



REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM

SERTIFIKAT PATEN SEDERHANA

Menteri Hukum atas nama Negara Republik Indonesia berdasarkan Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten, memberikan hak atas Paten Sederhana kepada:

Nama dan Alamat Pemegang Paten : UNIVERSITAS SURABAYA
JALAN NGAGEL JAYA SELATAN NO. 169
SURABAYA

Untuk Invensi dengan Judul : METODE DETEKSI *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* PADA PRODUK PERIKANAN DENGAN MULTIPLEX PCR

Inventor : apt. Tjie Kok, S.Si., M.Si., Ph.D
Kristina Natalia, S.Pi
Mariana Wahjudi, S.Si., M.Si., Ph.D

Tanggal Penerimaan : 18 Oktober 2022

Nomor Paten : IDS000010834

Tanggal Pemberian : 16 Juli 2025

Pelindungan Paten Sederhana untuk invensi tersebut diberikan untuk selama 10 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 23 Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten).

Sertifikat Paten Sederhana ini dilampiri dengan deskripsi, klaim, abstrak dan gambar (jika ada) dari invensi yang tidak terpisahkan dari sertifikat ini.



a.n MENTERI HUKUM
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL
u.b.
Direktur Paten, Desain Tata Letak Sirkuit Terpadu dan
Rahasia Dagang



Dra. Sri Lastami, S.T., M.IPL.
NIP. 196512311991032002

**KEMENTERIAN HUKUM
REPUBLIC INDONESIA
DIREKTORAT JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL
DIREKTORAT PATEN, DESAIN TATA LETAK SIRKUIT TERPADU DAN RAHASIA DAGANG**
Jln. H.R. Rasuna Said, Kav. 8-9 Kuningan Jakarta Selatan 12940
Phone/Facs. (6221) 57905611; Website: www.dgip.go.id

INFORMASI BIAYA TAHUNAN

Nomor Paten : IDS000010834 Tanggal diberi : 16 Juli 2025 Jumlah Klaim : 2
 Nomor Permohonan : S00202211528 Tanggal Penerimaan : 18 Oktober 2022

Berdasarkan Peraturan Pemerintah Nomor 28 tahun 2019 tentang Jenis dan Tarif Atas Jenis Penerimaan negara Bukan Pajak Yang Berlaku Pada Kementerian Hukum, biaya tahunan yang harus dibayarkan adalah sebagaimana dalam tabel di bawah.

Perhitungan biaya tahunan yang sudah dibayarkan adalah :

Biaya Tahunan Ke-	Periode Perlindungan	Batas Akhir Pembayaran	Tgl Pembayaran	Jumlah Pembayaran	Keterangan
1	18/10/2022-17/10/2023	15/01/2026	undefined	0	Klaim 2; Total Klaim: 0; Denda: 0
2	18/10/2023-17/10/2024	15/01/2026	undefined	0	Klaim 2; Total Klaim: 0; Denda: 0
3	18/10/2024-17/10/2025	15/01/2026	undefined	0	Klaim 2; Total Klaim: 0; Denda: 0
4	18/10/2025-17/10/2026	15/01/2026	undefined	0	Klaim 2; Total Klaim: 0; Denda: 0
5	18/10/2026-17/10/2027	19/09/2026	undefined	0	Klaim 2; Total Klaim: 0; Denda: 0

Perhitungan biaya tahunan yang belum dibayarkan adalah :

Biaya Tahunan Ke-	Periode Perlindungan	Batas Akhir Pembayaran	Biaya Dasar	Jml Klaim	Biaya Klaim	Total	Terlambat (Bulan)	Total Denda	Jumlah Pembayaran
6	18/10/2027-17/10/2028	19/09/2027	1.650.000	2	50.000	1.750.000	0	0	1.750.000
7	18/10/2028-17/10/2029	19/09/2028	2.200.000	2	50.000	2.300.000	0	0	2.300.000
8	18/10/2029-17/10/2030	19/09/2029	2.750.000	2	50.000	2.850.000	0	0	2.850.000
9	18/10/2030-17/10/2031	19/09/2030	3.300.000	2	50.000	3.400.000	0	0	3.400.000
10	18/10/2031-17/10/2032	19/09/2031	3.850.000	2	50.000	3.950.000	0	0	3.950.000

Biaya yang harus dibayarkan hingga tanggal 19-09-2027 (tahun ke-6) adalah sebesar Rp.1.750.000 7

- Pembayaran biaya tahunan untuk pertama kali wajib dilakukan paling lambat 6 (enam) bulan terhitung sejak tanggal diberi paten
- Pembayaran biaya tahunan untuk pertama kali meliputi biaya tahunan untuk tahun pertama sejak tanggal penerimaan sampai dengan tahun diberi Paten ditambah biaya tahunan satu tahun berikutnya.
- Pembayaran biaya tahunan selanjutnya dilakukan paling lambat 1 (satu) bulan sebelum tanggal yang sama dengan Tanggal Penerimaan pada periode perlindungan tahun berikutnya.
- Permohonan penundaan pembayaran biaya tahunan akan diterima apabila diajukan paling lama 7 hari kerja sebelum tanggal jatuh tempo pembayaran biaya tahunan berikutnya, dan bukan merupakan pembayaran biaya tahunan pertama kali.
- Dalam hal biaya tahunan belum dibayarkan sampai dengan jangka waktu yang ditentukan, Paten dinyatakan dihapus



(12) PATEN INDONESIA

(11) IDS000010834 B

(19) DIREKTORAT JENDERAL
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 16 Juli 2025

(51) Klasifikasi IPC⁸ : C 12Q 1/68(2022.01)

(21) No. Permohonan Paten : S00202211528

(22) Tanggal Penerimaan: 18 Oktober 2022

(30) Data Prioritas :

(43) Tanggal Pengumuman: 31 Oktober 2022

(56) Dokumen Pembanding:
Kristina Natalia, dkk. Detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes* in Tuna by Multiplex PCR. *Journal of Aquaculture and Fish Health* Vol. 11(3) - September 2022; US8298758B2. METHOD OF MULTIPLEX MICROORGANISM DETECTION. 2012-10-30; CN108841973A. DETECTION PRIMERS AND METHOD FOR *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157. 2018-11-20; Nafisa Arini, dkk. DETEKSI CEMARAN *Salmonella* sp. BERBASIS PCR PADA MAKANAN TAKJIL DI KELURAHAN AIR TAWAR, KECAMATAN PADANG UTARA, KOTA PADANG. *Prosiding Semnas Bio*. 2022;

(71) Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten :
UNIVERSITAS SURABAYA
JALAN NGAGEL JAYA SELATAN NO. 169
SURABAYA

(72) Nama Inventor :
apt. Tjie Kok, S.Si., M.Si., Ph.D, ID
Kristina Natalia, S.Pi, ID
Mariana Wahjudi, S.Si., M.Si., Ph.D, ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :

Pemeriksa Paten : RR. Tita Trias A., S.TP.

Jumlah Klaim : 2

(54) Judul Invensi : METODE DETEKSI *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* PADA PRODUK PERIKANAN DENGAN MULTIPLEX PCR

(57) Abstrak :

Produk perikanan merupakan jenis komoditas dengan tingkat pengolahan yang beragam dan termasuk bahan pangan yang sangat mudah mengalami kontaminasi mikroba patogen sehingga dapat menyebabkan keracunan serta menimbulkan wabah penyakit pada konsumen. Pada invensi ini, dilakukan deteksi beberapa bakteri patogen yang kerap terdapat dalam produk perikanan yaitu *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* secara simultan dengan *multiplex* PCR (mPCR). Gen target dan primer yang digunakan untuk mendeteksi ketiga bakteri secara simultan pada ikan tuna adalah *invA*, *hlyA*, dan *uidA*, dengan suhu *annealing* 58,1°C. Hasil invensi menunjukkan bahwa sensitivitas metode mPCR adalah ± 1250 kali jauh lebih sensitif daripada metode konvensional. Selain itu secara operasional, dari segi waktu mPCR 98,96 % jauh lebih cepat dan dari segi biaya 75,03 % jauh lebih murah dibandingkan uji konvensional. Oleh karena itu, invensi pengembangan metode mPCR ini sangat berpotensi untuk direkomendasikan menjadi metode deteksi bakteri secara simultan pada produk-produk perikanan untuk keperluan sensitivitas dan efisiensi waktu maupun biaya.

1

Deskripsi



DE DETEKSI *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* PADA PRODUK PERIKANAN DENGAN MULTIPLEX PCR
ng Teknik

Invensi ini merupakan suatu inovasi metode deteksi *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* secara simultan pada produk perikanan menggunakan multiplex PCR.

atar Belakang

Indonesia memiliki beberapa sektor yang menjadi unggulan salah satunya yaitu Sektor Kelautan dan Perikanan. Pemerintah Indonesia mesti mampu menghadapi tantangan, agar ekspor produk perikanan lancar dan/atau tidak mengalami penolakan. Berdasarkan data Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM), pandemi yang terjadi tidak menyurutkan ekspor produk perikanan Indonesia. Hal ini dapat dilihat dari nilai ekspor produk perikanan tanah air yang mencapai US\$ 5,2 miliar atau Rp 74,4 triliun (kurs Rp 14.300/US\$) pada 2020. Jumlah tersebut naik 5,3% dibandingkan tahun sebelumnya (BKIPM, 2021).

Beberapa spesies yang merupakan jenis mikroba parasit yang terdapat pada ikan dan produk perikanan antara lain jenis bakteri *Vibrio*, *Echericia coli*, *Listeria monocytogenes*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas* spp., *Shigella* spp., dan *Salmonella* spp. (Feldhusen, 2000a). Beberapa jenis bakteri mempunyai peran menjadi pemicu terbentuknya racun pada produk perikanan misalnya histamin pada ikan-ikan yang hidupnya menggerombol seperti tuna (*Thunnus* sp.), sardin (*Sardinella longiceps*), makerel (*Scomber scombrus*), dan mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) (Lipp & Rose, 1997). Jenis bakteri yang menjadi faktor munculnya histamin yang lain adalah *Proteus* spp., *Escherichia* spp., *Morganella morganii*, *Clostridium* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., dan *Vibrio harveyii* (Shaltout et al., 2016).

Meskipun terdapat peningkatan ekspor ikan Indonesia, namun masih terdapat permasalahan terkait mutu produk yang diekspor ke



USA. Berdasarkan data yang terdapat pada website RAS FDA pada tahun 2020, produk Indonesia masih mengalami kasus dimana ternotifikasi adanya *Salmonella* sebanyak 13 kasus, *Listeria* sebanyak 1 kasus dan *Salmonella* sebanyak 7 kasus sampai dengan bulan Juni 2021.

5 Salmonellosis (infeksi yang disebabkan oleh *Salmonella*) bawaan makanan tetap menjadi beban ekonomi utama di seluruh dunia untuk industri makanan. Keragaman dan kompleksitas makanan memberikan tantangan besar untuk deteksi cepat dan ultra-sensitif terhadap *Salmonella* dalam sampel makanan (Vinayaka, 2018).
10 *Listeria monocytogenes* merupakan bakteri patogen yang dapat menginfeksi manusia melalui bahan pangan sehingga menimbulkan penyakit listeriosis. Untuk *Escherichia coli* belum pernah terjadi kasus, namun pada Standard Nasional Indonesia (SNI) produk perikanan, *Escherichia coli* merupakan salah satu bakteri pathogen
15 yang harus tetap dimonitor karena dapat muncul saat kebersihan tidak diperhatikan. Oleh karena itu, perlu adanya peningkatan pengawasan serta monitoring mutu produk melalui pengujian sebagai bentuk verifikasi program sanitasi yang sudah diterapkan.

Pengujian terhadap bakteri patogen (*Salmonella* spp.,
20 *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes*) pada produk ikan yang diterapkan pada hampir semua laboratorium pemerintah adalah pengujian dengan metode konvensional SNI dimana pengujian tersebut membutuhkan waktu kurang lebih 10-12 hari untuk mendapatkan hasil. Sarana prasarana dan media yang dibutuhkan cukup banyak, sehingga
25 hal ini berpengaruh pada biaya yang lebih tinggi, khususnya untuk media bakteri *Listeria monocytogenes* sendiri yang saat ini sulit diperoleh. Selain itu kasus penolakan produk yang diekspor ke USA juga menjadi satu hal yang perlu dipertimbangkan: apakah sensitivitas pengujian yang dilakukan di Indonesia dengan metode
30 konvensional sudah cukup sensitif, setara dengan yang dilakukan oleh otoritas FDA.

Melihat masih terdapat permasalahan yang ada maka perlu dilakukan inovasi metode sehingga memberikan solusi yang lebih sensitif, lebih cepat, dan lebih murah. Pengembangan metode
35 *singleplex* PCR pada jenis-jenis bakteri tertentu sudah dilakukan



dengan hasil yang sensitif untuk masing-masing jenis bakteri; namun pada penelitian ini dilakukan inovasi metode *multiplex* PCR (mPCR) sehingga dapat mendeteksi keberadaan beberapa jenis bakteri secara simultan dengan sensitivitas yang tinggi, lebih efisien dalam hal waktu, konsumsi energi, dan biaya.

Pengujian dengan metode mPCR berpotensi memberikan sensitivitas yang jauh lebih tinggi dibandingkan metode konvensional, mengurangi waktu analisis setidaknya 48 jam dibandingkan dengan metode konvensional. Hal lain, mengacu pada penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya (Triwibowo *et al.*, 2020), mPCR menawarkan biaya pengujian per sampel yang lebih murah dibanding metode konvensional karena reagen yang lebih murah dan konsumsi energi yang lebih rendah untuk analisis. Misalnya, reagen PCR (kit ekstraksi DNA dan juga peralatan plastik habis pakai) berharga sekitar USD 7-10 per sampel sedangkan untuk metode konvensional membutuhkan USD 10-12 untuk biaya kit uji konvensional biokimia komersial dan agar selektif. Selain itu, metode konvensional memerlukan tambahan energi dan biaya tenaga kerja (untuk inkubasi 48-72 jam pada suhu 35°C). Berangkat dari latar belakang tersebut, diperlukan suatu inovasi metode mPCR yang sesuai untuk deteksi keberadaan beberapa bakteri secara simultan untuk menggantikan metode konvensional. Harapannya, inovasi metode mPCR yang dikembangkan ini nantinya juga dapat menjadi salah satu acuan kerja laboratorium untuk melakukan pemantauan produk perikanan yang akan diekspor.

Dari penelusuran yang dilakukan melalui <http://dgip.go.id> diketahui bahwa metode mPCR antara lain telah terdapat pada paten No. Permohonan P00201810224. Pada paten tersebut, metode mPCR digunakan untuk identifikasi 3 spesies bakteri penyebab difteri beserta toksigenisitasnya, meliputi: *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, dan *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Metode *multiplex realtime* PCR dalam invensi tersebut dikatakan telah teruji untuk identifikasi bakteri penyebab difteri, baik berupa sampel isolat bakteri maupun sampel spesimen klinis.



Selain itu terdapat paten No. Permohonan P00201705507 yang menggunakan empat pasang primer PCR dalam pemeriksaan PCR multipleks untuk identifikasi cepat spesies dan toksigenisitas bakteri penyebab difteri; Paten No. IDP000082331 yang menggunakan lima pasang primer PCR untuk gen WRKY4, WRKY15, WRKY23, PR1, dan PR2 yang dapat digunakan untuk mendeteksi serangan awal cendawan patogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* pada tanaman pisang. Terdapat artikel pada *Journal of Aquaculture and Fish Health* Vol 11. No. 3 September 2022 dengan judul *Detection of Salmonella spp., Escherichia coli, and Listeria monocytogenes in Tuna by Multiplex PCR* yang merupakan artikel milik pemohon. Pengungkapan ini belum terjadi 6 bulan sebelum tanggal penerimaan paten sederhana ini.

15

Uraian Singkat Invensi

Sebelum dilakukan pengujian dengan metode mPCR, dilakukan pengujian secara *singleplex* PCR terlebih dahulu dengan melakukan amplifikasi DNA masing-masing bakteri dengan rentang suhu *annealing* yang disesuaikan dengan suhu leleh (T_m) dari primer dan panjang dari primer. Pengujian dengan metode *singleplex* PCR sebelumnya menunjukkan hasil bahwa *Listeria monocytogenes* hanya dapat terdeteksi pada rentang suhu $55,0^{\circ}\text{C} - 59,9^{\circ}\text{C}$ sedangkan *Salmonella* spp. dan *Escherichia coli* dapat terdeteksi pada rentang suhu $55,0^{\circ}\text{C} - 63,0^{\circ}\text{C}$, sehingga *cross test* antar primer dapat dilakukan dengan suhu *annealing* pada rentang $55,0^{\circ}\text{C} - 59,9^{\circ}\text{C}$. *Cross test* antar primer pada invensi ini dicoba dilakukan pada suhu pertemuan paling tinggi yaitu pada $59,9^{\circ}\text{C}$, namun demikian hasil pengujian untuk kontrol positif tidak menunjukkan pembacaan pita band yang sesuai. Untuk mengatasi hal ini, dilakukan penurunan suhu *annealing* secara bertahap hingga didapat pita band yang sesuai dan tidak terdapat penempelan antar primer, yaitu $58,1^{\circ}\text{C}$. Oleh karenanya uji mPCR dilakukan pada suhu *annealing* tersebut.

Adapun tahap *pre-denaturation*, *denaturation*, *elongation*, dan *final extension* masing-masing dilakukan pada suhu 95°C , 95°C , 72°C ,

Invensi ini terbagi menjadi beberapa bagian yaitu isolasi DNA bakteri, optimasi kondisi PCR, visualisasi hasil mPCR dengan gel elektroforesis.

5 Isolasi DNA Bakteri

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi silika sesuai prosedur tetap pada laboratorium molekuler BKIPM Surabaya I. Koloni isolat bakteri diambil dan dilakukan ekstraksi untuk mendapatkan DNA murni masing-masing bakteri yang digunakan sebagai *template* pada proses amplifikasi. Perlakuan ekstraksi koloni dilakukan dengan melarutkan koloni pada 900 μ l larutan GT Buffer dimasukkan ke dalam *microtube* 1000 μ l, selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 3 menit. Setelah itu sebanyak 600 μ l supernatan sampel dipindahkan ke dalam *microtube* 1000 μ l baru. Setelah itu, ditambahkan 40 μ l silika ke dalam *microtube* 1000 μ l yang berisi supernatan kemudian di-vortex sampai sampel larut. Setelah itu, larutan tersebut di sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 detik dan terbentuk 2 bagian yaitu supernatan (bagian atas) dan pelet (bagian bawah). Semua supernatant dibuang dan pelet dicuci dengan menambahkan 500 μ l GT Buffer, lalu di-vortex kembali sampai larut. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 detik. Jika sudah terbentuk 2 bagian, bagian atas (supernatan) dibuang, pelet dicuci kembali dengan menambahkan 1 ml etanol kemurnian 70%. Kemudian di-vortex lagi sampai larut, selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 detik. Jika sudah terbentuk 2 bagian, supernatan dibuang dan dipastikan etanol terbuang sempurna, lalu ditambahkan 400 μ l DEPC ddH₂O pada pelet dan di-vortex kembali sampai larut dan dilanjutkan dengan inkubasi selama 10 menit pada suhu 55°C. Setelah diinkubasi, larutan di-vortex kembali dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 2 menit. Setelah disentrifugasi, diambil sebanyak 200 μ l larutan bagian atas (supernatan) dan dimasukkan ke dalam *microtube* baru, dan larutan siap digunakan untuk tahapan amplifikasi.



Sampel ikan tuna yang telah dikontaminasi diambil sebanyak 20 mg kemudian dilakukan pemecahan sel menggunakan *pestle* selanjutnya ditambahkan 500 μ l vortex sampai homogen dan disaring, selanjutnya filtrat yang diperoleh disentrifugasi, pelet yang diperoleh selanjutnya dilakukan ekstraksi sesuai dengan prosedur diatas. Ekstraksi dilakukan secara *single* dari masing-masing bakteri sehingga didapatkan isolat DNA bakteri *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* masing-masing. Ekstraksi yang kedua dilakukan dengan mengambil masing-masing sampel ikan tuna yang sudah terkontaminasi bakteri lalu dicampur menjadi satu, kemudian dilakukan ekstraksi dengan prosedur yang sama sehingga dalam satu *tube* diperoleh isolat DNA yang berasal dari *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes*.

15

Optimasi Kondisi PCR

Optimasi kondisi PCR sangat penting untuk menentukan keberhasilan pengujian secara *multiplex* ini, sehingga strategi optimasi primer dengan mesin primer dilakukan melalui penyesuaian *master mix*, menggunakan isolat bakteri yang bersertifikat sebagai kontrol positif, optimasi suhu *annealing* primer. Berikut merupakan komposisi campuran dalam berbagai perlakuan PCR.

Tabel 1. Komposisi Campuran dalam Berbagai Perlakuan PCR

<i>Singleplex</i> PCR	Volume (μ l)	<i>Multiplex</i> PCR	Volume (μ l)
<i>Master mix</i>	12,5	<i>Master mix</i>	12,5
<i>Primer forward</i>	1	<i>Primer forward invA</i>	1
<i>Primer reverse</i>	1	<i>Primer reverse invA</i>	1
<i>Nuclease free water</i>	8,5	<i>Primer forward uid A</i>	1
<i>Template</i>	2	<i>Primer reverse uid A</i>	1
<i>Total</i>	25	<i>Primer forward hly A</i>	1
		<i>Primer reverse hly A</i>	1
		<i>Nuclease free water</i>	4,5
			2



		Campuran DNA (kode sampel B, C, dan D)	25
		/ E	
		Total	

* Konsentrasi akhir untuk masing-masing primer adalah 10 μ M

Proses PCR dilakukan dengan cara mencari suhu optimum dari ketiga bakteri secara *singleplex* PCR terlebih dahulu. Suhu optimum didapatkan dengan menentukan rentang suhu *annealing* yang terbaca pada masing-masing gen target berdasarkan primer yang dipakai mulai dari titik suhu terendah yang terbaca sampai dengan titik suhu tertinggi dari ketiga gen bakteri.

Selanjutnya, dilakukan uji mPCR dari ketiga bakteri secara simultan pada suhu yang terbaca. Suhu optimum yang digunakan merupakan suhu tertinggi yang terbaca atau yang saling beririsan untuk ketiga gen target. Peningkatan suhu *annealing* yang digunakan sampai pada titik tertentu dapat meningkatkan efisiensi PCR untuk DNA (Lanlan, 2007). Hasil mPCR divisualisasi dengan gel elektroforesis. Proses PCR dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut (Tabel 2).

Tabel 2. Tahapan Proses PCR

Tahap	Suhu ($^{\circ}$ C)	Waktu (menit)
<i>Pre-denaturation</i>	95	3
<i>Denaturation</i>	95	0,5
<i>Annealing</i>	58	0,5
<i>Elongation</i>	72	0,5
<i>Final extention</i>	72	5

} 35 siklus

20 Visualisasi Hasil mPCR dengan Gel Elektroforesis

Sebanyak 2 gram agarose dilarutkan dalam TAE buffer yang sudah diencerkan 1x sebanyak 120 mL. Larutan dipanaskan menggunakan *microwave* dan dipastikan hingga larut sempurna selama 4 menit dengan suhu 100 $^{\circ}$ C. Setelah itu diangkat, lalu ditambahkan dengan 5 μ L *floro safe* DNA dan didiamkan beberapa saat. Kemudian dituangkan



pada cetakan dan dibiarkan hingga membeku. Gel yang telah membeku ini diletakkan pada chamber elektroforesis dan dituangi running buffer TAE 1x ke dalam chamber hingga gel terendam. Sampel DNA dan DNA ladder dituangkan pada well gel. Peralatan elektroforesis ini ditutup dan dialiri arus listrik sebesar 120 Volt selama 35 menit sampai proses elektroforesis selesai baru kemudian gel dipindahkan ke dalam UV transluminator UVP untuk mendapatkan hasil visualisasi.

Hasil visualisasi yang diperoleh ditunjukkan oleh Gambar 1 pada Lampiran Gambar. Hasil optimasi suhu *annealing* yang tertera pada Gambar 1 menunjukkan pita tebal dengan suhu tertinggi dan saling beririsan untuk hasil mPCR *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* pada suhu 58,1°C untuk ketiga target gen. Oleh karena itu, suhu *annealing* yang digunakan pada metode mPCR pada penelitian ini adalah 58,1°C.

Perhitungan Sensitivitas

Hasil yang diperoleh dari metode mPCR sangat sensitif karena kebutuhan sampel untuk mPCR jauh lebih sedikit dibandingkan dengan uji konvensional. Pada mPCR hanya dibutuhkan kurang lebih 20 mg sampel, sedangkan pada uji konvensional untuk setiap 225 mL media dibutuhkan 25 g sampel. Oleh karenanya invensi metode mPCR ini mempunyai sensitivitas ± 1250 kali jauh lebih sensitif dibandingkan dengan uji konvensional.

Perhitungan Efisiensi Waktu dan Biaya

Perhitungan efisiensi waktu dan biaya dilakukan setelah pengujian mPCR dapat menunjukkan hasil yang jauh lebih sensitif daripada metode konvensional. Berdasarkan hasil pengujian mPCR dapat digunakan untuk mendeteksi DNA bakteri *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* secara simultan, sehingga dapat dipastikan pengujian mPCR memberikan efisiensi waktu. Pada uji konvensional berdasarkan SNI, setidaknya dibutuhkan waktu 5 hari untuk uji keberadaan *Salmonella* spp., 12 hari untuk uji *Escherichia coli*, dan 5 hari untuk uji *Listeria monocytogenes*. Hal yang sama juga diungkapkan oleh Castagna et al.



(2005) Deteksi dengan PCR dapat dilakukan 5 hari lebih cepat dibandingkan dengan uji konvensional. Pada proses pengujian dengan mPCR hanya dibutuhkan waktu \pm 3 jam mulai dari tahap preparasi hingga pembacaan hasil. Persentase efisiensi waktu metode mPCR yang dikembangkan ini dibandingkan dengan uji konvensional terhadap bakteri *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* adalah $284,5 / 287,5 \times 100\% = 98,99\%$ jauh lebih cepat.

Selain lebih efisien secara waktu, metode mPCR juga menghemat teknis dan non teknis berupa pengurangan beban kerja dan dapat berdampak pada pengurangan tenaga kerja. Selain itu metode uji mPCR juga tidak membutuhkan media terlalu banyak sehingga bisa meminimalisir biaya bahan. Ulfah, 2018, melaporkan bahwa PCR dapat dilakukan dengan cepat di lapangan serta dapat mengurangi jumlah media dan tahapan isolasi sehingga mengurangi beban kerja, tenaga kerja, sumber daya, dan biaya.

Kebutuhan bahan pengujian konvensional sangat banyak, sehingga tidak heran jika biaya operasional yang dikeluarkan untuk sekali analisa jauh lebih mahal bila dibandingkan dengan metode multiplex PCR. Pada penelitian ini biaya bahan untuk pengujian *Salmonella* spp. per sampel dengan uji konvensional adalah sebesar Rp. 272.821; sedangkan untuk pengujian *Escherichia coli* per sampel sebesar Rp. 181.339; dan pengujian *Listeria monocytogenes* per sampel sebesar Rp. 245.618; sehingga total biaya pengujian bakteri dengan menggunakan uji konvensional adalah sebesar Rp. 699.778 per sampel. Harga tersebut jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan metode mPCR ini yang hanya menghabiskan sebesar Rp. 174.743 per sampel. Sehingga selisih biaya mPCR dibandingkan dengan uji konvensional terhadap bakteri *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* adalah sebesar Rp. 699.778 dikurangi Rp. 174.743 adalah sebesar Rp. 525.035 lebih murah. Efisiensi biaya mPCR ini dibandingkan dengan uji konvensional adalah $525.035/699.778 \times 100\% = 75,03\%$ jauh lebih murah. Menurut Ulfah (2018) diperkirakan deteksi dengan PCR 38 % lebih murah dibandingkan dengan metode konvensional.



(2005) Deteksi dengan PCR dapat dilakukan 5 hari lebih cepat dibandingkan dengan uji konvensional. Pada proses pengujian dengan mPCR hanya dibutuhkan waktu \pm 3 jam mulai dari tahap preparasi hingga pembacaan hasil. Persentase efisiensi waktu metode mPCR yang dikembangkan ini dibandingkan dengan uji konvensional terhadap bakteri *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* adalah $284,5 / 287,5 \times 100\% = 98,99 \%$ jauh lebih cepat.

Selain lebih efisien secara waktu, metode mPCR juga menghemat teknis dan non teknis berupa pengurangan beban kerja dan dapat berdampak pada pengurangan tenaga kerja. Selain itu metode uji mPCR juga tidak membutuhkan media terlalu banyak sehingga bisa meminimalisir biaya bahan. Ulfah, 2018, melaporkan bahwa PCR dapat dilakukan dengan cepat di lapangan serta dapat mengurangi jumlah media dan tahapan isolasi sehingga mengurangi beban kerja, tenaga kerja, sumber daya, dan biaya.

Kebutuhan bahan pengujian konvensional sangat banyak, sehingga tidak heran jika biaya operasional yang dikeluarkan untuk sekali analisa jauh lebih mahal bila dibandingkan dengan metode multiplex PCR. Pada penelitian ini biaya bahan untuk pengujian *Salmonella* spp. per sampel dengan uji konvensional adalah sebesar Rp. 272.821; sedangkan untuk pengujian *Escherichia coli* per sampel sebesar Rp. 181.339; dan pengujian *Listeria monocytogenes* per sampel sebesar Rp. 245.618; sehingga total biaya pengujian bakteri dengan menggunakan uji konvensional adalah sebesar Rp. 699.778 per sampel. Harga tersebut jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan metode mPCR ini yang hanya menghabiskan sebesar Rp. 174.743 per sampel. Sehingga selisih biaya mPCR dibandingkan dengan uji konvensional terhadap bakteri *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* adalah sebesar Rp. 699.778 dikurangi Rp. 174.743 adalah sebesar Rp. 525.035 lebih murah. Efisiensi biaya mPCR ini dibandingkan dengan uji konvensional adalah $525.035/699.778 \times 100 \%$ = 75,03 % jauh lebih murah. Menurut Ulfah (2018) diperkirakan deteksi dengan PCR 38 % lebih murah dibandingkan dengan metode konvensional.



Sekalipun metode mPCR secara waktu dan biaya per sampel uji memberikan keuntungan yang lebih, namun demikian metode mPCR juga memiliki keterbatasan yaitu investasi peralatan di awal yang cukup besar, contohnya untuk harga *thermocycle* bisa lebih dari 100 juta.

5 Selain itu kelemahan dari pengujian dengan metode mPCR adalah karena pengujian dilakukan dengan menggunakan peralatan dengan ukuran mikro maka membutuhkan tenaga ahli untuk dapat melakukan pengukuran dan analisa secara tepat. Hasil yang diperoleh dengan metode mPCR tidak bisa membedakan antara sel mati dengan sel hidup

10 karena pendeteksian dilakukan terhadap DNA. Untuk sel mati pun mPCR akan memberikan hasil positif, padahal sel bakteri yang sudah mati sudah tidak dapat berkembang biak dan tidak akan menjadi patogen terhadap manusia yang mengkonsumsi (*zoonosis*).



Klaim

1. Suatu metode deteksi untuk *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* secara simultan pada ikan tuna menggunakan *multiplex* PCR (mPCR) terdiri dari tahap sebagai berikut:
 - a. Mengisolasi DNA *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* menggunakan metode ekstraksi silika sehingga menghasilkan masing-masing isolat DNA bakteri *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes*;
 - b. Menyiapkan ikan tuna dan mengontaminasikan dengan hasil tahap a;
 - c. Melakukan mPcr dengan mencampurkan primer spesifik masing-masing bakteri yakni *invA* (*Salmonella* spp.), *uidA* (*Escherichia coli*), dan *hlyA* (*Listeria monocytogenes*) dengan masing-masing konsentrasi sebesar 10 μ M dan suhu *annealing* 58,1°C.
2. Metode deteksi untuk *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* sebagaimana pada klaim 1, dimana tingkat sensitivitas \pm 1250 kali lebih sensitif, efisiensi waktu 98,96 % lebih cepat dan efisiensi biaya 75,03 % lebih murah.



Klaim

1. Suatu metode deteksi untuk *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* secara simultan pada ikan tuna menggunakan *multiplex* PCR (mPCR) terdiri dari tahap sebagai berikut:
 - a. Mengisolasi DNA *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* menggunakan metode ekstraksi silika sehingga menghasilkan masing-masing isolat DNA bakteri *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes*;
 - b. Menyiapkan ikan tuna dan mengontaminasikan dengan hasil tahap a;
 - c. Melakukan mPcr dengan mencampurkan primer spesifik masing-masing bakteri yakni *invA* (*Salmonella* spp.), *uidA* (*Escherichia coli*), dan *hlyA* (*Listeria monocytogenes*) dengan masing-masing konsentrasi sebesar 10 μ M dan suhu *annealing* 58,1°C.
2. Metode deteksi untuk *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* sebagaimana pada klaim 1, dimana tingkat sensitivitas \pm 1250 kali lebih sensitif, efisiensi waktu 98,96 % lebih cepat dan efisiensi biaya 75,03 % lebih murah.



Klaim

1. Suatu metode deteksi untuk *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* secara simultan pada ikan tuna menggunakan multiplex PCR (mPCR) terdiri dari tahap sebagai berikut:
- a. Mengisolasi DNA *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* menggunakan metode ekstraksi silika sehingga menghasilkan masing-masing isolat DNA bakteri *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes*;
 - b. Menyiapkan ikan tuna dan mengontaminasikan dengan hasil tahap a;
 - c. Melakukan mPcr dengan mencampurkan primer spesifik masing-masing bakteri yakni *invA* (*Salmonella* spp.), *uidA* (*Escherichia coli*), dan *hlyA* (*Listeria monocytogenes*) dengan masing-masing konsentrasi sebesar 10 μ M dan suhu *annealing* 58,1°C.
2. Metode deteksi untuk *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* sebagaimana pada klaim 1, dimana tingkat sensitivitas \pm 1250 kali lebih sensitif, efisiensi waktu 98,96 % lebih cepat dan efisiensi biaya 75,03 % lebih murah.

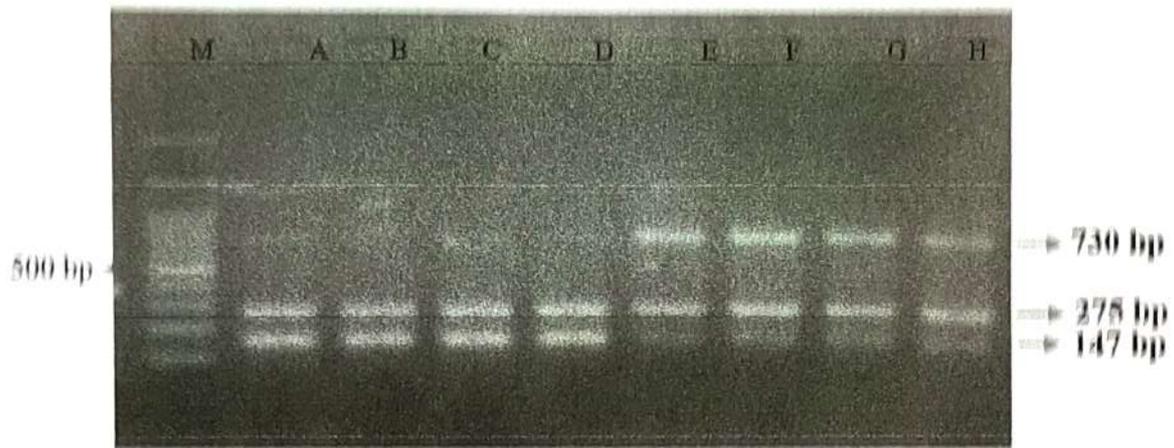
Abstrak**METODE DETEKSI *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* PADA PRODUK PERIKANAN DENGAN MULTIPLEX PCR**

5

Produk perikanan merupakan jenis komoditas dengan tingkat pengolahan yang beragam dan termasuk bahan pangan yang sangat mudah mengalami kontaminasi mikroba patogen sehingga dapat menyebabkan keracunan serta menimbulkan wabah penyakit pada konsumen. Pada 10 invensi ini, dilakukan deteksi beberapa bakteri patogen yang kerap terdapat dalam produk perikanan yaitu *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* secara simultan dengan *multiplex* PCR (mPCR). Gen target dan primer yang digunakan untuk mendeteksi ketiga bakteri secara simultan pada ikan tuna adalah *invA*, *hlyA*, 15 dan *uidA*, dengan suhu *annealing* 58,1°C. Hasil invensi menunjukkan bahwa sensitivitas metode mPCR adalah ± 1250 kali jauh lebih sensitif daripada metode konvensional. Selain itu secara operasional, dari segi waktu mPCR 98,96 % jauh lebih cepat dan dari segi biaya 75,03 % jauh lebih murah dibandingkan uji 20 konvensional. Oleh karena itu, invensi pengembangan metode mPCR ini sangat berpotensi untuk direkomendasikan menjadi metode deteksi bakteri secara simultan pada produk-produk perikanan untuk keperluan sensitivitas dan efisiensi waktu maupun biaya.



Lampiran Gambar



Gambar 1. Hasil visualisasi mPCR DNA *Salmonella* spp., *Bacillus coli*, dan *Listeria monocytogenes* pada rentang suhu 55-63°C.

Keterangan Gambar:

M : Marker ukuran 100 bp

A : Hasil mPCR suhu *annealing* 63,0°C

B : Hasil uji mPCR suhu *annealing* 62,4°C

C : Hasil uji mPCR suhu *annealing* 61,4°C

D : Hasil uji mPCR suhu *annealing* 59,9°C

E : Hasil uji mPCR suhu *annealing* 58,1°C

F : Hasil uji mPCR suhu *annealing* 56,5°C

G : Hasil uji mPCR suhu *annealing* 55,6°C

H : Hasil uji mPCR suhu *annealing* 55,0°C