

ISBN : 978-602-9030-49-5

# PROSIDING

**Bidang: Mikrobiologi dan Keamanan Pangan**

## SEMINAR NASIONAL PATPI 2013

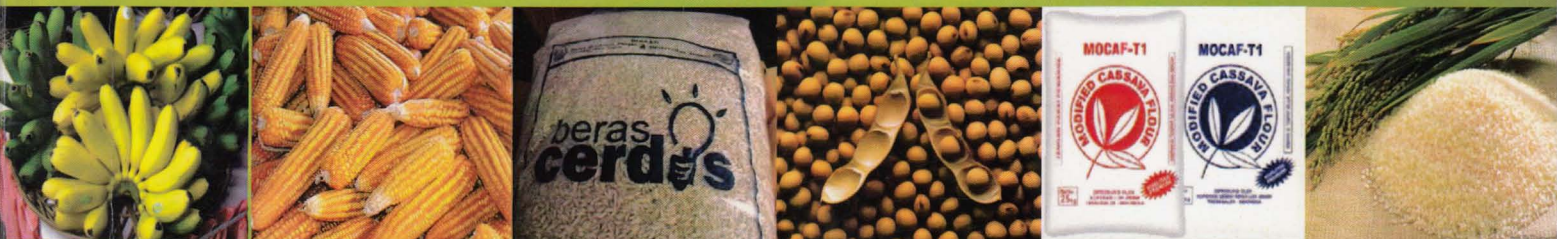
**“Peran Teknologi Dan Industri Pangan Untuk Percepatan  
Tercapainya Kedaulatan Pangan Indonesia”**

Disponsori Oleh:  | PT. TIGA PILAR SEJAHTERA FOOD Tbk.

**HOTEL ASTON**  
Jember | 26-29 Agustus 2013



SEMINAR NASIONAL  
PATPI 2013



Disponsori Oleh:

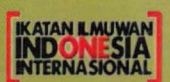




PT. TIGA PILAR SEJAHTERA FOOD Tbk.

[www.tigapilar.com](http://www.tigapilar.com)

Diselenggarakan Oleh:





## PEMILIHAN METODE EKSTRAKSI DNA DAN PROTOKOL DETEKSI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* MENGGUNAKAN *REAL-TIME PCR*

Harsi D. Kusumaningrum<sup>1,2,3\*</sup>, Lita Handayani<sup>3</sup>, Siti Nurjanah<sup>1,2,3</sup>, B. Sri Laksmi S. Jenie<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, <sup>2</sup>Southeast Asian Food and Agricultural Science and Technology Center, Institut Pertanian Bogor, <sup>3</sup>Program Studi Ilmu Pangan, Institut Pertanian Bogor E-mail: [h\\_kusumaningrum@ipb.ac.id](mailto:h_kusumaningrum@ipb.ac.id), [hedwig\\_emilia@yahoo.com](mailto:hedwig_emilia@yahoo.com), [siti\\_nrjh@yahoo.com.sg](mailto:siti_nrjh@yahoo.com.sg), [betty\\_jenie@yahoo.com](mailto:betty_jenie@yahoo.com)

### Abstrak

*S. aureus* sering ditemukan pada pangan olahan sebagai penyebab keracunan pangan di Indonesia. Pada penelitian ini dilakukan deteksi bakteri *S. aureus* menggunakan *Real Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) yang memungkinkan dilakukannya kuantifikasi DNA. Kultur yang digunakan adalah *S. aureus* ATCC 25934 dan tiga isolat *S. aureus* lokal yang berasal dari pangan siap saji. Ekstraksi DNA *S. aureus* dilakukan dengan 2 metode yaitu modifikasi metode Doyle & Doyle dan metode Mason. Pada metode Doyle & Doyle, *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) ditambahkan pada suspensi pelet kultur bersamaan dengan lisozim kemudian diinkubasi dan tanpa penambahan *Cetyltrimethyl Ammonium Bromide* (CTAB). Pada metode Mason yang dimodifikasi, SDS ditambahkan sesudah inkubasi dengan penambahan lisozim dan ditambahkan CTAB sesudah diinkubasi dengan proteinase-K. Primer yang digunakan adalah sekuens penyandi gen 16S rRNA yaitu 63F/1387R dan 63sF/63sR3. Pengujian dengan *Real-Time PCR* dilakukan dengan 2 protokol modifikasi metode Lee, baik untuk tahap pre-PCR, denaturasi, penempelan primer, elongasi, dan post-PCR, maupun tahap pelelehan. Siklus yang digunakan adalah sebanyak 35 siklus. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstraksi DNA dengan metode Mason yang dimodifikasi dapat menghasilkan pita DNA yang lebih tajam dan jelas, dibandingkan dengan metode modifikasi dari Doyle & Doyle, setelah dilakukan gel elektroforesis. Ekstrak DNA cukup baik kemurniannya yang ditunjukkan dengan nilai perbandingan absorbansi pada  $\lambda$  260nm/280nm yaitu sebesar 1,8-2,2. Kondisi protokol 2 dengan 35 siklus dapat menunjukkan suhu puncak kurva pelelehan dengan lebih baik dibandingkan protokol 1. Isolat lokal yang diuji mempunyai suhu puncak pelelehan yang sama dengan *S. aureus* ATCC 25934 yaitu 84°C jika diuji dengan primer 63F/1387R. Ketika diuji dengan primer 63sF/63sR3, isolat SJ1 menunjukkan kesamaan suhu puncak pelelehan dengan kultur acuan, yaitu 83,75°C. Hal ini menunjukkan bahwa protokol yang dikembangkan dapat digunakan untuk mengidentifikasi isolat *S. aureus* berdasarkan sekuens 16S rRNA kultur referensi. Selanjutnya perlu dilakukan pengembangan protokol untuk kuantifikasi dan uji spesifisitas protokol yang dikembangkan.

Kata kunci : Ekstraksi DNA, Suhu puncak pelelehan, *Real-Time PCR*, *Staphylococcus aureus*, 16S rRNA.

### Pendahuluan

Keberadaan bakteri patogen penyebab penyakit maupun perusak pangan harus dihilangkan atau diminimalkan pada produk pangan, sehingga perlu dikendalikan untuk menjamin kesehatan konsumen. *Staphylococcus aureus* adalah salah satu contoh bakteri patogen yang menjadi perhatian di Indonesia pada lima tahun terakhir. *S. aureus* banyak ditemukan pada berbagai bahan pangan sebagai penyebab keracunan pangan. Bakteri ini mampu bertahan pada permukaan kering selama waktu tertentu (Kusumaningrum *et al.*, 2003). Dalam keamanan pangan diperlukan pemeriksaan keberadaan bakteri patogen



penyebab penyakit sebagai kontaminan dalam bahan pangan. Pengujian secara konvensional yang banyak dilakukan umumnya memerlukan waktu untuk menumbuhkan pada media kultur, isolasi, dan identifikasi biokimia. Saat ini teknik deteksi cepat bakteri pada pangan telah banyak dilaporkan pada berbagai publikasi internasional, diantaranya adalah berbasis biologi molekuler. Salah satu metode deteksi bakteri berbasis biologi molekuler adalah metode *Polymerase Chain Reactions* (PCR). Metode ini secara umum mencakup tahapan isolasi DNA bakteri target, amplifikasi sekuen target secara reaksi polimerasi berantai, visualisasi dengan melakukan separasi produk amplifikasi pada elektroforesis gel agarosa sehingga diketahui ukuran fragmen yang dihasilkan dibandingkan dengan DNA marker setelah perlakuan *staining* menggunakan etidium bromida (Zhang *et al.*, 2004). Metode PCR merupakan teknik yang sangat berguna dalam membuat salinan DNA, dan umumnya digunakan pada analisis secara kualitatif. Untuk analisis dengan tujuan dapat mengkuantifikasi DNA target maka digunakan metode *real-time polymerase chain reaction*, juga disebut *real-time polymerase chain reaction* kuantitatif (qRT-PCR). Untuk satu atau lebih urutan tertentu dalam sampel DNA, qRT-PCR memungkinkan deteksi dan kuantifikasi. Kuantitas dapat berupa jumlah mutlak salinan atau jumlah relatif ketika dinormalisasi untuk memasukkan DNA atau gen normalisasi tambahan (Dequenne *et al.*, 2010). Salah satu keuntungan lain dengan metode qRT-PCR adalah dapat dilakukan analisis kurva pelelehan yang memungkinkan dilakukannya konfirmasi spesifisitas produk ampikon tanpa gel elektroforesis atau *sequencing* (Andre *et al.*, 2011). Metode deteksi cepat harus dapat digunakan sebagai perangkat deteksi yang memberikan hasil akurat, sensitif dan dengan waktu yang lebih singkat jika dibandingkan dengan metode konvensional. Pada penelitian ini dilakukan penentuan metode ekstraksi DNA untuk genom 16S rRNA *S. aureus* dan pengembangan protokol deteksi *S. aureus* menggunakan Real Time-PCR.

## Bahan dan metode

### Kultur

Kultur referensi yang digunakan adalah *S. aureus* ATCC 25934 dan tiga isolat *S. aureus* lokal (UA1, UA13 dan SJ1) yang berasal dari pangan siap saji. Isolat lokal sudah diisolasi menggunakan metode konvensional dan diidentifikasi menggunakan API Staph (Biomérieux).

### Ekstraksi DNA

Kultur *S. aureus* ATCC 25934 dan isolat lokal ditumbuhkan pada Tryptone Soy Broth (TSB, Oxoid) selama 24 jam pada suhu 37°C. Ekstraksi DNA genom bakteri *S. aureus* dilakukan dengan 2 metode. Metode 1 merupakan metode Doyle dan Doyle (1990) yang telah dimodifikasi oleh Khoiriyah (2011) dengan penambahan lisozim. Dua mL kultur disentrifugasi pada 8000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C, secara berulang sampai 3 kali, dengan penambahan 1 mL NaCl 0,85% pada sentrifugasi kedua dan 1 mL bufer Tris-EDTA-Saline pada sentrifugasi ketiga. Pelet yang diperoleh selanjutnya ditambah dengan 900 µl bufer Tris-EDTA, 100 µl SDS 10% dan 2 µl lisozim (2 mg/ml), tanpa penambahan Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB). Setelah diinkubasi 37°C selama 1 jam, baru kemudian ditambahkan 2,5 µl proteinase-K (10 mg/ml), dan dilanjutkan dengan prosedur berikutnya (Khoiriyah, 2011).

Metode 2 merupakan metode Mason *et al.* (2001) yang dimodifikasi, dimana penggunaan lisostaphin diganti dengan lisozim. Selain itu, juga pada ekstraksi yang dilakukan juga tidak digunakan RNase. Dua mL kultur disentrifugasi dengan kecepatan 15000 rpm (21.000 x g) selama 1 menit. Pelet kemudian diresuspensi dalam 560 µl of Tris-EDTA buffer (10 mM Tris [pH 7.5] and 1 mM EDTA). Selanjutnya, 100 µl lisozim (10 mg/ml) ditambahkan dalam suspensi (tanpa penambahan RNase) dan dicampur dengan membolak-balik tabung. Tiga puluh (30) µl SDS 10% dan 10 µl proteinase K (10 mg/ml)



kemudian ditambahkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dengan membolak-balik tabung setiap 15 menit. Tahap selanjutnya dilakukan sesuai prosedur Mason *et al* (2001), namun pada akhir prosedur pada pelet yang diperoleh ditambahkan lagi 30 µl bufer Tris-EDTA.

### **Penentuan sekuens primer untuk amplifikasi Gen 16S rRNA**

Amplifikasi gen 16S rRNA *S. aureus* dilakukan dengan menggunakan PCR (Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler, Foster City, California) dengan primer *reverse* dan *forward* general dan spesifik untuk *S. aureus* (Tabel 1). Sekuens ini diambil berdasarkan hasil penelitian sebelumnya yang telah berhasil digunakan untuk mengidentifikasi masing-masing spesies.

Tabel 1. Urutan sekuens primeryang digunakan pada PCR

| No | Urutan Primer  | Ukuran Segmen | Referensi                   |
|----|--|---------------|-----------------------------|
| 1  | Forward: 63F CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC<br>Reverse: 1387R GGG CGG WGT GTA CAA GGC | 1350bp        | Marchesiet <i>al</i> , 1998 |
| 2  | Forward: 16sF CCGCCTGGGGAGTACG<br>Reverse: 16sR3 AAGGGTTGCGCTCGTTGC                | 240 bp        | Lee <i>et al</i> , 2007     |

Proses amplifikasi dengan PCR konvensional dilakukan untuk 50 µl campuran reaktan yang masing-masing mengandung masing-masing 2 µl primer *forward* dan *reverse*, 3 µl DNA templat, (20pmol/µl), 25µl PCR Master Mix dan 18 µl akuabides steril.

Protokol PCR yang digunakan adalah metode Lee *et al.* (2007) yaitu pre-PCR (95°C, 5 menit), denaturasi (95°C, 1 menit), penempelan primer (*annealing*, 55°C, 1 menit), elongasi atau pemanjangan primer (72°C, 1 menit), dan post-PCR (72°C, 5 menit) dengan siklus sebanyak 35 kali.

### **Verifikasi Produk PCR konvensional dengan Elektroforesis**

Produk PCR ditunjukkan dengan terlihatnya pita (*band*) pada elektroforesis. Sebanyak 9 µl ekstrak DNA divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis (Bio-Rad) pada gel agarosa 1.5% (w/v) dengan bufer 1x Tris-Acetic acid-EDTA pada voltase 120 V selama 45 menit.

### **Amplifikasi Gen 16srRNA dengan Real-Time PCR**

Tahap ini dilakukan untuk mendapatkan kurva amplifikasi untuk setiap isolat. Sebanyak 2.0 µl isolat dicampur dengan 9.5 µl RNase free water, 12.5 µl SYBR Green supermix (Kappa), 0.5 µl masing-masing primer *forward* dan *reverse*. Volume total larutan adalah 25 µl.

Larutan tersebut diamplifikasi menggunakan instrumen Real Time PCR (Swift Spectrum 48 Fluorescence Quantitative PCR Detection System, Esco, Singapore) dengan kondisi PCR untuk masing-masing isolat seperti yang dilakukan pada (Tabel 2). Siklus yang digunakan sebanyak 35 siklus dan dilanjutkan dengan pelelehan untuk memperoleh kurva pelelehan (*melt curve*) yang digunakan dalam uji spesifisitas. Pada penelitian ini, kinerja real-time PCR dievaluasi dengan menetapkan Nilai Tm (Suhu puncak pelelehan). Nilai Tm dapat digunakan sebagai spesifitas uji.

Tabel 2. Protokol *Real-Time* PCR

| No | Protokol <i>Real-Time</i> PCR (Suhu dan Waktu) |                  |                  |                  |                  |   | Referensi                                 |
|----|--|------------------|------------------|------------------|------------------|---|---|
|    | Pre-PCR*                                       | Denaturasi       | Annealing        | Elongasi         | Post PCR         | Melting   |   |
| 1  | 95°C,<br>10 menit                              | 95°C,<br>1 menit | 55°C,<br>1 menit | 72°C,<br>1 menit | 72°C,<br>5 menit | 65-99°C,<br>Kecepatan<br>kenaikan suhu<br>0,1°C/detik | Lee <i>et al.</i><br>(2007)               |
| 2  | 95°C,<br>5 menit                               | 95°C,<br>1 menit | 55°C,<br>1 menit | 72°C,<br>1 menit | 72°C,<br>5 menit | 60-90°C,<br>kecepatan<br>kenaikan suhu<br>0,5°C/detik | Modifikasi<br>Lee <i>et al.</i><br>(2007) |

\*Manual SYBR Green

### Hasil dan Pembahasan

#### Metode ekstraksi DNA terpilih

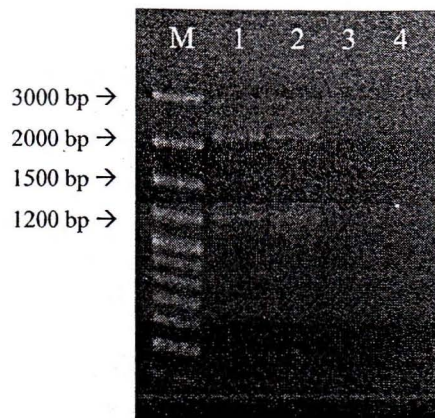
Hasil elektroforesis terhadap DNA *S. aureus* menggunakan metode ekstraksi Doyle & Doyle yang dimodifikasi oleh Khoiriyah (metode 1) tidak menunjukkan pita yang jelas, sedangkan dengan metode 2 yang merupakan modifikasi dari metode Mason (2001) dapat diperoleh pita yang jelas untuk kultur *S. aureus* ATCC25934 dan isolat UA1 (Tabel 3). Pada hasil ekstraksi DNA genom dengan metode 2 diperoleh 3 pita DNA, yaitu pita yang terdapat di antara marker 1200 bp dan 1500 bp, di antara marker 2000 bp dan 3000 bp, serta di atas marker 3000 bp (Gambar 1).

Tabel 3. Perolehan pita DNA pada elektroforesis hasil ekstraksi DNA

| No | Isolat                     | Metode ekstraksi* | Pita pada elektroforesis |
|----|----------------------------|-------------------|--------------------------|
| 1  | <i>S. aureus</i> ATCC25934 | 1                 | -                        |
|    |                            | 2                 | +                        |
| 2  | Isolat UA1                 | 1                 | -                        |
|    |                            | 2                 | +                        |

\*(1) Modifikasi Doyle & Doyle oleh Khoiriyah (2011); (2) Modifikasi Mason *et al.* 2001





Gambar 1 Hasil elektroforesis ekstrak DNA genom *S. aureus* (M= marker 100 bp plus DNA ladder; 1= *S. aureus* ATCC 25293 (metode 2); 2= Isolat UA1 (metode 2); 3= *S. aureus* ATCC 25293 (metode 1); 4= Isolat UA1 (metode 1)).

Pada penelitian ini, dilakukan modifikasi terhadap metode Mason *et al* (2001), terutama ditujukan untuk menggantikan lisostaphin karena bahan tersebut tidak mudah tersedia. Lisostaphin merupakan kelompok enzim endopeptidase yang dapat memutus-tautkan silang jembatan pentaglisin pada dinding sel *Staphylococcus* (Wu *et al*, 2003). Sebagaimana diketahui, dinding sel *Staphylococcus* mengandung pentaglisin dengan jumlah yang banyak. Walaupun demikian, sebagaimana terlihat pada visualisasi dengan elektroforesis, genom *S. aureus* dapat terekstrak dengan relatif baik tanpa menggunakan lisostaphin dalam prosedur ekstraksi, sehingga dapat menjadi alternatif untuk melakukan ekstraksi DNA *S. aureus*. Ekstraksi DNA selanjutnya dilakukan dengan metode Mason yang dimodifikasi.

#### **Kemurnian ekstrak DNA dengan metode terpilih**

Hasil isolasi DNA genom dari 3 isolat lokal dan 1 isolat pembanding (*S. aureus* ATCC 25923) menghasilkan larutan ekstrak DNA dengan konsentrasi berkisar antara 1237,5 sampai 1487,5 µg/ml. Berdasarkan perbandingan OD (*optical density*) pada pengukuran dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm, diperoleh kemurnian ekstrak DNA dengan kisaran 1,8 sampai 2,2 (Tabel 4). Tingkat kemurnian ekstrak DNA yang baik tetap diperlukan karena akan mempengaruhi hasil *sequencing* produk PCR, meskipun tahapan *sequencing* tersebut tidak selalu harus dilakukan jika melakukan identifikasi dengan *Real-Time*PCR (Andre *et al*, 2011).

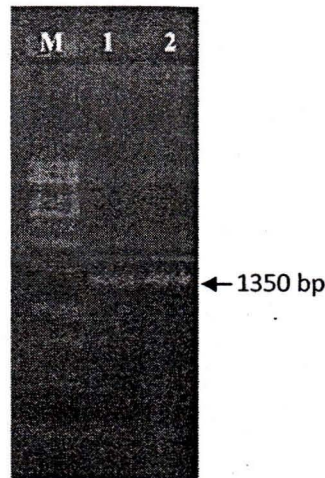
Tabel 4 Kemurnian ekstrak DNA dan konsentrasi yang terukur

| Isolat       | A260/A280   | Konsentrasi (µg/ml) |
|--------------|-------------|---------------------|
| Sa ATCC25934 | 1,95 ± 0,10 | 1387,5              |
| UA1          | 1,86 ± 0,06 | 1487,5              |
| UA13         | 1,82 ± 0,07 | 1450                |
| SJ1          | 2,20 ± 0,09 | 1237,5              |

#### **Eksresi gen 16S rRNA *S. aureus* berdasarkan PCR konvensional**

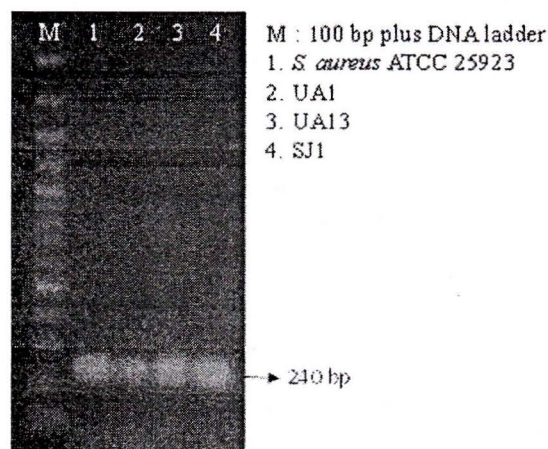
Ekstrak DNA yang diperoleh digunakan sebagai templat pada amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR konvensional. Pada proses amplifikasi dengan primer 63F dan 1387R, visualisasi total DNA genom isolat UA1 dan kultur pembanding *S. aureus* ATCC 25923 menunjukkan pita DNA yang cukup tajam (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa protokol

PCR konvensional yang telah dikembangkan menghasilkan amplicon sebesar 1350 pb dengan menggunakan primer 63F dan 1387R.



Gambar 2 Hasil elektroforesis amplifikasi gen 16s rRNA dengan primer 63F/1387R.M= marker 1 kb DNA ladder; 1= *S. aureus* ATCC 25293; 2= Isolat UA1.

Primer 63F dan 1387R merupakan primer universal dengan ukuran 1350 bp. Marchesiet al(1998)merancang dan menggunakan primer tersebut untukmengamplifikasi genom 16S rRNA dari bermacam-macam bakteri, termasuk *S. aureus*.Meningat bahwa primer 63F dan 1387R merupakan primer universal, pada penelitian ini amplifikasi juga dilakukan menggunakan primer yang lebih spesifik untuk *S. aureus*, yaitu 63sF dan 63sR3 (Lee et al, 2007). Pada visualisasi hasil PCR templat DNA genom isolat-isolat lokal *S. aureus* dan isolat pembanding (*S. aureus* ATCC 25923) dengan menggunakan primer 63sF dan 63sR3 juga diperoleh amplicon sebesar 240bp dengan pita yang tajam (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh mempunyai sekuens spesifik untuk *S. aureus*. Walaupun demikian, untuk memastikan spesies isolat perlu dilakukan sequencing, atau melakukan analisis kurva pelelehan jika menggunakan *Real-Time* PCR.



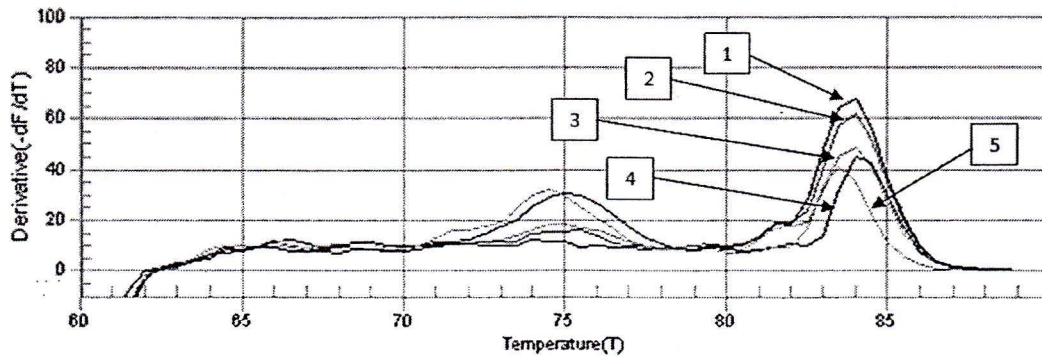
Gambar 3 Hasil elektroforesis amplifikasi gen 16s rRNA dengan primer 63sF/63sR3. M= marker 1 kb DNA ladder; 1= *S. aureus* ATCC 25293; 2= Isolat UA1; 3= Isolat UA13; 4= Isolat SJ1



**Eksresi gen 16S rRNA *S. aureus* berdasarkan Real-Time PCR**

**Kurva pelelehan**

Kurva pelelehan (*melting curve*) digunakan untuk menentukan suhu pelelehan ( $T_m$ ). Dengan primer 63F/1387R, nilai  $T_m$  dari *S. aureus* ATCC 25923 adalah 84°C (Gambar 4). Demikian juga dengan isolat UA1, UA13, dan SJ1 memiliki nilai  $T_m$  yang sama dengan *S. aureus* ATCC 25923. Di sisi lain, sampel tanpa templat memiliki  $T_m$  yang berbeda, yaitu 83.5°C:



Gambar 4 Kurva pelelehan isolat *S. aureus* (1= *S. aureus* ATCC 25923 100 ng/μl; 2= UA13; 3= SJ1; 4= UA1; 5: tanpa templat).

Dengan primer 63sF/63sR3 isolat lokal SJ1 mempunyai suhu puncak pelelehan yang sama dengan *S. aureus* ATCC 25934 yaitu 83,75°C (Tabel 5). Hal ini menunjukkan bahwa protokol yang dikembangkan dapat digunakan untuk mengidentifikasi isolat *S. aureus* berdasarkan sekuens 16S rRNA kultur referensi.

Tabel 5. Puncak titik leleh ( $T_m$ ) pada kurva pelelehan dengan *Real-Time* PCR menggunakan primer 63F/1387R dan primer 63sF/63sR3

| Isolat  | $T_m$ (°C) dengan primer 63F/1387R. | $T_m$ (°C) dengan primer 63sF/63sR3 |
|---------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Sa ATCC | 84                                  | 83,75±0,35                          |
| UA1     | 84                                  | 83,50±0,00                          |
| UA13    | 84                                  | 82,00±1,41                          |
| SJ1     | 84                                  | 83,75±0,35                          |

Metode *Real-Time* PCR menggunakan SYBR Green dikombinasikan dengan analisis terhadap kurva pelelehan dapat digunakan untuk mengkonfirmasi spesifisitas produk ampikon tanpa gel elektroforesis atau *sequencing* (Andre et al, 2011). Suhu leleh (*melt temperature*,  $T_m$ ) merupakan suhu peleburan di mana 50% DNA untai ganda telah terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Nilai  $T_m$  akan spesifik untuk setiap isolat karena setiap isolat berbeda dalam komposisi basa G-C nya (Esco, 2009).

**Kesimpulan**

DNAS. *aureus* dapat diisolasi menggunakan metoda Mason *et al.* yang dimodifikasi, yaitu mengganti lisostaphin dengan lisozim, dengan diperoleh kemurnian antara 1,8 sampai 2,2. Protokol yang dikembangkan untuk pengujian dengan instrumen Real Time PCR, dapat



digunakan untuk mengidentifikasi isolat *S. aureus* berdasarkan sekuens 16S rRNA kultur referensi. Primer 63F/1387R dapat digunakan untuk mengamplifikasi genom 16S rRNA *S. aureus*, tetapi hasil yang lebih spesifik diperoleh dengan menggunakan primer 63sF/63sR3.

### Ucapan Terimakasih

Tim peneliti mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini dengan pendanaan BOPTN Perguruan Tinggi tahun 2013.

### Daftar Pustaka

- Andree KB, Fernández-Tejedor M, Elandalousi LM, Quijano-Scheggia S, Sampedro N, Garce E, Camp J, Dioge`ne J. 2011. Quantitative PCR Coupled with Melt Curve Analysis for Detection of Selected Pseudo-nitzschiaspp. (Bacillariophyceae) from the Northwestern Mediterranean Sea. *Applied Environmental Microbiology* 77(5):1651-1659. Doi10.1128/AEM.01978-10.
- Duquenne M, Fleurot I, Aigle M, Darrigo C, Boreze`e-Durant E, Derzelle S, Bouix M, Deperrois-Lafarge V, Delacroix-Buchet A. 2010. Tool for Quantification of Staphylococcal Enterotoxin Gene Expression in Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5): 1367–1374.
- Doyle, JJT dan Doyle, JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-18
- Esco. 2009. User Manual Swift Spectrum 48 Fluorescence Quantitative PCR Detection System. Esco Healthcare Pte. Ltd.
- Khoiriyah F. 2011. Identifikasi Molekular Isolat Lokal *Staphylococcus aureus* dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR). Tesis. IPB
- Kusumaningrum HD, G Riboldi, WC Hazeleger, and RR Beumer. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*, 85:227-236.
- Lee, YD, Moon BY, Park JH, Chang HI, Kim WJ. 2007. Expression of Enterotoxin Genes in *Staphylococcus aureus* Isolates Based on mRNA Analysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(3): 461–467.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG. 1998. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2): 2 795-799
- Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. 2001. Multiplex PCR Protocol for the Diagnosis of Staphylococcal Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9): 3332–3338.
- Wu JA, Kusuma C, Mond JJ, Kokai-Kun JF. 2003. Lysostaphin Disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms on Artificial Surfaces. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (11): 3407–14. doi:10.1128/AAC.47.11.3407-3414.2003.
- Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, Gregson DB, Louie T, Conly JM. 2004. New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11):4947-4955