphylococcus aureus</i> pada pangan	63
Lampiran 17. Kuantifikasi Limit of Detection (LOD) primer.	64
Lampiran 18. Dokumentasi Penelitian	65

DAFTAR ISTILAH

PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i> . Sebuah reaksi berantai polimerase dengan metode perbanyak DNA secara enzimatik
NCBI	: <i>National Center for Biotechnology Information</i> . Sebuah situs berisi <i>database</i> di bidang bioteknologi meliputi <i>gene bank</i> mengenai sekuen DNA atau protein dan memuat publikasi ilmiah.
NTC	: <i>No Template Control</i> , yaitu sebagai kontrol negatif dalam pengujian <i>Real Time PCR</i> dengan semua komponen kecuali DNA.
Ct	: <i>Threshold Cycle</i> , yaitu jumlah siklus PCR saat sinyal fluoresensi memotong garis batas.
Tm	: <i>Temperature Melting</i> , yaitu suhu ketika separuh dari struktur ganda DNA terdenaturasi
HCCP	: <i>Hazard Analysis Critical Control Point</i> . Sistem pengidentifikasi bahaya spesifik dan tindakan pengendaliannya untuk memastikan keamanan pangan.
CDC	: <i>Centers for Disease Control</i> . Sebuah badan kesehatan dan layanan masyarakat untuk pusat pengendalian dan pencegahan penyakit.