

IDENTIFIKASI BAKTERI PATOGEN PADA PRODUK PERIKANAN DENGAN TEKNIK MOLEKULER

Dwiyitno^{*)}

ABSTRAK

Kasus infeksi dan keracunan produk perikanan sering terjadi akibat mengkonsumsi makanan yang telah terkontaminasi, baik oleh mikroba patogen penyebab infeksi maupun mikroba promotor toksin (intoksikasi). Beberapa jenis bakteri patogen yang sering ditemukan pada produk perikanan antara lain: *Vibrio parahaemolyticus* dan jenis *Vibrio* lainnya, *Escherichia coli*, *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, dan *Shigella* spp. Isolasi dan identifikasi mikroba patogen pada produk perikanan sering sulit dilakukan karena beragamnya jenis bakteri kontaminan dan *indigenous*, sementara konsentrasi bakteri patogen relatif sedikit. Selama 3 dasawarsa terakhir, telah berkembang sejumlah metode baru dalam identifikasi mikroba patogen pada produk pangan, khususnya dengan teknik molekuler, bahkan beberapa telah diterima sebagai standar internasional seperti teknik reaksi polimerase berantai (*polymerase chain reaction/PCR*) dan turunannya. Terlepas dari kelemahannya, metode identifikasi bakteri patogen dengan teknik molekuler telah menawarkan beberapa keuntungan untuk dijadikan metode identifikasi alternatif, baik pada analisis rutin maupun untuk keperluan skrining bakteri pada produk perikanan.

ABSTRACT: *Molecular-based identification for fish and seafood pathogenic bacteria.*
By: Dwiyitno

*Food infection and intoxication of fish products are common due to consumption of food exposed by either pathogenic or toxin promoter bacteria. A number of pathogenic bacteria have been identified related to fish and seafood such as **Vibrio parahaemolyticus** and other **Vibrios**, **Escherichia coli**, **Aeromonas** spp., **Salmonella** spp., **Staphylococcus aureus**, **Listeria monocytogenes**, **Clostridium botulinum**, **C. perfringens**, and **Shigella** spp. However, isolation and identification of pathogenic bacteria from fish and seafood are often difficult due to the high number of contaminating and indigenous bacteria, while numbers of pathogenic bacteria are relatively low. In the last 3 decades, several molecular methods have been developed and adopted as official standard to supplement classical method, such as polymerase chain reaction (PCR) and its applications. Besides its limitation, molecular based identification offers advantages as routine or screening analytical protocol for pathogenic bacteria in fish and seafood products.*

KEYWORDS: *pathogenic bacteria, fish, DNA molecular, PCR*

PENDAHULUAN

Kasus infeksi/keracunan produk perikanan sering terjadi akibat mengkonsumsi makanan yang telah terkontaminasi, baik oleh mikroba patogen penyebab infeksi maupun mikroba penghasil toksin (intoksikasi). Beberapa jenis produk perikanan yang sering menyebabkan keracunan antara lain ikan kembung, tongkol, salem, dan siput dengan gejala mulai dari mata merah, muntah-muntah, perut mual, kepala pusing, badan lemas, hingga beberapa korban meninggal dunia (Anon., 2010a;b;c;d). Sejumlah salmon beku juga pernah ditarik dari pasaran di Kanada dan New York karena terindikasi tercemar *Listeria monocytogenes* (Anon., 2008a;b). Namun demikian, catatan frekuensi kejadian keracunan makanan sulit ditelusuri karena kasusnya banyak yang tidak dilaporkan, kecuali terhadap kasus-kasus

yang luar biasa. Hal ini karena kebanyakan kasus keracunan berupa gangguan pencernaan dengan gejala yang tidak berlangsung lama, bahkan sering tidak terlihat pada individu dengan kondisi kekebalan/imunitas yang baik (Novotny *et al.*, 2004).

Beberapa spesies bakteri patogen yang sering ditemukan pada ikan dan produk perikanan antara lain: *Vibrio parahaemolyticus* dan jenis *Vibrio* lainnya, *Escherichia coli*, *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, dan *Shigella* spp. (Feldhusen, 2000; Novotny *et al.*, 2004). Adapun beberapa jenis bakteri tertentu berperan sebagai pemicu pembentukan toksin pada produk perikanan misalnya histamin pada ikan-ikan scombroid seperti tuna (*Thunnus* sp.), mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*), sardin (*Sardinella pilchardus*) dan makerel (*Scomber scombrus*) (Lipp & Rose, 1997; Kim *et al.*, 2001).

^{*)} Peneliti pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Email: dwiyitno@yahoo.com

Jenis bakteri pemicu pembentukan histamin antara lain: *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Clostridium* spp., *Escherichia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., dan *Vibrio harveyii* (Kim *et al.*, 2001).

Isolasi dan identifikasi mikroba patogen pada produk perikanan sering sulit dilakukan karena beragamnya jenis bakteri kontaminan termasuk bakteri *indigenous*, sementara jumlah/konsentrasi bakteri patogennya relatif sedikit. Sehingga kebanyakan metode konvensional menggunakan metode pengkayaan (*enrichment*) selektif, bahkan bila perlu melalui tahap pra-pengkayaan (*pre-enrichment*) yang dianggap kurang efektif dan efisien (Olsen, 2000). Oleh karena itu diperlukan metode isolasi dan identifikasi yang lebih efektif, cepat, dan akurat.

Selama 3 dasawarsa terakhir, telah berkembang sejumlah metode baru dalam identifikasi mikroba patogen pada produk pangan. Contoh metode-metode identifikasi yang telah dikembangkan untuk meningkatkan kemampuan identifikasi bakteri patogen seperti terlihat pada Tabel 1. Beberapa teknik tersebut pada awalnya diperuntukkan bagi keperluan mikrobiologi medis/klinis, seperti PCR dan ELISA. Teknik PCR sendiri telah diterima sebagai standar internasional untuk identifikasi bakteri patogen pada produk pangan sejak beberapa tahun terakhir (ISO 22174:2005).

Tulisan ini menjelaskan secara lebih spesifik mengenai aplikasi metode isolasi dan identifikasi bakteri patogen pada produk pangan, termasuk

produk perikanan, berdasarkan metode molekuler DNA. Penjelasan lebih detail difokuskan pada teknik PCR yang merupakan inti teknik molekuler DNA. Meskipun belum banyak digunakan untuk kegiatan analisis rutin, teknik molekuler, seperti metode non-konvensional lainnya, telah banyak mendapat perhatian untuk digunakan sebagai metode alternatif dalam analisis mikroba patogen karena bersifat spesifik spesies serta memiliki beberapa keuntungan yang juga akan dijelaskan pada tulisan ini.

IDENTIFIKASI BERDASARKAN PROFIL DNA (GENOMIK)

Informasi genetik mikroorganisme pada umumnya dapat digunakan untuk keperluan identifikasi maupun pengelompokannya. Dibandingkan dengan metode biokimia dan imunokimia, identifikasi berdasarkan profil genetik dianggap lebih akurat karena tidak dipengaruhi oleh faktor internal seperti tahap pertumbuhan maupun faktor eksternal seperti lingkungan tempat tumbuh/hidup (Scheu *et al.*, 1998).

Seperti metode identifikasi genomik pada kebanyakan organisme, pada metode identifikasi mikroorganisme juga harus ditentukan fragmen DNA yang akan menjadi target identifikasi. Karena sifatnya yang unik dan spesifik, gen penghasil toksin sering dipilih sebagai gen target untuk identifikasi bakteri patogen, seperti verotoksin, enterotoksin, haemolisin, neurotoksin, dan sitotoksin. Sejumlah metode juga

Tabel 1. Beberapa metode terkini untuk isolasi dan identifikasi bakteri patogen pada makanan

No	Prinsip metode	Jenis metode
1	<i>Viable count</i> otomatis	a. <i>Plate count</i> spiral b. Grid-membran hidrofobik c. Teknik filtrasi
2	Teknik mikroskopi	a. Teknik filter epifluoresen langsung (DEFT) b. Flow sitometri c. Fluoresen antibodi
3	Aktivitas metabolisme	Asai ATP
4	Reaksi antibodi/antigen	a. Aglutinasi lateks b. Separasi imunomagnetik c. Biosensor resonansi plasma d. <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA)
5	Molekuler DNA	a. Hibridisasi DNA b. Array Oligonukleotida (chip-DNA) c. Reaksi polimerase berantai (PCR)

Sumber: Novotny *et al.* (2004); Waswa *et al.* (2007)

menggunakan gen plasmida yang berkaitan dengan virulensi maupun pengatur enzim tertentu seperti termonuklease, B-galaktosidase, B-glukuronidase, dan sistin proteinase. Adapun gen RNA ribosom (rRNA) merupakan gen target universal karena terdapat pada semua mikroorganisme serta memiliki profil filogeni yang spesifik. Pada prakteknya, beberapa penelitian juga melakukan identifikasi bakteri tidak berdasarkan gen spesifik, seperti pada *Salmonella* (Olsen *et al.*, 1991; Yasmin *et al.*, 2007). Namun demikian karena gen non-spesifik ini umumnya belum diketahui peranan, stabilitas maupun variasi genetiknya, maka identifikasi dengan gen non-spesifik tidak banyak dilakukan.

Metode identifikasi berdasarkan profil genomik berkembang pesat sejak ditemukan instrumen-instrumen biologi molekuler, khususnya instrumen PCR (*thermal cycler*). PCR yang ditemukan oleh Kary Mullis, peneliti di sebuah perusahaan bioteknologi *The Cetus Corporation-California*, pada tahun 1983, menjadikan proses penggandaan fragmen DNA target (amplifikasi) menjadi lebih cepat dan sederhana. Teknik ini sekaligus mampu menggantikan teknik-teknik molekuler sebelumnya yang banyak digunakan yaitu DNA hibridisasi.

a. Teknik Hibridisasi DNA

Pada teknik hibridisasi DNA, identifikasi dilakukan dengan bantuan penanda (*probe*) yang berupa fragmen nukleotida. Teknik ini mulai dikenal sejak tahun 1969. *Probe* dapat dibuat dengan dua cara, yaitu kloning atau amplifikasi DNA dari organisme target maupun melalui sintesis kimiawi, baik dalam bentuk DNA untai tunggal, DNA untai ganda, maupun RNA, dengan panjang bervariasi antara 15 sampai 1000 basa. Melalui inkubasi pada suhu titik lelehnya (T_m), akan terjadi hibridisasi/amplifikasi antara *probe* dengan DNA komplemen dari organisme/sampel target. Selanjutnya hibridisasi antara *probe* dengan DNA sampel target dapat dilihat visualisasinya dengan bantuan film sinar-X, mikroskop fluoresen maupun mikroskop elektron, tergantung jenis label yang digunakan (Du Sart & Choo, 1998).

Pada awalnya, label *probe* berupa isotop radioaktif seperti ^3H , ^{35}S , dan ^{32}P . Namun pada perkembangannya label radioaktif tidak banyak digunakan karena beberapa alasan. Di samping tidak cukup aman, penggunaan label radioaktif dianggap kurang efektif karena memiliki resolusi rendah, memerlukan waktu visualisasi yang lama serta radioaktif yang digunakan memiliki waktu kadaluarsa yang pendek, terutama ^{32}P dan ^{35}S (Du Sart & Choo, 1998). Saat ini label non-radioaktif yang lebih aman, cepat, dan memiliki resolusi lebih tinggi dari radioaktif banyak digunakan seperti digoksinin, fluoresin, dan

biotin (Scheu *et al.*, 1998). Salah satu produk komersial teknik hibridisasi adalah *Gene Trak*® yang diperuntukkan bagi identifikasi bakteri *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus*, *Campylobacter* spp., dan *Y. enterocolitica*® (Anon., 2010e). Waktu analisis dengan *Gene Trak*® sekitar 2 jam (setelah 40–48 jam kultivasi) dengan limit deteksi antara 1–5 CFU/25g, meskipun beberapa penelitian menyatakan sulit untuk mencapai limit ini (Olsen, 2000). Beberapa contoh *probe* DNA yang digunakan untuk identifikasi bakteri patogen seperti pada Tabel 2.

Pada prakteknya, teknik hibridisasi lebih sering digunakan untuk keperluan uji skrining mikroba dari pada untuk identifikasi mikroba patogen. Hal ini karena teknik ini memerlukan sampel dalam bentuk cair yang harus dioleskan pada permukaan lempeng. Padahal tidak semua media kultivasi dalam bentuk cair, atau bisa saja mikroba diperoleh langsung dari sampel padat tanpa melalui proses kultivasi. Sehingga pada kasus seperti ini sampel harus diencerkan dan biasanya limit deteksi mencapai lebih dari 10 CFU/25 g. Dengan teknik ini skrining sejumlah besar media kultivasi (*broth*) dapat dilakukan pada satu atau beberapa buah lempeng (Olsen *et al.*, 2000). Teknik hibridisasi DNA juga telah meletakkan landasan yang penting bagi berkembangnya teknik-teknik lain seperti *sandwich hybridization* dan chip-DNA, termasuk makro/mikro-*array* maupun chip-DNA sekuensing.

b. Array Oligonukleotida (chip-DNA)

Teknologi chip-DNA (*DNA array*) merupakan salah satu cara yang efektif untuk mempelajari fungsi genom, terutama melalui ekspresi gen. Chip-DNA bekerja berdasarkan prinsip pasangan basa nitrogen. Sebuah chip DNA merupakan lempengan, baik berupa kaca maupun silikon, yang mengandung cDNA dari berbagai organisme yang telah diketahui identitasnya. cDNA atau *probe* ini diperoleh melalui sintesis mRNA dengan enzim transkriptase. *Probe* dapat berupa potongan oligonukleotida (untai tunggal) yang dilekatkan pada chip-DNA, maupun berupa molekul DNA (untai ganda) yang integrasikan pada sebuah robot untuk membantu aplikasi sampel, terutama bila jumlahnya cukup banyak. Seperti pada teknik hibridisasi, *probe* ini selanjutnya akan mengenali susunan basa nitrogen mRNA sampel target yang telah diberi label fluoresen melalui proses amplifikasi. Sebuah chip-DNA dapat menampung hingga puluhan juta *probe*, yang memungkinkan peluang terjadinya hibridisasi menjadi besar.

Pada aplikasinya, chip-DNA berbeda dengan teknik hibridisasi karena menggunakan sampel asam nukleat berupa mRNA. mRNA yang diisolasi dari organisme target kemudian diberi label dengan

Tabel 2. Beberapa contoh *probe* DNA yang digunakan untuk identifikasi bakteri patogen pada produk pangan

No	Jenis bakteri	Gen target	Rujukan
1	<i>Campylobacter jejuni</i>	a. DNA kriptik b. 16S rRNA	Taylor & Hiratsuka (1990) Romaniuk & Trust (1989)
2	<i>Clostridium perfringens</i>	- Fosfolipase C	van Damme-Johgsten <i>et al.</i> (1990)
3	<i>Escherichia coli</i>	a. Gen LT dan ST b. Gen verotoksin c. Faktor adhesi plasmid <i>born</i> d. Faktor <i>adherent</i>	Moseley <i>et al.</i> (1980) Thomas <i>et al.</i> (1991) Nataro <i>et al.</i> (1985) Jerse <i>et al.</i> (1990)
4.	<i>Listeria monocytogenes</i>	a. Gen hemolisin b. Gen invasi	Chenevert <i>et al.</i> (1989) Bohnert <i>et al.</i> (1992)
5.	<i>Salmonella</i> spp.	a. DNA kriptik b. Protein invasi A	Olsen <i>et al.</i> (1991) Germini <i>et al.</i> (2009)
6.	<i>Staphylococcus aureus</i>	- Enterotoksin A, B, C, E	Ewald <i>et al.</i> (1990)
7.	<i>Vibrio cholerae</i>	- Toksin kolera sub unit A	Wachsmut <i>et al.</i> (1993)
8.	<i>V. vulnificus</i>	- Sitotoksin A	Wright <i>et al.</i> (1992)
9.	<i>V. parahaemolyticus</i>	- Gen hemolisin	Espineira <i>et al.</i> (2010)

fluoresen. Sampel tersebut kemudian diinkubasi bersama-sama dalam chip-DNA untuk memungkinkan terjadinya amplifikasi (hibridisasi) antara mRNA sampel target dan *probe*. Bagian sampel yang susunan basanya berbeda tidak akan terikat *probe* dan dipisahkan dengan pencucian, chip selanjutnya dipapar dengan sinar laser atau ultraviolet. *Probe* yang terikat dengan sampel mRNA ditunjukkan dengan adanya pendaran fluoresen. Selanjutnya, pendaran fluoresen dapat divisualisasikan dengan bantuan scanner fluoresen konfokal atau scanner mikroskop.

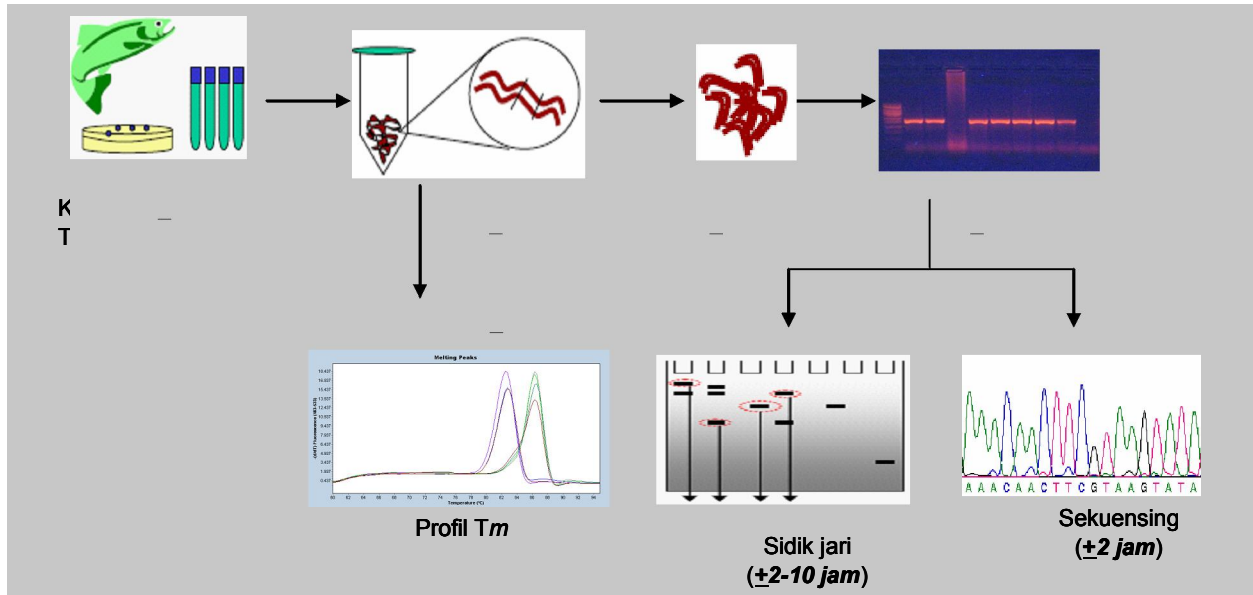
c. Reaksi Polimerase Berantai (PCR)

Teknik amplifikasi *in vitro* dianggap memiliki sensitifitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode hibridisasi *probe*. Terdapat beberapa metode amplifikasi *in vitro* yaitu amplifikasi Q-beta replikasi, reaksi ligase berantai, amplifikasi asam nukleat dan PCR. Kecuali PCR, metode amplifikasi umumnya terbatas pada kegiatan monitoring produk pangan maupun tingkat higinitasnya (Scheu *et al.*, 1998). Oleh karena itu, pembahasan akan difokuskan pada metode identifikasi dengan teknik PCR serta teknik-teknik turunannya seperti *real time* PCR, sidik jari (*finger printing*) dan sekuensing.

Teknik PCR memungkinkan identifikasi mikroorganisme secara spesifik dan cepat pada berbagai jenis sampel bahan/produk pangan. Dengan

instrumen *thermal cycler*, amplifikasi fragmen gen spesifik dilakukan dalam tiga tahapan, yaitu (1) denaturasi DNA untai ganda menjadi untai tunggal; (2) amplifikasi DNA untai tunggal dengan primer spesifik; dan (3) ekstensi primer dengan enzim polymerase. Proses ini menghasilkan fragmen DNA target secara eksponensial sesuai dengan jumlah pengulangan/*cycle* yang dilakukan. Selanjutnya fragmen DNA target hasil PCR dianalisis baik dengan sekuensing maupun dengan teknik-teknik sidik jari seperti DGGE, RFLP, RAPD, PFGE, dan lain-lain. Sementara itu *real time* PCR merupakan metode alternatif identifikasi yang lebih praktis dan efisien. Gambaran tahapan identifikasi dengan teknik PCR seperti pada Gambar 1.

Sensitifitas metode identifikasi mikroba dengan PCR tidak hanya ditentukan oleh kondisi reaksi PCR, melainkan juga oleh bentuk matriks sampel maupun metode ekstraksi DNA yang digunakan. Sebagai contoh limit deteksi kultur murni *L. monocytogenes* adalah 1–10 sel/mL, tetapi pada sampel keju limit deteksi bakteri tersebut menjadi 1–10⁶ sel/mL (Scheu *et al.*, 1998). Pada prinsipnya, isolasi DNA bakteri dapat diperoleh langsung dari sampel (ikan) tanpa melalui tahap kultivasi. Namun untuk memperoleh jumlah mikroba sesuai dengan yang diinginkan, tahap pengkayaan terhadap sampel bisa dilakukan, baik dengan menggunakan media universal maupun media



Gambar 1. Tahapan proses identifikasi mikroba dengan teknik PCR.

spesifik. Tahap pengkayaan sekaligus penting untuk mengurangi kesalahan identifikasi yang berasal dari sel-sel mikroba yang telah mati, atau yang dikenal dengan *false positive*. Kultivasi mikroba dapat dilakukan baik dengan media padat maupun media cair.

Secara umum proses isolasi DNA bakteri terdiri atas empat tahap, yaitu (1) lisis sel, (2) pemisahan DNA dari kontaminan/pengotor, (3) presipitasi DNA dari pelarut, dan (4) bila diperlukan tahap pemurnian/purifikasi dapat dilakukan untuk memperoleh kualitas DNA yang lebih baik. Pada ekstraksi DNA langsung dari sampel ikan, sekitar 10 g daging dicampur dengan larutan pepton (1:10) untuk dihomogenkan dengan *stomacher*. Selanjutnya ekstraksi DNA dilakukan terhadap sampel yang telah homogen sesuai dengan metode ekstraksi yang dipilih. Untuk sampel yang memerlukan tahap pengkayaan, sampel yang telah homogen dikultivasi pada media universal seperti TSB (*tryptose soy broth*) atau TSBYE (*tryptic soy broth yeast extract*), maupun media spesifik sesuai jenis bakteri target, misalnya *deoxycholate hydrogen sulphide lactose* agar untuk *Salmonella*, *E. coli* agar untuk *E. coli*, dan *tiosulfate-citrate-bilesucrose* agar (TCBS) untuk *Vibrio* sp. (Espineira *et al.*, 2010).

Beberapa metode dapat digunakan untuk isolasi DNA mikroba, termasuk bakteri patogen, mulai dari yang sederhana sampai dengan yang kompleks. Metode isolasi DNA yang dipilih harus mampu memisahkan kontaminan/impuritas dari DNA dengan baik. Lisis yang bertujuan untuk membuka/merusak dinding sel bakteri dapat dilakukan dengan cara mekanik (pembekuan/pelelehan atau *freeze/thaw* dan

maserasi dengan N_2 cair), kimiawi (*sodium dodecyl sulfate/SDS*, *cetyl trimethyl ammonium bromide/CTAB*, *guanidine isothiocyanate/GuSCN*, sarkosyl, NP-40, dan tritonX-100) maupun enzimatis (lisozim, mutanolisin, proteinase dan RNase) (Bartlet & Stirling, 2003; Maciel *et al.*, 2009).

Yang perlu diperhatikan dalam ekstraksi DNA adalah adanya ion-ion deterjen seperti *sodium dodecyl sulphate* (SDS), *sodium deoxycholate* (SDC), dan sarkosil serta komponen produk pangan (protein, lemak, karbohidrat, garam) pada isolat DNA yang dapat mempengaruhi sensitifitas PCR. Salah satu cara yang digunakan untuk mengatasi hal tersebut adalah dengan sentrifugasi kultur sebelum isolasi DNA guna memisahkan sel bakteri dengan medianya. Untuk pemisahan DNA dari kontaminan/pengotor dapat menggunakan campuran fenol, kloroform, dan isoamil alkohol. Sementara itu untuk presipitasi DNA biasa digunakan etanol atau isopropil alkohol. Beberapa kit komersial juga tersedia, yang memungkinkan ekstraksi DNA lebih cepat dan praktis, seperti DNAzol (Invitrogen), Plasmid Mini Kit (Bioline), Wizard SV96 System (Promega), Macherey-Nagel Nucleospin (ABgene), PrepMan® (Applied Biosystems), serta Chelex®100 dan Instagene (Biorad).

Seperti aplikasi PCR pada umumnya, keberhasilan amplifikasi PCR sangat ditentukan oleh spesifikasi primer yang digunakan. Disain primer harus dibuat sedemikian rupa untuk mengenali fragmen DNA yang menjadi target dengan mudah. Oleh karena itu primer harus spesifik, memiliki temperatur leleh (T_m) setara antara primer depan dan primer belakang dengan komposisi basa G-C tidak kurang dari basa

A–T. Beberapa contoh primer spesifik yang telah digunakan untuk identifikasi mikroba patogen pada produk pangan, termasuk perikanan adalah seperti pada Tabel 3. Beberapa jenis bakteri patogen telah berhasil diidentifikasi dengan teknik PCR pada sejumlah produk perikanan antara lain filet salmon, udang segar dan olahan, ikan sebelah, nugget patin, *scallop*, kerang, *oyster*, dan mahi-mahi (Wang *et al.*, 1997; Yasmin *et al.*, 2007)

Penggunaan primer spesifik (seperti pada Tabel 3) memberikan keuntungan yaitu identitas bakteri patogen dapat ditentukan berdasarkan hasil PCR yang divisualisasikan melalui gel elektroforesis. Munculnya sebuah pita dengan panjang fragmen sesuai fragmen DNA target mengindikasikan hasil PCR positif, dan sebaliknya apabila tidak terdapat pita berarti hasil PCR negatif. Namun demikian pada prakteknya kemungkinan munculnya pita yang tidak diinginkan dapat terjadi, seperti adanya pita tambahan, pita ganda maupun pita non-target akibat kurang spesifiknya primer yang digunakan. Oleh karena itu, untuk memastikan pita tunggal yang diperoleh benar-benar fragmen DNA target, kadang-kadang dilakukan

konfirmasi lebih lanjut, baik dengan sekuensing maupun teknik-teknik sidik jari yang relatif lebih sederhana.

c. 1. Sekuensing

Sekuensing DNA merupakan teknik paling akurat dan lengkap untuk identifikasi spesies. Sekuensing DNA merupakan modifikasi dari amplifikasi DNA pada PCR. Yang membedakan adalah penggunaan dideoksinukleotida (ddNTPs) berlabel untuk elongasi DNA. Sebelum dilakukan sekuensing, produk PCR dimurnikan untuk menghilangkan kontaminan berupa sisa pereaksi PCR maupun primer. Hasil dari proses sekuensing berupa kromatogram dari nukleotida fragmen DNA target. Analisis terhadap kromatogram sekuens dapat dilakukan dengan bantuan perangkat lunak seperti *Bionumerics*, *ChromasPro* dan *BioEdit* untuk menentukan fragmen DNA yang diinginkan. Indeks kemiripan (*similarity index*) selanjutnya dievaluasi dengan cara membandingkannya terhadap sekuens pembandingan (*library*) dari database yang tersedia secara *online* seperti melalui *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) dan

Tabel 3. Beberapa primer yang digunakan untuk identifikasi mikroba patogen pada produk perikanan

Jenis bakteri	Gen target	Nama primer	Sekuens (5'-3')	Sensitivitas (sel)	Rujukan
<i>Samonella</i> spp.	275bp; <i>invA</i>	Sal-3	TAT CGC CAC GTT CGG GCA A	40	Rahn <i>et al.</i> (1992)
		Sal-4	TCG CAC CGT CAA AGG AAC C		
<i>Shigella</i> spp.	610bp; <i>lpah</i>	Shi-1	CTT GAC CGC CTT TCC GAT AC	5x10 ⁴	Sethabutr <i>et al.</i> (1993)
		Shi-2	CAG CCA CCC TCT GAG AGT A		
<i>Escherichia coli</i>	361bp; <i>hlyA</i>	O157-3	GTA GGG AAG CGA ACA GAG	2	Wang <i>et al.</i> (1997)
		O157-4	AAG CTC CGT GTG CCT GAA		
<i>E. coli</i>	117bp; enterotoksin	LT-1	GAG ACC GGT ATT ACA GAA ATC	40	Victor <i>et al.</i> (1991)
		LT-2	GAG GTG CAT GAT GAA TCC AG		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	381bp; DNA genom	VIP-1	GAA TTC GAT AGG GTG TTA ACC	4	Lee <i>et al.</i> (1995)
		VIP-2	ATC CTT GAA CAT ACG CAG C		
<i>V. vulnificus</i>	383bp; Sitolisin	VV-1	CTC ACT GGG GCA GTG GCT	100	Brauns <i>et al.</i> (1991)
		VV-2	CCA GCC GTT AAC CGA ACC A		
<i>Yersinia enterocolitica</i>	159bp; enterotoxin	YE-1	CTG TCT TCA TTT GGA GCA TTC	4	Ibrahim <i>et al.</i> (1992)
		YE-2	GCA ACA TAC ATC GCA GCA ATC		
<i>Staphylococcus aureus</i>	276bp; nuklease	SA-1	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	20	Brakstad <i>et al.</i> (1992)
		SA-2	CAA GCC TTG ACG ACT AAA GC		
<i>Listeria monocytogenes</i>	234bp; hemolisin	LM-1	CGG AGG TTC CGC AAA AGA TG	20	Furer <i>et al.</i> (1991)
		LM-2	CCT CCA GAG TGA TCG ATG TT		
<i>Bacillus cereus</i>	185bp; hemolisin	BC-1	CTG TAG CGA ATC GTA CGT ATC	500	Wang <i>et al.</i> (1997)
		BC-2	TAC TGC TCC AGC CAC ATT AC		

EMBL (www.ebi.ac.uk) dengan teknik BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Sekuensing mampu mengidentifikasi spesies tanpa memerlukan contoh pembandingan apabila sekuens pembandingan tersedia pada basis data *online*, seperti GenBank dan EMBL. Data base sekuens dari bakteri-bakteri patogen pada produk pangan umumnya telah tersedia pada kedua data bank tersebut. Sebanyak 30 bakteri (patogen dan non patogen) pada halibut (*Hyppoglossus hypoglossus*) yang disimpan dengan teknik modifikasi atmosfer berdasarkan fragmen 16S rDNA reidentifikasi dengan indeks kemiripan antara 83–100% (Hovdaa, 2007). Fragmen 16S rDNA sering digunakan untuk keperluan identifikasi/skrining bakteri patogen karena gen ini bersifat universal serta banyak terdapat pada sel mikroorganisme.

c. 2. Teknik sidik jari (*Fingerprinting*)

Beberapa teknik sidik jari telah berkembang yang memungkinkan identifikasi organisme menjadi relatif lebih murah dan lebih cepat. Teknik-teknik *fingerprinting* yang biasa digunakan untuk identifikasi bakteri patogen antara lain *Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE/TGGE), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), dan *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD).

Teknik DGGE memanfaatkan gel poliakrilamid dengan denaturan (urea-formamid) yang konsentrasinya dibuat gradien tertentu, sesuai dengan suhu yang diinginkan, untuk memisahkan fragmen DNA target berdasarkan suhu leleh/*meltingnya*. Pada prinsipnya, fragmen DNA dengan sekuens yang berbeda akan menghasilkan profil pita yang berbeda pula, karena pasangan basa "GC" bersifat lebih stabil dan memiliki suhu leleh lebih tinggi dibandingkan dengan pasangan basa "AT". Pada teknik ini, sebanyak 15–30 basa GC (*GC clamp*) ditambahkan pada sisi 5' salah satu primer untuk mencegah fragmen DNA meleleh menjadi 2 buah oligonukleotida. Sementara itu pada teknik TGGE, fungsi denaturan digantikan oleh gradien suhu disesuaikan dengan suhu *melting* fragmen DNA target. Beberapa penelitian menyebutkan limit deteksi metode DGGE untuk bakteri pada makanan antara 10^2 - 10^5 cfu/mL (Wilson, 1997; Silvestri *et al.*, 2007). Apabila diperlukan, pita pada gel DGGE/TGGE dapat diisolasi untuk keperluan sekuensing. Teknik DGGE pernah digunakan pada identifikasi bakteri pada penyimpanan halibut (*Hyppoglossus hypoglossus*) berdasarkan fragmen 16S rDNA (Hovdaa *et al.*, 2007).

PCR-RFLP merupakan teknik sidik jari yang cukup banyak digunakan untuk identifikasi spesies. Teknik

ini mengandalkan kinerja enzim-enzim endonuklease tertentu untuk memotong fragmen DNA target pada kombinasi nukleotida tertentu/spesifik. Sebagai contoh, enzim endonuklease *EcoRI* bersifat spesifik terhadap kombinasi nukleotida "GAATTC". Enzim-enzim endonuclease yang biasa digunakan pada teknik RFLP antara lain *AluI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HindIII*, dan *SmaI*.

Pada teknik ini teknik lain sidik jari adalah *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP). DNA untai ganda ditambahkan dengan larutan denaturan formamid, bromfenol biru dan xilen sianol agar terbuka menjadi DNA untai tunggal. Kemudian masing-masing DNA untai tunggal ini dibiarkan membentuk DNA untai ganda kembali. Perbedaan bentuk DNA untai ganda yang dihasilkan mengakibatkan perbedaan mobilitas pada gel elektroforesis. Pada teknik RAPD, sebuah primer universal digunakan untuk menghasilkan fragmen-fragmen DNA yang spesifik untuk spesies yang berbeda. Shabarinath *et al.* (2006) melakukan identifikasi *Salmonella* pada produk perikanan dengan teknik RAPD pada gen *invA*. Pada umumnya limit deteksi teknik RAPD sekitar 5×10^2 CFU/PCR, bila dengan kultur murni. Namun demikian, kedua teknik ini kurang populer karena memiliki tingkat akurasi yang rendah serta memerlukan sampel pembandingan.

c. 3. PCR-multipleks

Beberapa jenis bakteri patogen dapat diidentifikasi pada saat yang bersamaan dengan menggunakan teknik PCR-multipleks, sehingga memungkinkan waktu identifikasi lebih cepat dengan biaya lebih murah. Pada teknik PCR-multipleks, amplifikasi PCR dilakukan dengan beberapa pasangan primer sesuai jumlah bakteri yang diidentifikasi. Meskipun panjang fragmen gen target antar jenis bakteri berbeda, namun suhu *annealing* primer-primer yang digunakan harus seragam. Hal ini untuk memperoleh optimalisasi amplifikasi PCR pada suhu *annealing* yang diinginkan. Reaksi positif ditandai oleh munculnya pita sesuai panjang fragmen yang diinginkan. Metode PCR-multipleks telah banyak digunakan untuk identifikasi bakteri patogen pada produk perikanan. Sebagai contoh, 13 bakteri patogen pada ikan, krustasea, dan moluska berhasil diidentifikasi dengan PCR universal (Wang *et al.*, 1997). PCR-multipleks juga berhasil digunakan untuk identifikasi *E. coli*, *L. monocytogenes*, dan *S. enteritidis* secara sekaligus pada sampel udang (Yasmin *et al.*, 2007) dan berbagai jenis produk pangan lainnya (Kawasaki *et al.*, 2009).

c. 4. Real time PCR

Real time PCR (RT-PCR) menawarkan beberapa keuntungan untuk deteksi cepat bakteri patogen. Di

samping membutuhkan waktu analisis lebih cepat, RT-PCR dianggap lebih spesifik dan sensitif dibandingkan PCR biasa. Kemungkinan kontaminasi silang dapat dihindari karena tidak memerlukan analisis pasca-PCR. Pada RT-PCR, data dan informasi fragmen DNA hasil PCR dapat diperoleh langsung (*on-line*) berdasarkan kromatogram dari fluoresen DNA hasil amplifikasi. Hal ini karena pereaksi RT-PCR dilengkapi dengan *probe* berfluoresen yang akan terikat pada setiap DNA untai ganda hasil amplifikasi. Dengan bantuan detektor *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET), *probe* tersebut akan diubah menjadi sinyal kromatografi yang intensitasnya akan berkorelasi dengan konsentrasi DNA hasil amplifikasi. Beberapa jenis *probe* RT-PCR yang tersedia antara lain *TaqMan® Probes* (Applied Biosystems), *Molecular Beacons®* (Stratagene), *Scorpions®* (DxL Ltd), dan *SYBR® Green* (Roche).

Dalam waktu 1-1,5 jam, RT-PCR mampu melakukan analisis sebanyak 96 sampel pada sebuah mikropelat. Adanya bakteri lain yang tidak menjadi target ditunjukkan oleh adanya kromatogram dengan temperatur leleh (T_m) yang berbeda dengan bakteri target. Dari sebuah penelitian pada *B. cereus*, RT-PCR mampu mengidentifikasi bakteri pada bahan pangan meski hanya 1 CFU/g, namun memerlukan kultivasi selama 4-6 jam terlebih dahulu. Sementara itu pada konsentrasi yang lebih tinggi (10^1 - 10^3 CFU/g) dapat diidentifikasi langsung tanpa melalui kultivasi terlebih dahulu (Fricker *et al.*, 2007). Penelitian lain oleh Rahn *et al.* (1992) menunjukkan limit deteksi *Salmonella* spp. dengan teknik RT-PCR pada ikan salmon adalah 2,5 CFU/25 g. Selanjutnya identifikasi *Salmonella* pada produk pangan dengan RT-PCR yang dilakukan oleh Bohaychuk *et al.* (2007) yang menggunakan gen target *invA* menunjukkan sensitivitas 97,1–100% dengan efisiensi biaya mencapai 62% dibandingkan identifikasi cara konvensional dengan kultivasi.

c. 5. Kit PCR komersial

Beberapa perusahaan telah mengembangkan kit komersial dengan teknik molekuler untuk identifikasi bakteri patogen pada produk pangan. Pada umumnya kit-kit yang berkembang dibuat untuk memudahkan pekerjaan-pekerjaan preparasi sampel maupun reagen, baik untuk bakteri patogen tunggal maupun kolektif. Satu seri kit *GeneGen* yang diproduksi oleh *SY-LAN Gerate GmbH*-Austria misalnya, terdiri atas *GeneGen Salmonella* untuk identifikasi *Salmonella* spp., dan *GeneGen Listeria* untuk genus *Listeria/L. monocytogenes*. Adapun *GeneGen MFP* bersifat universal dengan teknik multipleks-PCR untuk *Salmonella* spp, *E. coli* O157, *L. monocytogenes* dan *Campylobacter* spp. yang memiliki limit deteksi 5µL

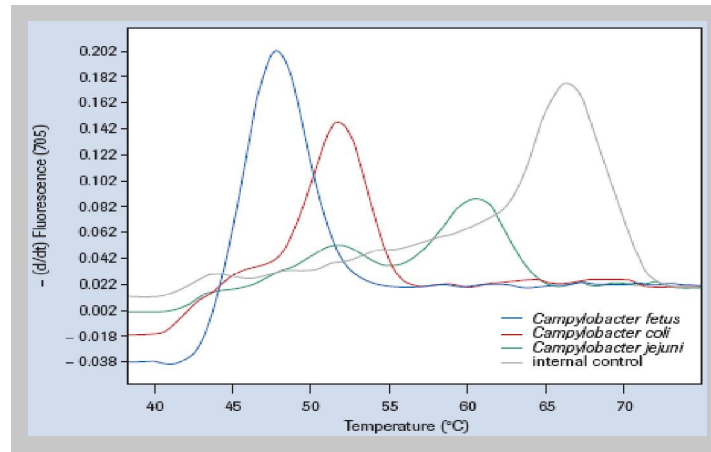
(Vollenhofer-Schrumpf & Weiß, 2007). Sementara itu *MicroSEQ(R) Salmonella* (Applied Biosystems) telah diadopsi oleh lembaga riset AOAC untuk identifikasi bakteri *Salmonella* spp.

Sebuah perusahaan dari Jerman (*BIOTECON Diagnostics GmbH*) telah mengembangkan kit untuk identifikasi bakteri patogen berdasarkan teknik RT-PCR. Kit RT-PCR yang diproduksi perusahaan ini mampu membedakan 6 spesies *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis* dan *C. upsaliensis*) dengan *LightCycler® foodproof Campylobacter Detection Kit* (Grönwald, 2005). Pada Gambar 2 terlihat profil temperatur leleh dari 4 spesies *Campylobacter*. Hal yang sama untuk membedakan 6 spesies *Listeria* dengan *LightCycler® foodproof Listeria Genus Detection Kit*. Identifikasi *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. monocytogenes*, dan *L. whelshimeri* dapat dilakukan selama tidak lebih dari 2 hari (termasuk kultivasi) dengan limit deteksi 10^2 sel/mL. Padahal dengan metode konvensional dapat memakan waktu hingga 4 hari (Dorries *et al.*, 2004). Sementara itu *Bio-Rad* juga telah mengembangkan kit berdasarkan teknik RT-PCR untuk identifikasi bakteri *Salmonella*, *E. coli* dan *Listeria monocytogenese* dengan alat yang diberi nama *IQ-Check™* dan telah divalidasi oleh AOAC maupun AFNOR.

KEUNGGULAN DAN KELEMAHAN TEKNIK MOLEKULER

Pada umumnya identifikasi bakteri dengan teknik PCR memiliki tingkat sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan teknik konvensional melalui cara kultivasi. Hal ini karena identifikasi bakteri dilakukan menggunakan target gen spesifik bakteri. Hasil penelitian Aabo *et al.* (1995) menunjukkan bahwa sensitivitas metode identifikasi dengan PCR sebesar 92%, sedangkan dengan metode konvensional hanya 50%. Bahkan pada teknik PCR-multipleks, identifikasi beberapa bakteri yang berbeda dapat dilakukan pada saat yang bersamaan, memungkinkan waktu identifikasi lebih cepat dengan biaya lebih murah. Identifikasi molekuler juga memungkinkan seleksi antara bakteri potensial *virulent* dengan *non virulent* pada spesies yang sama melalui teknik hibridisasi.

Di antara kelemahan identifikasi bakteri pada produk pangan dengan teknik PCR adalah adanya komponen pengganggu baik yang berasal dari matriks sampel, media kultivasi maupun media ekstraksi DNA. Untuk mengatasinya, pra-perlakuan dengan teknik separasi imunomagnetik (IMS) sering dilakukan untuk memisahkan bakteri dari medianya. Sementara itu kontaminan yang berasal dari sel-sel bakteri yang mati atau rusak dapat diatasi dengan cara kultivasi bakteri



Gambar 2. Contoh profil temperatur leleh (T_m) beberapa jenis *Campylobacter* dengan kit RT-PCR (Grönwald, 2005).

pada media spesifik. Identifikasi bakteri patogen dengan teknik PCR kadang-kadang masih memerlukan uji patogenitasnya. Hal ini karena reaksi positif yang dihasilkan dari PCR hanya menunjukkan adanya bakteri patogen, tanpa memberikan tingkat patogenitasnya. Untuk mengatasi kelemahan ini, kontrol internal biasanya digunakan dari bakteri yang sudah diketahui patogenitasnya. Keterbatasan biaya dan fasilitas merupakan salah satu kendala pada penerapan teknik identifikasi bakteri patogen secara molekuler. Oleh karena itu pada beberapa laboratorium, teknik molekuler baru terbatas digunakan untuk kebutuhan verifikasi metode guna melengkapi teknik identifikasi konvensional maupun biokimia (Sudian, 2008).

PENUTUP

Seiring dengan tuntutan akan hasil analisis keamanan produk pangan termasuk produk perikanan yang semakin cepat dan akurat, identifikasi mikroba patogen khususnya dengan teknik molekuler menjadi alternatif bagi laboratorium-laboratorium pengujian. Hal ini karena teknik molekuler telah diterima sebagai standar internasional seperti teknik PCR dan turunannya. Secara umum metode identifikasi molekuler memiliki efektivitas, efisiensi, dan sensitivitas lebih tinggi jika dibandingkan dengan teknik identifikasi konvensional.

Pada prakteknya, metode identifikasi molekuler berkembang mulai dari yang murah dan sederhana seperti teknik sidik jari hingga yang lebih mahal dan canggih seperti sekuensing dan *real-time* PCR. Alat pengganda DNA (*thermal cycler*) yang menjadi kunci metode ini pun kini sudah tidak lagi menjadi barang yang langka dan mahal. Banyak laboratorium lembaga riset maupun perguruan tinggi di Indonesia telah

dilengkapi PCR, termasuk RT-PCR. Hanya ketersediaan sekuenser yang masih relatif terbatas pada lembaga riset maupun perguruan tinggi tertentu. Di pasaran, kit-kit komersial juga telah tersedia yang menjadikan analisis menjadi lebih mudah, praktis, dan cepat.

Terlepas dari kelemahannya, metode identifikasi bakteri patogen dengan teknik PCR khususnya, telah menawarkan beberapa keuntungan untuk dijadikan metode identifikasi alternatif, baik pada analisis rutin maupun untuk keperluan skrining bakteri. Pemilihan jenis metode sebaiknya disesuaikan dengan kebutuhan analisis, kemampuan laboratorium serta ketersediaan finansial.

DAFTAR PUSTAKA

- Aabo, S., Andersen, J. K., and Olsen, J. E. 1995. Detection of *Salmonella* in minced meat by the polymerase chain reaction method. *Letters Appl. Microbiol.* 21: 180–182.
- Anonymous. 2008a. Some frozen salmon recalled in Canada. http://www.upi.com/Science_News/2008/09/15/Some-frozen-salmon-recalled-in-Canada.6/24/2010. Diakses pada tanggal 2 Agustus 2010.
- Anonymous. 2008b. New York: Fish brand smoked salmon is recalled. http://www.upi.com/Science_News/2008/09/30/NY-Fish-brand-smoked-salmon-is-recalled.6/24/2010. Diakses pada tanggal 2 Agustus 2010.
- Anonim. 2010a. Korban keracunan ikan di Sultra meluas. <http://www.solopos.com/2010/channel/nasional/korban-keracunan-ikan-di-Sultra-meluas>. Diakses pada tanggal 2 Agustus 2010.
- Anonim. 2010b. Korban keracunan ikan meluas. <http://www.banjarmasinpost.co.id/read/artikel/2010/8/2/5224/korban-keracunan-ikan-meluas>. Diakses pada tanggal 2 Agustus 2010.
- Anonim. 2010c. Korban keracunan ikan di Baubau bertambah. <http://www.metrotvnews.com/index.php/>

- metromain/news/2010/08/03/. Diakses pada tanggal 2 Agustus 2010.
- Anonim. 2010d. Sekeluarga keracunan ikan kembung, balita tewas. <http://www.detiknews.com/index.php/detik.read/tahun/2008/bulan/03/tg>. Diakses pada tanggal 2 Agustus 2010.
- Anonymous. 2010e. AOAC. 990.13 *Salmonella* in foods, colorimetric deoxyribonucleic acid hybridization (GENE-TRAK *Salmonella* Assay) screening method (Neogen Corp., 620 Leshler Place, Lansing, MI 48912 USA)
- Bartlett, J.M.S. and Stirling, D. 2003. *Methods in Molecular Biology, Vol.226: PCR Protocols, Second Edition*. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Bohaychuk, V., Gensler, G., McFallk, M., King, R., and Renter, D. 2007. A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matrices. *J. Food Protect.* 70: 1080–1087.
- Bohnert, M., Dilasser, F., Dalet, C., Mengaud, J., and Cossart, P. 1992. Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR. *Res. Microbiol.* 143: 271–280.
- Brakstad, O.G., Aasbakk, K., and Maeland, J.A. 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J Clin Microbiol.* 30 (7): 1654–60.
- Brauns, L.A., Hudson, M.C. and Oliver, J.D. 1991. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *Appl Environ Microbiol.* 57 (9): 2651–2655.
- Chenevert, J., Mengaud, J., Gormley, E. and Cossart, P. 1989. A DNA probe specific for *L. monocytogenes* in the genus *Listeria*. *Int. J Food Microbiol.* 8 (4): 317–319.
- Dorries, H., Kiehne, M., Kurth, B., Grönwald, C., and Berghof-Jager, K. 2004. *Listeria* genus detection in food samples using LightCycler® foodproof *Listeria* genus Detection Kit. *Biochemica.* 3: 1–2.
- Du Sart, D. and Choo, K.H.A. 1998. Polymerase chain reaction. In Rappley, R. and Walker, J.M. eds. *Molecular Biomethods Handbook*. Human Press Inc. New Jersey. p. 697–720.
- Espineira, M., Atanassova, M., Vieites, J.M., and Santaclara, F.J. 2010. Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood. *Food Microbiol.* 27: 122–131.
- Ewald, S., Heuvelman, C.J., and Notermans, S. 1990. The use of DNA probes for conforming enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* and micrococci. *Int. J. Food Microbiol.* 1: 251–257.
- Feldhusen, F. 2000. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes & Infection.*, 2: 1651–1660.
- Fricke, M., Messelhauser, U., Busch, U., Scherer, S. and Ehling-Schulz, M. 2007. Diagnostic Real-Time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (6):1892–1898.
- Furrer, B., Candrian, U., Hoefelein, C., and Luethy, J. 1991. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. *J Appl Bacteriol.* 70 (5): 372–9.
- Germini, A., Masola, A., Carnevali, P. and Marchelli, R. 2009. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. *Food Control*, 20: 733–738.
- Grönwald, C. 2005. Detection of *Campylobacter* spp. in food samples using the New LightCycler® foodproof *Campylobacter* detection kit. *Biochemica.* 4: 1–2.
- Hovdaa, M.B., Sivertsvika, M., Lunestadb, B.T., Lorentzenc, G., and Rosnesa, J.T. 2007. Characterisation of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) based on 16S rDNA-DGGE. *Food Microbiol.* 24: 362–371.
- Ibrahim, A., Liesack, W. and Stackebrandt, E. 1992. Polymerase chain reaction-gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin Microbiol.* 30 (8): 1942–1947.
- ISO 22174:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens: General requirements and definitions. International Standard Organization.
- Jerse, A. E., Martin, W. C., Galen, J. E., and Kaper, J. B. 1990. Oligonucleotide probe for detection of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor of localized adherent EPEC. *J Clin Microbiol.* 28: 2842–2844.
- Kawasaki, S., Fratamico, P.M., Horikoshi, N., Okada, Y., Takeshita, K., Sameshima, T. and Kawamoto, S. 2009. Evaluation of a multiplex PCR system for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in foods and in food subjected to freezing. *Foodborne Pathog. & Dis.* 6 (1): 82–89.
- Kim, S.H., Field, K.G., Chang, D.S., Wei, C.I. and An, H. 2001. Identification of bacteria crucial to histamine accumulation in pacific mackerel during storage. *J. Food Protect.* 64: 1556–1564.
- Lee, C.Y., Pan, S.F. and Chen, C.H. 1995. Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR. *J. Environ. Microbiol.* 61 (4):1311–1317.
- Lipp, E.K., and Rose, J.B. 1997 The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Rev. Sci. Tech.* 16: 620–640.
- Maciel, B.M., Santos, A.C.F., Dias, J.C.T., Vidal, R.O., Dias, R.J.C., Gross, E., Cascardo, J.C.M. and Rezende, R.P. 2009. Simple DNA extraction protocol for a 16S rDNA study of bacterial diversity in tropical landfarm soil used for bioremediation of oil waste. *Genet. & Molec. Res.* 8(1): 375–388.
- Moseley, S.L., Huq, I., Alim, A.R.M.A., So, M., Samadpour-Motalebi, M., and Falkow, S. 1980. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hybridization. *J. Infec Dis.* 42: 892–898.

- Nataro, J.P., Scaletsky, I.C.A., Kaper, J.B., Levine, M.M., and Trabulsi, L.R. 1985. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *E. coli*. *Infect. & Immun.* 48: 378–383.
- Novotny, L., Dvorska, L., Lorencova, A., Beran, V., and Pavlik, I. 2004. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. *Vet. Med. – Czech.* 49 (9): 343–358.
- Olsen, J.E., Aabo, S., Nielsen, E.O., and Nielsen, B.B. 1991. Isolation of a *Salmonella*-specific DNA hybridization probe. *APMIS.* 9: 114–120.
- Olsen, J.E. 2000. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. *Food Res. Int.* 33: 257–266.
- Rahn, K., De Grandis, S.A., Clarke, R.C., McEwen, S.A., Galan, J.E., Ginocchio, G., Curtiss, R. and Gyles C.L. 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes.* 6: 271–279.
- Romaniuk, P.J. and Trust, T.J. 1989. Rapid identification of *Campylobacter* species using oligonucleotide probe to 16S ribosomal RNA. *Mol. Cell. Probes.* 3:133–142.
- Scheu, P.M., Berghof, K., and Stahl, U. 1998. Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiol.* 15:13–31.
- Sethabutr, O., Venkatesan, M., Murphy, G.S., Eampokalap, B., and Hoge, C.W. 1993. Detection of *Shigellae* and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. *J. Infect Dis.* 167: 458–461.
- Shabarinath, S., Kumar, H., Khushiramani, R., Karunasagar, I., and Karunasagar, I. 2006. Detection and characterization of *Salmonella* associated with tropical seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 114: 227–233.
- Silvestri, G., Santarelli, S., Aquilanti, L., Beccaceci, A., Osimani, A., Tonucci, F., and Clementi, F. 2007. Investigation of the microbial ecology of Ciauscolo, a traditional Italian salami, by culture-dependent techniques and PCR-DGGE. *Meat Science* 77: 413–423.
- Sudian, S. 2008. Pengujian mikrobiologi pangan. *InfoPOM.* 9(2): 1–9.
- Taylor, D.E. and Hiratsuka, K. 1990. Use of non-radioactive DNA probes for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in stool specimens. *Mol & Cell Probes.* 4: 261–271.
- Thomas, A., Smith, H.R., Willshaw, G.A., and Rowe, B. 1991. Non-radioactively labelled polynucleotide and oligonucleotide DNA probes, for selectively detecting *Escherichia coli* strains producing Verotoxin cytotoxins VT1, VT2 and VT2 variant. *Mol & Cell Probes.* 5: 129–135.
- van Damme-Johgsten, M., Haagsma, J., and Notermans, S. 1990. Synthetic DNA probes for detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains isolated from outbreaks of food poisoning. *J Clin Microbiol.* 28: 131–133.
- Victor, T., du Toit, R., van Zyl, J., Bester, A.J., and van Helde, P.D. 1991. Improved method for the routine identification of toxigenic *Escherichia coli* by DNA amplification of a conserved region of the heat-labile toxin A subunit. *J Clin Microbiol.* 29 (1): 158–161.
- Vollenhofer-Schrumpf, S. and Weiß, N. 2007. Reliable detection of pathogenic microorganisms in food samples commercial kits and the Mastercycler ep gradient S. *Appl. Note.* 153: 1–5.
- Wachsmuth, I.K., Evins, G.M., Fields, P.I., Olsvik, E., Popovic, T., Bopp, C.A., Wells, J.G., Carillo, C., and Blake, P.A. 1993. The molecular epidemiology of cholera in Latin America. *J. Infect. Dis.* 167: 621–626.
- Wang, R.F., Cao, W.W., Cerniglia, C.E. 1997. A universal protocol for detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J. Appl. Microbiol.* Vol.83:727-736.
- Waswa, J., Irudayaraj, J., and Debroy, C. 2007. Direct detection of *E. coli* O157:H7 in selected food systems by a surface plasmon resonance biosensor. *LWT.* 40: 187–192.
- Wilson, I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3741–3751.
- Wright, A.C., Guo, Y., Johnson, J.A., Nataro, J.P., and Morris, J.G.J. 1992. Development and testing of a non-radioactive DNA oligonucleotide probe that is specific for *V. cholerae* cholera toxin. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2302–2306.
- Yasmin, M., Kawasaki, S. and Kawamoto, S. 2007. Evaluation of multiplex PCR system for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in shrimp samples. *Bangladesh J. Microbiol.* 24 (1): 42–46.

**INFORMASI PUBLIKASI PERPUSTAKAAN
BALAI BESAR RISET PENGOLAHAN PRODUK DAN BIOTEKNOLOGI
KELAUTAN DAN PERIKANAN**

BUKU BARU

1. Food Processing Operations Modeling: Design and Analysis. 2009. Ed by Soojin Jun; Joseph M. Irudayaraj. Boca Raton: CRC Press.
2. Plastics Packaging: Properties, Processing, Applications, and Regulations. 2004. Susan E.M Selke; John D. Cutler; Ruben Hernandez. Munich: Hansen Publications.
3. Principles of Biochemistry: third editon. 2004. Donald Voet; Judith G. Voet; Charlotte W. Pratt. Hoboken: John Wiley and Sons.
4. Microbiology: Seven edition. 2008. Jacquelyn G. Black. Virginia: John Wiley and Sons.
5. Dietary Fibre: Bio-active Carbohydrates for Food and Feed. 2004. Ed by J.W. van Der Kamp. Den Haag: Wageningen Academic Publishers.
6. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. 2004. Ed by Chung Chow Chan; Y.C Lee; Herman Lam; Xue-Ming Zhang. New Jersey: John Wiley and Sons.
7. Analisis Sensori: untuk Industri Pangan dan Agro. 2010. Dwi Setyaningsih; Anton Apriyantono; Maya Puspita Sari. Bogor: IPB Press.
8. Fisiologi Ikan: Dasar Pengembangan Teknik Perikanan. 2008. Yushinta Fujaya. Jakarta: Rineka Cipta.
9. Pengelolaan Sumberdaya Perikanan Laut. 2008. Johannes Widodo; Suadi. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
10. Usaha Ikan Konsumsi di Lahan 100 m². 2010. Cahyo Saparinto. Jakarta: Penebar Swadaya.
11. Pengolahan dan Pengawetan Ikan. 2008. Rabiatul Adawyah. Jakarta: Bumi Aksara.
12. Principles of Food Toxicology. 2008. Tonu Pussa. Boca Raton: CRC Press.
13. Process Induced Food Toxicents: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks. 2009. Ed by Richard H. Stadler; David R. Lineback. New Jersey: John Willey.
14. Molecular Cloning Vol. I: A Laboratory Cloning Sambrook and Russell. 2001. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
15. Molecular Cloning Vol. II: A Laboratory Cloning Sambrook and Russell. 2001. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
16. Molecular Cloning Vol. III: A Laboratory Cloning Sambrook and Russell. 2001. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
17. Fundamentals of Molecular Spectroscopy. 2008. Colin N. Banwell; Elaine M. McCash. Mc Graw Hill.
18. Engineering Statistics. 2004. Montgomery; Runger; Hubele. Hoboken: John Wiley and Sons.
19. Peraturan Presiden Republik Indonesia No.54 Tahun 2010 tentang Pengadaan Barang Jasa Pemerintah Jakarta: Mini Jaya Abadi.