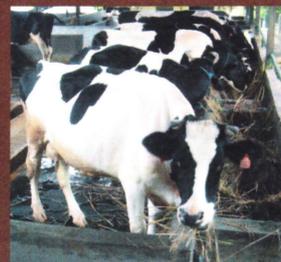


ISBN 978-602-8853-19-4  
978-602-8853-20-0



# PROSIDING SEMINAR HASIL-HASIL PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT INSTITUT PERTANIAN BOGOR 2013

Volume I  
Bidang Pangan  
Bidang Energi  
Bidang Teknologi dan Rekayasa



**DETEKSI BAKTERI PATOGEN DAN FERMENTATIF DARI PANGAN  
MENGUNAKAN *REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION***  
(Detection of Pathogenic and Fermentative Bacteria from Food by Real-Time  
Polymerase Chain Reaction)

**B. Sri Laksmi S. Jenie, Harsi D. Kusumaningrum, Siti Nurjanah**

Dep. Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB.

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan mengembangkan metode deteksi bakteri patogen *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus* dan bakteri fermentatif *Lactobacillus plantarum* menggunakan *real-time* PCR (rt-PCR). Amplifikasi sekuens parsial gen 16S rRNA dengan menggunakan PCR konvensional dan primer spesifik 16 SUNI-L/Saka-2b menghasilkan amplicon sebesar 1000 bp. Protokol rt-PCR dapat digunakan untuk mendeteksi tiga isolat *Cronobacter sakazakii* mulai siklus ke-4 sampai ke-30. Protokol ini menunjukkan spesifitas yang baik dengan kemampuan membedakan antara *C. sakazakii* dan *C. muytjensii* dengan suhu puncak pelelehan ( $T_m$ ) sebesar 85,0–85,5 °C. Analisis *L. plantarum* menggunakan rt-PCR dengan primer 1541R/9F dan *L. plantarum* sa28k sebagai kultur standar, berhasil mengamplifikasi isolat *L. plantarum* sa28k dan beberapa isolat *Lactobacillus* sp. dengan kondisi sesuai PCR konvensional. Protokol yang digunakan dapat mendeteksi spesies *L. plantarum* sa28k dan mengidentifikasi beberapa isolat *Lactobacillus* sp. ditandai dengan suhu pelelehan yang hampir sama yaitu 85,5 °C. Isolasi DNA *S. aureus* juga berhasil dilakukan dengan metode yang dikembangkan yang ditunjukkan dengan pita DNA pada hasil elektroforesis isolat DNA. Amplifikasi dengan primer 63F dan 1387R menghasilkan produk PCR berukuran 1350 bp, sedangkan amplifikasi dengan primer 16sF dan 16sR3 menghasilkan produk PCR berukuran 240 bp. Suhu pelelehan ( $T_m$ ) gen penyandi 16S rRNA *S. aureus* yang diamplifikasi baik dengan primer 63F/1387R maupun 16sF/16sR3 menggunakan rtPCR berkisar antara 83–84,5 °C. Protokol rt-PCR yang dikembangkan mempunyai spesifitas yang baik dan dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri uji.

Kata kunci: *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *real-time* PCR.

**ABSTRACT**

Protocol of detection method using real time PCR (rt-PCR) was developed for *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus plantarum*. Amplification of partial sequencing of 16S rRNA using conventional PCR and specific primer of 16 SUNI-L/Saka-2b resulted in 1000 bp amplicon. The rt-PCR protocol could be used to detect three isolates of *Cronobacter sakazakii* began at cycle 4 until cycle 30. This protocol showed good specificity with the ability to differentiate between *C. sakazakii* and *C. muytjensii* with the peak of melting temperatures ( $T_m$ ) were at 85,0–85,5 °C. Analysis of *L. plantarum* using rt-PCR with 1541R/9F primer and *L. plantarum* sa28k as standard culture successfully amplified *L. plantarum* sa28k isolate and several isolates of *Lactobacillus* sp. under PCR conventional condition. The protocol could be able to detect *L. plantarum* sa28k species and identify several *Lactobacillus* sp. isolates indicated by the similar melting temperature at 85.5 °C. Isolation of *S. aureus* DNA was also successfully performed by the developed protocol represented by the DNA bands obtained from electrophoresis of the DNA isolate. Amplification using 63F and 1387R primers produced 1350 bp PCR product, while 16sF dan 16sR3 primers produced

240 bp PCR product. Melting temperatures of the encoded gene of 16S rRNA *S.aureus* amplified either by 63F/1387R or 16sF/16sR3 primers using rtPCR ranged between 83–84,5 °C. The developed protocol had good specificity and can be used to detect the test bacteria using rt-PCR.

Keywords: *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, real-time PCR.

## 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* dan *Cronobacter sakazakii* (sebelumnya dikenal sebagai *Enterobacter sakazakii*), adalah dua 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). *C. sakazakii* juga dilaporkan mampu bertahan dalam kondisi kering. Di Indonesia, isolasi bakteri ini dari beberapa jenis pangan telah dilaporkan (Dewanti-Hariyadi *et al.* 2012).

Bakteri asam laktat (BAL) seperti *Lactobacillus* sp (fermentatif Gram positif) banyak digunakan dalam proses fermentasi pangan, tetapi juga ditemukan dapat menyebabkan kerusakan pangan. Berbagai jenis Bal telah berhasil diisolasi dari produk pangan, diantaranya adalah dari sawi asin dan buah pisang. Hasil identifikasi genotipik isolat BAL yang tumbuh selama fermentasi spontan pisang var agung semeru adalah *L. salivarius* dan *L. fructivorans* (Nurhayati *et al.* 2011). Berdasarkan sifat fermentatif yang dimiliki, bakteri ini banyak dimanfaatkan untuk pengembangan produk fermentasi fungsional. Untuk tujuan ini, diperlukan informasi identitas BAL sampai tingkat strain yang dapat diperoleh dengan menerapkan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

PCR adalah salah satu metode deteksi bakteri berbasis biologi molekuler. Metode PCR merupakan teknik yang sangat berguna dalam membuat salinan DNA, dan umumnya digunakan pada analisis secara kualitatif. Untuk analisis dengan tujuan mengkuantifikasi DNA target dapat digunakan metode *real-time polymerase chain reaction*, juga disebut *real-time polymerase chain reaction*

kuantitatif (qPCR). Untuk satu atau lebih urutan tertentu dalam sampel DNA, *Real Time* 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). Kinerja real-time PCR seringkali dievaluasi dengan cara menetapkan Nilai Ct (Treshold Cycle), Nilai Tm (Suhu puncak pelelehan) dan Kurva Standar. Nilai Ct adalah jumlah siklus yang sudah dapat mendeteksi adanya DNA. Nilai Ct dapat digunakan untuk menetapkan limit deteksi. Nilai Tm dapat digunakan sebagai spesifitas uji dan Kurva Standar dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi isolat dalam sampel uji. Penelitian ini dilakukan untuk mengembangkan metode dan mendeteksi bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Cronobacter sakazakii* dan fermentatif asal pangan (*Lactobacillus sp.*) menggunakan metode real-time PCR.

### METODE PENELITIAN

Isolat yang digunakan adalah isolat *C. sakazakii*, isolat *Lactobacillus sp.* dan isolat *S. aureus* yang merupakan koleksi Staf bagian Mikrobiologi Pangan Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan IPB (Tabel 1).

Tabel 1 Isolat uji yang digunakan dalam penelitian

Kelompok Bakteri Uji	Isolat	Kode isolate	Sumber
<i>Cronobacter spp.</i>	Isolat standar	<i>C. sakazakii</i> FWH d16	Lada bubuk
	Isolat uji lain (sampel)	<i>C. sakazakii</i> FWH b6	Tepung terigu
		<i>C. sakazakii</i> FWHd2c	Cabai bubuk
		<i>C. muytjensii</i> ATCC 53129	ATCC
<i>S. aureus</i>	Isolat referensi	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	ATCC
	Isolat uji lain (sampel)	<i>S. aureus</i> UA1	Tumis usus ayam
		<i>S. aureus</i> UA13	Usus ayam
<i>Lactobacillus sp.</i>	Isolat standar	<i>L. plantarum</i> sa28k	Saurkraut
	Isolat uji lain (sampel)	<i>Lactobacillus sp.</i> (pi)	Pikel
		<i>Lactobacillus sp.</i> (tpyk)	Tempoyak
		<i>Lactobacillus sp.</i> (mam325)	Mandai
		<i>Lactobacillus sp.</i> (mab427)	Mandai

### **Isolasi DNA *Cronobacter sakazakii***

Isolat ditumbuhkan pada media Lactosa Broth (LB) selama  $\pm 24$  jam pada *waterbath shaker*. Kemudian dilakukan isolasi DNA genom bakteri menggunakan metode ekstraksi fenol-kloroform (Brown 1992 dalam Gitapratwi *et al.* 2012). Isolat yang telah ditumbuhkan kemudian disentrifugasi pada 8000 rpm selama 3 menit. Pelet diresuspensi dalam 200  $\mu$ l bufer Tris-EDTA (TE) dengan vorteks, ditambahkan 50  $\mu$ l Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) 10% dan dicampur sampai suspensi terlihat jernih. Sepuluh  $\mu$ l proteinase-K (10 mg/ml) ditambahkan dan diinkubasi pada 37 °C selama 1 jam, kemudian ditambahkan 80  $\mu$ l Cethyltrimethyl Ammonium Bromide/Natrium Chlorida (CTAB/NaCl) dan diinkubasi pada 65 °C selama 20 menit. Selanjutnya, ke dalam campuran ditambahkan campuran phenol:chloroform:isoamil alkohol (P:C:I; 25:24:1) dengan rasio 1:1 dan divorteks selama 2 menit. Campuran disentrifugasi pada 13500 rpm selama 10 menit dan fase cairan (*top layer*) dipindahkan ke tabung baru, ditambahkan dengan campuran C:I (24:1) dengan volume yang sama. Campuran disentrifugasi pada 13500 rpm selama 10 menit hingga fase terpisah dan *top layer* dipindahkan ke tabung baru. Selanjutnya ditambahkan 0,1 volume Na-asetat 3M (pH 5.2) dan isopropanol dengan dua kali volume larutan. Tabung diinkubasi pada -20 °C selama 1 jam dan presipitasi DNA dilakukan dengan sentrifugasi pada 13500 rpm selama 10 menit. Presipitat DNA ditambah dengan 500  $\mu$ l etanol 70% dan disentrifugasi pada 13500 rpm selama 10 menit. Pelet DNA dikeringkan dan diresuspensi dalam 100  $\mu$ l TE.

Kuantifikasi DNA dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui konsentrasi sekaligus tingkat kemurniannya pada OD 260 dan OD 280. Verifikasi DNA dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1.5% pada 120 V selama 40 menit 1x buffer TAE. Gel lalu diwarnai dengan *Ethidium Bromide* (EtBr) dan divisualisasi pada Geldoc XR (Bio-Rad).

### **Isolasi DNA *Lactobacillus* sp.**

Masing-masing isolat ditumbuhkan pada media LB selama semalam pada *waterbath shaker*. Kemudian dilakukan isolasi DNA genom bakteri menggunakan metode ekstraksi fenol-kloroform (Sambrook *et al.* 2001 dengan modifikasi). Isolat yang telah ditumbuhkan kemudian disentrifugasi pada 8000 rpm selama

3 menit, dan pelet diresuspensi dengan 500 µl buffer TE 1X sebanyak 2 kali. Setelah disentrifugasi, pelet diresuspensi dengan 500 µl buffer TE 1X dan 100 µl lisozim, diinkubasi pada suhu 4 °C selama 5 menit.

Kemudian ditambahkan 25 µl SDS 10%, 50 µl NaCl 5M, dan 100 µl proteinase K (20 mg/ml), divortex dan diinkubasi pada suhu 55 °C selama 2 jam. Selanjutnya ditambahkan 500 µl fenol:kloroform (1:1 v/v), divortex dan diinkubasi -20 °C selama 30 menit, lalu disentrifugasi pada suhu 4 °C, 12000 rpm selama 10 menit. Lapisan air bagian atas diambil dan dipindahkan ke tabung eppendorf baru dan diulang tahap penambahan fenol:kloroform sebanyak 3 kali. Lapisan air bagian atas diambil dan dipindahkan ke tabung eppendorf baru, ditambahkan 500 µl kloroform, disentrifus pada suhu 4 °C, 12000 rpm selama 10 menit. Lapisan air bagian atas selanjutnya dipindahkan ke tabung eppendorf baru, ditambahkan 0.3 kali volume lapisan air ammonium asetat 10M pH 7.4 dan isopropanol dingin 1 kali volume fase aqueous, diinkubasikan -20 °C selama semalam, kemudian disentrifus 14000 rpm selama 30 menit. Selanjutnya pelet ditambah dengan 500 µl etanol 70% dan disentrifus 12000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet dikeringudarkan, kemudian dilarutkan dalam 50 µl buffer TE 1X. Selanjutnya dilakukan kuantifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis dan verifikasi DNA dengan elektroforesis sebagaimana tercantum di atas.

### **Isolasi DNA *Staphylococcus aureus***

Kultur *S. aureus* ATCC 25934 dan dua isolat lokal ditumbuhkan pada TSB selama 24 jam pada suhu 37 °C. Isolasi 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. Kultur disentrifugasi pada 8000 rpm selama 10 menit. SDS ditambahkan pada suspensi pelet kultur bersamaan dengan lisozim kemudian diinkubasi dan tanpa penambahan CTAB. Metode 2 merupakan metode Mason *et al.* (2001) yang dimodifikasi, dimana penggunaan lisostaphin diganti dengan lisozim dan tidak menggunakan RNase. Satu mL kultur disentrifus dengan kecepatan 15000 rpm (21,000 x g) selama 1 menit. Pelet kemudian diresuspensi dalam 560 µl of TE buffer (10 mM Tris [pH 7.5] and 1 mM EDTA). Kemudian ditambahkan 5 µl of lisozim (10 mg/ml) dan dicampur dengan membolak-balik. Pada metode Mason

yang dimodifikasi, SDS ditambahkan sesudah inkubasi dengan penambahan lisozim dan ditambahkan CTAB sesudah diinkubasi dengan proteinase-K.

### Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan PCR Konvensional

Amplifikasi gen 16S rRNA *C. sakazakii*, *Lactobacillus sp.* dan *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Applied Biosystem 2720 *Thermal Cycler*) dengan primer reverse dan forward (Tabel 2).

Tabel 2 Urutan sekuens primer yang digunakan dalam pengujian

Bakteri	Urutan Primer	Ukuran Segmen	Referensi
<i>C. sakazakii</i>	Forward: 16SUNI-L AGAGTTTGATCATGGCTCAG) Reverse: Saka-2b (TCCCGCATCTCTGCAGGA)	1000 bp	Hasan <i>et al.</i> 2007
<i>Lactobacillus sp.</i>	Forward: 63f CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC Reverse: 1387r GGG CGG WGT GTA CAA GGC	1350 bp	Marchesi <i>et al.</i> , 1998
	Forward: 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') Reverse: 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3')	800 bp	Arief 2011
<i>S. aureus</i>	Forward: 63f CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC Reverse: 1387r GGG CGG WGT GTA CAA GGC	1350 bp	Marchesi <i>et al.</i> 1998
	Forward: 16sF CCGCCTGGGGAGTACG Reverse: 16sR3 AAGGGTTGCGCTCGTTGC	240 bp	Lee <i>et al.</i> 2007

Proses amplifikasi dengan PCR dilakukan untuk 50 µl campuran reaktan yang masing-masing mengandung masing-masing 2 µl primer *forward* dan *reverse*, 3 µl DNA *template*, (20pmol/µl), 25µl PCR *Master Mix* dan 18 µl akuabides steril. Protokol PCR yang digunakan adalah pre-PCR, denaturasi, penempelan primer, elongasi atau pemanjangan primer dan *post-PCR* dengan siklus sebanyak 30 kali. Kondisi suhu dan waktu yang digunakan pada setiap tahap berbeda untuk setiap isolat sesuai dengan penelitian sebelumnya (Tabel 3).

Tabel 3 Protokol PCR untuk setiap isolat

Bakteri	Protokol PCR (Suhu dan Waktu)					Referensi
	Pre-PCR	Denaturasi	Annealing	Elongasi	Post PCR	
<i>C. sakazakii</i>	94 °C, 4 menit	94 °C, 50 detik	55 °C, 1 menit	72 °C, 50 detik	72 °C, 4 menit	Modifikasi Hasan (Hamdani, 2012)
<i>Lactobacillus sp.</i> dan <i>S. aureus</i>	95 °C, 3 menit	94 °C, 30 detik	55 °C, 30 detik	72 °C, 1 menit	72 °C, 5 menit	Modifikasi Doyle dan Doyle (Khoiriyah, 2011)

### **Verifikasi produk PCR dengan elektroforesis**

Sebanyak 10 µl hasil PCR divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis (BIORAD) pada gel agarosa 1,5% (w/v) dengan bufer 1x TAE pada voltase 110 V selama 30 menit.

### **Deteksi gen 16srRNA dengan Real-Time PCR**

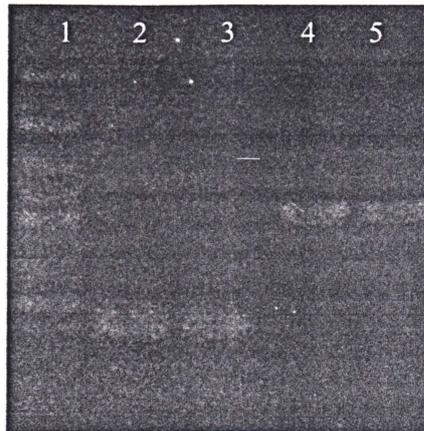
Tahap ini dilakukan untuk mendapatkan kurva amplifikasi untuk setiap isolat. Sebanyak 2,0 µl isolat dicampur dengan 9,5 µl RNase free water; 12,5 µl SYBR Green supermix; 0,5 µl masing-masing forward dan reverse primer. Volume total larutan adalah 25 µl. Larutan tersebut diamplifikasi dengan kondisi PCR untuk masing-masing isolat seperti yang dilakukan pada PCR konvensional (Tabel 2). Siklus yang digunakan sebanyak antara 30 sampai 40 siklus dan dilanjutkan dengan pelelehan untuk memperoleh kurva pelelehan (*melting curve*) yang akan digunakan untuk menentukan spesifisitas uji. Kondisi runing rt-PCR ditentukan untuk setiap jenis bakteri. Kinerja real-time PCR dievaluasi dengan cara menetapkan Nilai Ct (*Threshold Cycle*), Nilai Tm (suhu puncak pelelehan) dan Kurva Standar. Nilai Ct dapat digunakan untuk menetapkan limit deteksi sedangkan nilai Tm dapat digunakan sebagai spesifitas metode.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Konfirmasi *Cronobacter sakazakii* Menggunakan PCR Konvensional**

Isolat lokal Indonesia *C. sakazakii* FWH d16 dan *C. sakazakii* FWH b6 yang dianalisis menggunakan PCR dengan dua pasangan primer ESA-1/16SUNI-R menghasilkan produk berukuran 400 bp, dan dengan 16SUNI-L/Saka-2b menghasilkan produk berukuran 400 bp (Gambar 1).

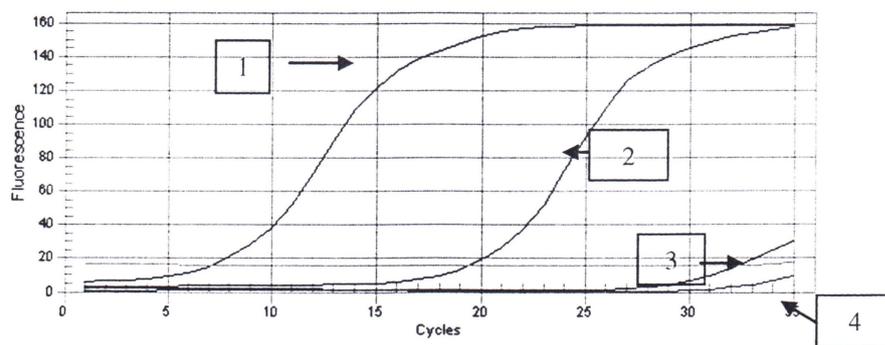
Amplifikasi menggunakan primer yang sama terhadap isolat lokal *C. sakazakii* lainnya telah dilakukan oleh Gitapratwi *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa produk segmen 1 (16SUNI-L/Saka-2b) berukuran 950 bp sedangkan segmen 2 (ESA-1/16SUNI-R) berukuran 400 bp. Amplifikasi gen 16S rRNA *C. sakazakii* yang dilakukan oleh Hassan *et al.* (2007) menyatakan bahwa pasangan primer ESA-1/16SUNI-R dan 16SUNI-L/Saka-2b masing-masing menghasilkan produk berukuran 408 bp dan 977 bp.



Gambar 1 Elektroforesis Gen 16S rRNA *C. sakazakii*. 1: DNA ladder 100 bp; 2: *C. sakazakii* FWH d16 dengan primer ESA-1/16SUNI-R; 3: *C. sakazakii* FWH b6 dengan primer ESA-1/16SUNI-R; 4: *C. sakazakii* FWH d16 dengan primer 16SUNI-L/Saka-2b; 5: *C. sakazakii* FWH b16 dengan primer 16SUNI-L/Saka-2b.

### Kualifikasi Gen 16S rRNA *Cronobacter Sakazakii* Dengan Real-time PCR

Kondisi running rt-PCR menggunakan kondisi running sesuai dengan PCR konvensional dengan penambahan pre-PCR, post PCR, dan kondisi melting. Kondisi yang digunakan dapat mendeteksi spesies *C. sakazakii* yang ditandai dengan kurva amplifikasi yang baik sampai siklus ke-31. Setelah siklus ke-31, kondisi tersebut tidak sensitif karena dapat mengamplifikasi kontrol negatif dan spesies *Cronobacter* spp. lainnya, yaitu *C. muytjensii* (Gambar 2).

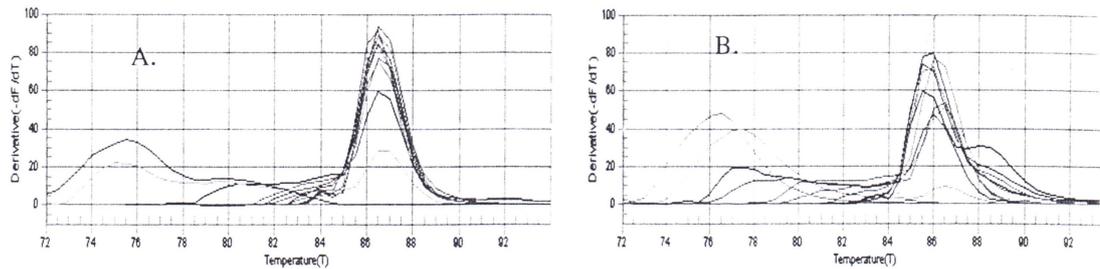


Gambar 2 Kurva Amplifikasi Isolat *C. sakazakii*, (1) *C. sakazakii* FWH d2c, (2) *C. sakazakii* FWH b6, (3) *C. muytjensii* ATCC 51329, dan (4) kontrol negatif.

### Spesifisitas Uji *Cronobacter sakazakii* dengan real-time PCR

Kurva pelelehan digunakan untuk menentukan suhu pelelehan. Nilai suhu pelelehan yang sama dari masing-masing sampel uji menunjukkan spesifisitas penggunaan primer dalam mendeteksi bakteri. Bakteri *C. sakazakii* FWH d16

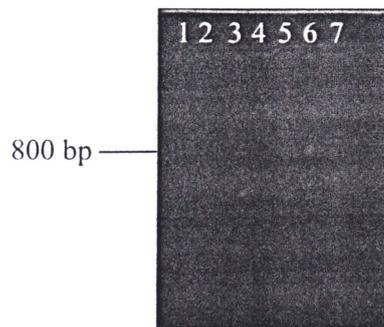
memiliki suhu pelelehan 86,5 °C jika diamplifikasi dengan primer 16SUNI-L/Saka-2b dan berkisar antara 85.5–86.5°C dengan menggunakan primer ESA-1/16SUNI-R (Gambar 3).



Gambar 3 Kurva Pelelehan *Cronobacter sakazakii* FWH d16(A) primer 16SUNI-L/Saka-2b, (B) ESA-1/16SUNI-R.

### Konfirmasi *Lactobacillus sp.* menggunakan PCR konvensional

Isolasi DNA genom dengan metode modifikasi Sambrook (2001) menghasilkan DNA dengan jumlah yang cukup, tidak mendegradasi DNA, tidak terdapat kontaminasi, ditandai dengan pita yang terlihat nyata pada gel agarosa. Sebaliknya dengan metode Klijn (1991), pita tampak *smear*, mengindikasikan DNA terkontaminasi. Amplifikasi DNA yang mengkode 16S rRNA dilakukan dengan menggunakan primer universal 1541R dan 63F. Dari hasil amplifikasi sekuen parsial gen 16S rRNA dengan kondisi *running* PCR sesuai metode, pita tunggal DNA terlihat pada kisaran 800 bp seperti yang diharapkan (Gambar 4).

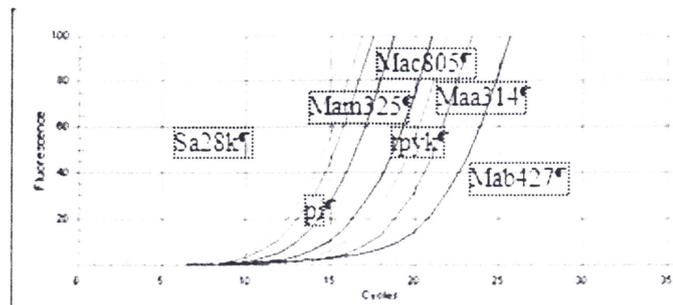


Gambar 4 Visualisasi DNA hasil amplifikasi PCR konvensional *Lactobacillus sp.* Dari kiri: (1) *L. plantarum* Sa28k, (2) Pi, (3) Tpyk, (4) DNA ladder, (5) Mam325, (6) Mab427, (7) Maa314.

### Kualifikasi Gen *Lactobacillus sp* dengan *Real-time* PCR

Kondisi *running* rt-PCR dilakukan dengan menggunakan kondisi *running* sesuai dengan PCR konvensional dengan penambahan pre-PCR, post PCR, dan

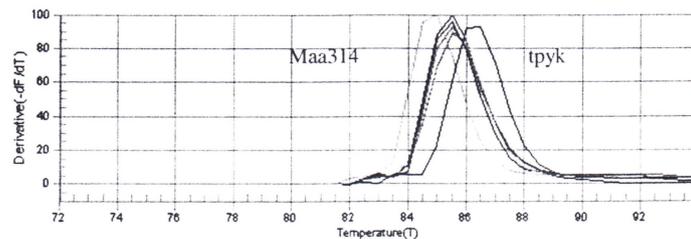
kondisi *melting*. Kondisi yang digunakan dapat mendeteksi spesies *L.plantarum sa28k* yang ditandai dengan kurva amplifikasi yang baik selama 30 siklus. Masing-masing isolat *Lactobacillus* sp. terdeteksi dengan baik dengan nilai Ct berbeda sesuai konsentrasi DNANYa (Tabel 4).



Gambar 5 Kurva amplifikasi *L.plantarum sa28k* dan beberapa isolat *Lactobacillus* yang belum teridentifikasi.

**Spesifisitas Uji *Lactobacillus* sp dengan Real-time PCR**

Nilai suhu pelelehan (*melting point*) akan menentukan apakah sampel berasal dari spesies yang sama dengan kultur acuan. Pada kurva pelelehan untuk sampel, sampel *Lactobacillus* dari Tpyk dan Maa314 menunjukkan nilai suhu pelelehan yang berbeda dengan kultur standar, mengindikasikan jika keduanya merupakan spesies yang berbeda (Tabel 4 dan Gambar 6).



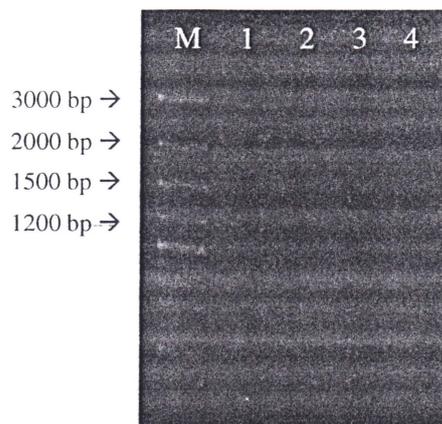
Gambar 6 Kurva pelelehan *L.plantarum sa28k* dan isolat *Lactobacillus* sp.

Tabel 4 Nilai CT dan suhu pelelehan untuk *L.plantarum sa28k* dan beberapa isolat *Lactobacillus*

Isolat	CT	Suhu Melting (°C)
<i>L.plantarum sa28k</i>	15,64	85,5
Tpyk	19,8	86,5
Pi	16,3	85,5
Mam35	17,55	85,5
Mab427	24,4	85,5
Maa314	20,72	85,0
Mac805	22,12	85,5

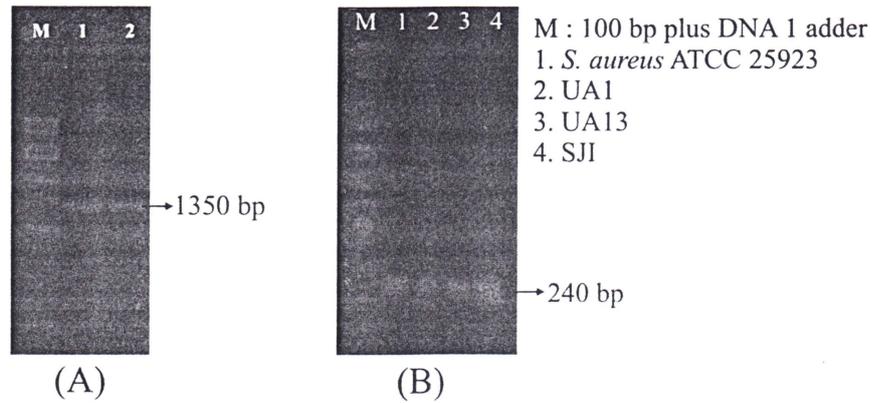
### Isolasi DNA *S. aureus* dan Identifikasi Menggunakan PCR Konvensional

Ekstraksi DNA *S. aureus* dilakukan dengan 2 metode yaitu modifikasi metode Mason (2011) sebagai metode 1 dan metode Doyle dan Doyle (1990) sebagai metode 2. Pada metode Doyle dan Doyle, SDS ditambahkan pada suspensi pelet kultur bersamaan dengan lisozim kemudian diinkubasi dan tanpa penambahan CTAB. Pada metode Mason yang dimodifikasi, SDS ditambahkan sesudah inkubasi dengan penambahan lisozim dan ditambahkan CTAB sesudah diinkubasi dengan proteinase-K. Isolasi dengan metode (2) tidak menunjukkan adanya pita DNA pada hasil elektroforesis DNA genom, sedangkan dari isolasi dengan metode (1) diperoleh isolat DNA yang ditunjukkan dengan adanya pita DNA pada hasil elektroforesis (Gambar 7).



Gambar 7 Hasil elektroforesis isolat DNA genom *S. aureus* (M= marker 100 bp plus DNA ladder; 1= *S. aureus* ATCC 25293 (metode 1); 2= Isolat UA1 (metode 1); 3= *S. aureus* ATCC 25293 (metode 2); 4= Isolat UA1 (metode 2)).

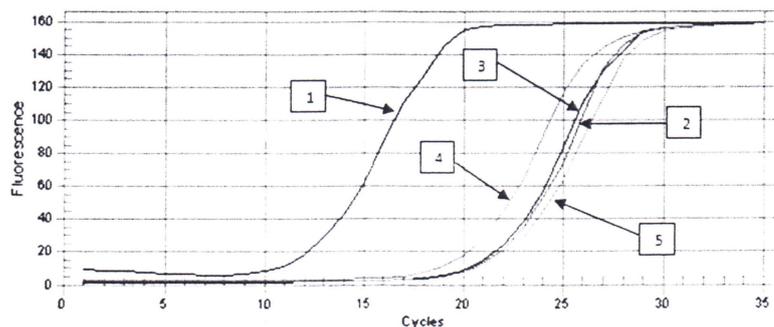
Pada hasil isolasi DNA genom dengan metode (1) diperoleh 3 pita DNA, yaitu pita yang terdapat di antara marker 1200 bp dan 1500 bp, di antara marker 2000 bp dan 3000 bp, serta di atas marker 3000 bp. Isolat DNA yang diperoleh kemudian digunakan sebagai templat pada amplifikasi gen 16s rRNA dengan PCR konvensional. Pada proses amplifikasi ini digunakan primer 63F dan 1387R dengan ukuran amplicon 1350 bp (Gambar 8).



Gambar 8 Hasil elektroforesis amplifikasi gen 16s rRNA (A) dengan primer 63F dan 1387R (M= marker 1 kb DNA ladder; 1= *S. aureus* ATCC 25293; 2= Isolat UA1); (B) dengan primer 63sF/63sR3. M= marker 1 kb DNA ladder; 1= *S. aureus* ATCC 25293; 2= Isolat UA1; 3= Isolat UA13; 4= Isolat SJI.

### Kualifikasi Gen *S. aureus* dengan *Real-time PCR*

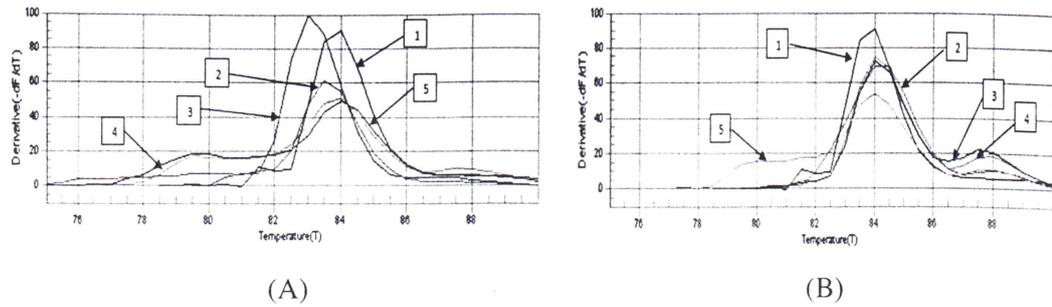
Pada amplifikasi gen penyandi 16S rRNA menggunakan real-time PCR dengan primer 16sF dan 16sR3, digunakan kondisi PCR, yaitu pre-denaturasi selama 1 menit pada 95 °C, 35 siklus amplifikasi (denaturasi 1 menit pada 95 °C, *annealing* 1 menit pada 55 °C, *extention* 1 menit pada 72 °C), dan terminasi pada 72 °C selama 5 menit (Lee *et al.* 2007). Nilai  $C_T$  standar *S. aureus* ATCC 25923 dan beberapa isolat ditampilkan pada Gambar 9.



Gambar 9 Kurva amplifikasi isolat *S. aureus* dengan primer 16sF dan 16sR3 (1= *S. aureus* ATCC 25923 100 ng/μl; 2= UA1; 3= UA13; 4= SJI; 5: tanpa templat).

### *Spesifisitas uji Staphylococcus aureus menggunakan real-time PCR*

Penggunaan primer 16sF dan 16sR3 menghasilkan suhu pelelehan ( $T_m$ ) yang mendekati dengan  $T_m$  gen penyandi 16S rRNA yang diamplifikasi menggunakan primer 63F dan 1387R, yaitu berkisar antara 83–84,5 °C (Gambar 10).



Gambar 10 (A) Kurva pelelehan standar *S. aureus* dengan primer 16sF dan 16sR3 (1= 1000 ng/μl); 2= 100 ng/μl; 3= 10 ng/μl; 4= 1 ng/μl; 5= 0.1 ng/μl); (B) Kurva pelelehan isolat *S. aureus* dengan primer 16sF dan 16sR3 (1= *S. aureus* ATCC 25923 1000 ng/μl; 2= UA1; 3= UA13; 4= SJI; 5: tanpa templat).

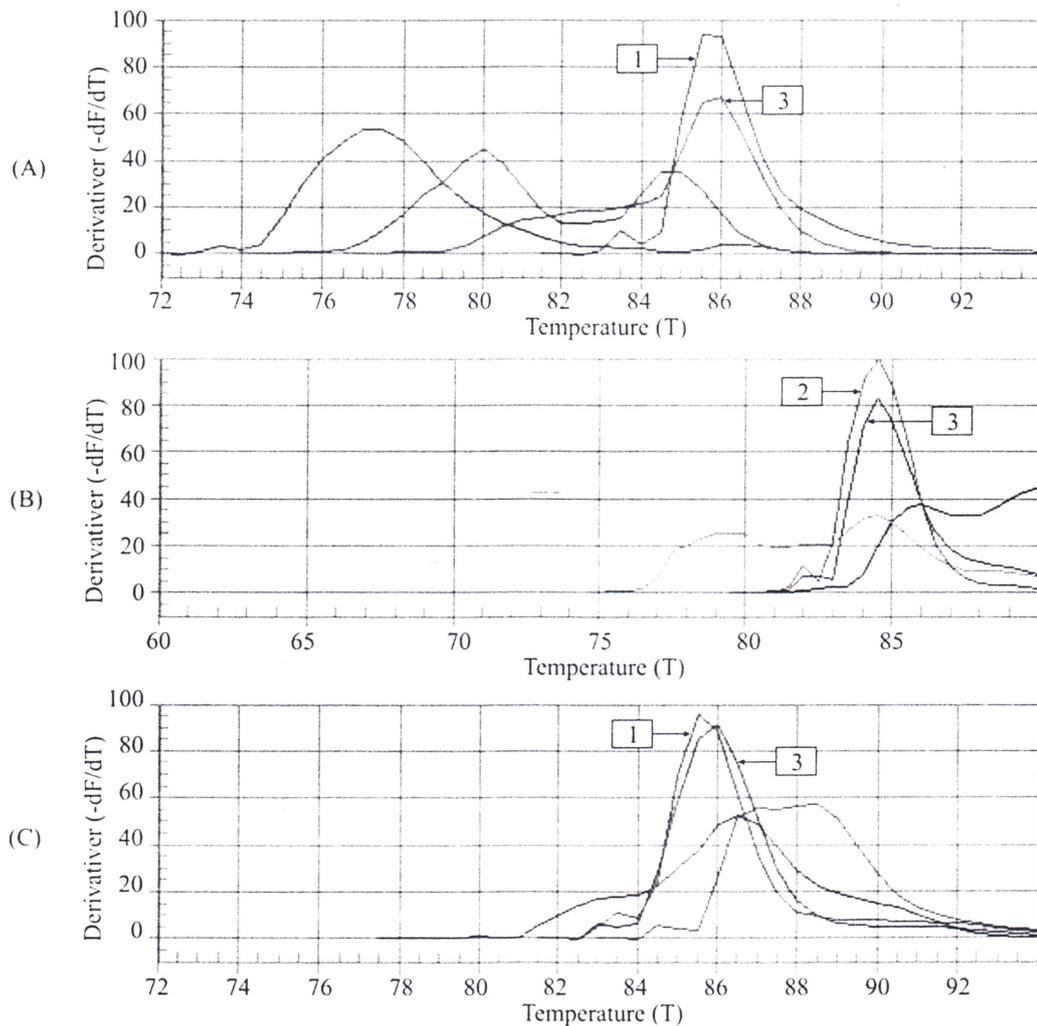
### Spesifisitas metode deteksi menggunakan *real-time* PCR

Dalam penelitian ini analisis *real-time* PCR menggunakan SYBR green I digunakan untuk membedakan bakteri patogen ataupun bakteri fermentatif dari kultur murni. Bakteri patogen yang digunakan diantaranya *C. sakazakii* FWH d16 dan *S. aureus* ATCC 25923, adapun *L. plantarum* sa28k digunakan sebagai prekursor untuk bakteri fermentatif. Masing-masing bakteri diamplifikasi menggunakan primer yang berbeda dan spesifik untuk ketiga bakteri tersebut. Primer spesifik untuk *C. sakazakii* yakni ESA-1/16SUNI-R, primer spesifik untuk *S. aureus* adalah 16SF/16SR3 dan primer spesifik untuk *L. plantarum* adalah 9F/1541R.

Tabel 5 Nilai Ct dan suhu melting bakteri patogen dan fermentatif dengan tiga primer berbeda menggunakan *real-time* PCR

Primer	Bakteri	Nilai Ct	Suhu Melting (°C)
ESA-1/16 SUNI-R	Kontrol Negatif	15,69	77,0
	<i>C. sakazakii</i> FWHd16	9,69	85,5
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	15,32	85,0
	<i>L. plantarum</i> sa28k	18,57	86,0
9F/1541R	Kontrol Negatif	20,51	76,5
	<i>C. sakazakii</i> FWHd16	10,18	86,0
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	10,01	88,5
	<i>L. plantarum</i> sa28k	7,59	85,5
16SF/16SR3	Kontrol Negatif	13,22	79
	<i>C. sakazakii</i> FWHd16	11,32	86
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	10,15	84,5
	<i>L. plantarum</i> sa28k	2,33	84,5

Dari ketiga primer tersebut dapat digunakan untuk mengamplifikasi gen *C. sakazakii*, *S. aureus* dan *L. plantarum*. Primer ESA-1/16SUNI-R mengamplifikasi *C. sakazakii* FWH d16 dengan nilai Ct terendah dibanding dua bakteri lainnya (9.69). Primer 16SF/16SR3 dan 9F/1541R memiliki nilai Ct terendah untuk bakteri *L. plantarum* sa28k, yang masing-masingnya bernilai 2,33 dan 7,59 (Tabel 5).



Gambar 11 Kurva Pelelehan (1) *C. sakazakii* FWH d16, (2) *S. aureus* ATCC 25923, (3) *L. plantarum* sa28k. A. amplifikasi menggunakan primer ESA-1/16SUNI-R, B. amplifikasi menggunakan primer 16SF/16SR3, dan C. amplifikasi menggunakan primer 9F/1541R.

Kurva pelelehan digunakan untuk menentukan suhu pelelehan dari masing-masing isolat bakteri. Dalam penelitian ini terlihat bahwa suhu pelelehan berkisar antara 84,5–88,5 °C (Gambar 11). Dengan primer ESA-1/16SUNI-R, *S. aureus*

dapat dibedakan dari *C. sakazakii* dan *Lactobacillus* sp, sedangkan *C. sakazakii* dan *Lactobacillus* sp menunjukkan satu suhu pelelehan ( $T_m$ ). Selanjutnya hasil menunjukkan bahwa dengan primer 16SF/16SR3, *C. sakazakii* dapat dibedakan dari *S. aureus* dan *Lactobacillus* sp, sedangkan *S. aureus* dan *Lactobacillus* sp menunjukkan satu  $T_m$ . Dengan primer 9F/1541R, *S. aureus* dapat dibedakan dari *C. sakazakii* dan *Lactobacillus*; sedangkan *C. sakazakii* dan *Lactobacillus* sp menunjukkan suhu pelelehan yang berdekatan. Dengan demikian, analisis suhu pelelehan belum dapat digunakan secara optimal untuk membedakan isolat bakteri spesifik. Hal ini kemungkinan disebabkan karena SYBR green yang digunakan dapat mengikat DNA rantai ganda yang tidak spesifik ataupun terjadinya *primer dimer*. Ahmed *et al.* (2008) menyatakan bahwa untuk meminimalisir terjadinya *primer dimer* atau teramplifikasinya produk yang tidak spesifik, dapat dilakukan dengan mengoptimasi suhu *annealing* dan konsentrasi primer yang digunakan.

## KESIMPULAN

Amplifikasi sekuens parsial gen 16S rRNA *C. sakazakii* dengan menggunakan PCR konvensional dan primer spesifik 16 SUNI-L/Saka-2b menghasilkan amplicon sebesar 1000 bp. Protokol rt-PCR dapat digunakan untuk mendeteksi ketiga isolat *Cronobacter sakazakii* mulai siklus ke-4 sampai ke-30. Protokol ini sudah menunjukkan spesifitas yang baik dengan kemampuan membedakan antara *C. sakazakii* dan *C. muytjensii*.

Analisis *L. plantarum* menggunakan RT-PCR, yang dilakukan dengan primer 1541R/9F dan *L. plantarum* sa28k sebagai kultur standar, berhasil mengamplifikasi isolat *L. plantarum* sa28k dan beberapa isolat *Lactobacillus* sp.

Untuk pengujian *S. aureus*, amplifikasi dengan primer 63F dan 1387R menghasilkan produk PCR berukuran 1350 bp, sedangkan amplifikasi dengan primer 16sF dan 16sR3 menghasilkan produk PCR berukuran 240 bp. Walaupun demikian, amplifikasi gen 16S rRNA dengan real-time PCR menggunakan primer 16sF dan 16sR3 menghasilkan kurva standar antara konsentrasi dan nilai  $C_T$  dengan nilai  $r^2$  yang lebih baik dibandingkan pada penggunaan primer 63F dan

1387R. Protokol rt-PCR dapat digunakan untuk mendeteksi tiga isolat *S. aureus* yang berasal dari produk pangan.

Analisis suhu pelelehan ( $T_m$ ) belum dapat digunakan secara optimal untuk membedakan isolat bakteri spesifik. Hal ini kemungkinan disebabkan karena SYBR green yang digunakan dapat mengikat DNA rantai ganda yang tidak spesifik ataupun terjadinya *primer dimer*. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut menggunakan konsentrasi primer dan molekul reporter fluoresens yang lebih spesifik (probe) sehingga dapat diperoleh hasil yang lebih konsisten.

Pada tahun pertama ditentukan dan dikembangkan metode deteksi bakteri target yang berasal dari kultur murni. Perlu ditentukan dan dikembangkan metode deteksi bakteri target langsung dari matriks pangan, sehingga dapat mempercepat deteksi bakteri, terutama patogen, secara biologi molekuler dari produk pangan.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

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

- Ahmed W, Huygens F, Goonetilleke A, Gardner T. 2008. Real-time PCR detection of pathogenic microorganism in roof-harvested rainwater in Southeast Queensland, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(17): 5490–5496.
- Arief II. 2011. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Indigenus Asal Daging Sapi Sebagai Probiotik dan Identifikasinya dengan Sekuensing 16srRNA. [Disertasi]. Bogor(ID): Institut Pertanian Bogor.
- Dewanti-Hariyadi R, Larasati F, Nuraida L. 2012. Survival of *Cronobacter sakazakii* in milk during spray drying, storage and reconstitution. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 23(2): 186–192.
- 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.

- Gitapratwi D, Dewanti-Hariyadi R, Hidayat SH. 2012. Genetic relatedness of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) isolated from dried food products in Indonesia. *International Food Research Journal*. 19(4): 1745–1749.
- Hamdani FW. 2012. Evaluasi Keragaman Genetika Isolat Lokal *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) yang diperoleh dari Produk Pangan Kering. [Tesis]. Bogor(ID): Institut Pertanian Bogor.
- Hassan AA, Akineden Ö, Kress C, Estuningsih S, Schneider E, Usleber E. 2007. Characterization of the gene encoding the 16s rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR methods. *International Journals of Microbiology*. 116 (2): 243–248.
- Kusumaningrum HD, Riboldi G, Hazeleger WC, Beumer RR. 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 JH, Park JH, Chang HI, Kim WJ. 2007. Expression of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates based on mRNA analysis. *J Microbiol Biotechnol*. 17(3):461–467.
- Nurhayati B, Jenie BSL, Kusumaningrum HD, Widowati S. 2011. Identifikasi fenotipik dan genotipik bakteri asam laktat asal fermentasi spontan pisang var. agung semeru (*Musa paradisiaca formatypica*). *Jurnal Ilmu Dasar*. 12(2): 210–225.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning : A laboratory manual*, 3rd Edition. Vol 1 (1.116-1.118). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.