



VALIDASI METODE DETEKSI *Listeria monocytogenes* PADA NUGET AYAM SECARA REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

[Validation of Detection Method for *Listeria monocytogenes* in Chicken Nuggets using Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)]

Ernawati Puji Rahayu^{1*}, Tri Hastuti¹, Annisa Firdausi¹

¹Laboratorium Mikrobiologi, Balai Besar Pengawas Obat dan Makanan di Jakarta, Badan Pengawas Obat dan Makanan, Jakarta

*Email: ernawati.rahayu@pom.go.id (Telp: +6285230050972)

Diterima tanggal 11 Juli 2025
Disetujui tanggal 2 September 2025

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a psychrotrophic bacterium and the leading cause of foodborne illness with fatal consequences. This bacterium contaminates chicken nuggets and other food products, necessitating rapid detection methods to address food safety concerns. This study aimed to validate an alternative detection method for *L. monocytogenes* by combining conventional culture and real-time PCR technology, reducing testing time to 2 days for negative results/25 g. Initial validation included determination of *L. monocytogenes* concentration and 30 non-*Listeria* bacterial strains. These bacterial isolates were used to evaluate validation parameters including limit of detection (LOD), selectivity, sensitivity, and robustness. The results showed that the alternative method had a detection limit of 0.7 colonies/25 g. Selectivity testing successfully detected *L. monocytogenes* without cross-reactivity against 30 non-*Listeria* strains. Sensitivity comparison between the alternative and standard methods showed consistent results at concentrations of 1.5 colonies/25 g and 4.6 colonies/25 g. The alternative method proved robust against variations in reaction conditions, time, and different operators. This study successfully validated an alternative method that can be implemented in laboratories. Future studies require the addition of bacterial strains for comprehensive exclusivity testing to enhance method reliability and applicability in food safety surveillance programs.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, chicken nuggets, Real-Time PCR, method validation

ABSTRAK

Listeria monocytogenes merupakan bakteri psikrotrofik penyebab utama keracunan makanan dengan dampak fatal. Bakteri ini mengontaminasi nugget ayam dan produk pangan lainnya, sehingga diperlukan metode deteksi cepat untuk mengatasi masalah keamanan pangan. Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi metode alternatif deteksi *L. monocytogenes* dengan menggabungkan kultur konvensional dan teknologi real-time PCR, memperpendek waktu pengujian menjadi 2 hari untuk hasil negatif/25 g. Validasi awal meliputi penentuan konsentrasi *L. monocytogenes* dan 30 strain bakteri non-*Listeria*. Isolat bakteri tersebut digunakan untuk pengujian parameter validasi meliputi batas deteksi (LOD), selektivitas, sensitivitas, dan ketahanan (*robustness*). Hasil penelitian menunjukkan batas deteksi metode alternatif 0,7 koloni/25 g. Uji selektivitas berhasil mendeteksi *L. monocytogenes* tanpa reaktivitas silang terhadap 30 strain non-*Listeria*. Perbandingan sensitivitas antara metode alternatif dan standar menunjukkan hasil konsisten pada konsentrasi 1,5 koloni/25 g dan 4,6 koloni/25 g. Metode alternatif terbukti robust terhadap variasi kondisi reaksi, waktu, dan operator berbeda. Penelitian ini berhasil memvalidasi metode alternatif yang dapat diimplementasikan di laboratorium. Studi mendatang memerlukan penambahan strain bakteri untuk uji eksklusivitas komprehensif guna meningkatkan reliabilitas metode dan aplikabilitas dalam program surveilans keamanan pangan.

Kata kunci: *Listeria monocytogenes*, nugget ayam, Real Time PCR, validasi metode



PENDAHULUAN

Keamanan pangan adalah kondisi dan upaya yang diperlukan untuk mencegah pangan dari kemungkinan cemaran biologis, kimia dan benda lain yang dapat mengganggu, merugikan dan membahayakan kesehatan manusia serta tidak bertentangan dengan agama, keyakinan, dan budaya masyarakat sehingga aman untuk dikonsumsi (PP 86 tahun 2019). Daging dan produk olahannya memiliki risiko terkontaminasi cemaran biologis, seperti bakteri sehingga memerlukan pengawetan dengan suhu rendah untuk memperlambat pertumbuhannya (Maulidina *et al.*, 2023). Prevalensi cemaran bakteri pada daging ayam dan olahannya di Indonesia adalah 32,8% dengan prevalensi tertinggi berasal dari daging olahan ayam, yaitu sebesar 47,8% (Sipayung *et al.*, 2023).

Salah satu jenis bakteri pencemar pada produk olahan daging ayam adalah *Listeria monocytogenes*. Kontaminasi *Listeria monocytogenes* pada nugget ayam dapat terjadi di sepanjang rantai produksi (Lianou *et al.*, 2023). *Listeria monocytogenes* bersifat psikotropik, sehingga dapat mengontaminasi nugget ayam yang disimpan dalam keadaan dingin. *Listeria monocytogenes* dilaporkan menjadi salah satu penyebab keracunan pangan yang terjadi di Afrika Selatan dan dinyatakan oleh WHO sebagai kejadian listeriosis terbesar di dunia pada awal 2017 hingga pertengahan 2018, sedangkan di Inggris menelan korban 390 orang meninggal dunia pada tahun 2006 hingga 2015 (Shangkara, 2021).

Pengawasan nugget ayam yang beredar di masyarakat melalui pengujian deteksi *Listeria monocytogenes* memerlukan metode yang cepat agar otoritas pengawasan obat dan makanan dapat merespon isu keamanan pangan dengan cepat dan tepat. Hingga kini, BPOM mendeteksi *Listeria monocytogenes* menggunakan metode standar konvensional, yaitu ISO 11290-1:2017. Metode uji ini memerlukan waktu 5 hari untuk menyimpulkan *Listeria monocytogenes* negatif/25 g makanan. Teknologi *real time* PCR membuka peluang untuk mempersingkat waktu pengujian. Prinsip pengujian *real time* PCR adalah sintesis enzimatis untuk menggandakan sekuen nukleotida tertentu secara invitro (Suratin *et al.*, 2020). Alat *real time* PCR yang difasilitasi dengan profil *fast* hanya memerlukan waktu 40 menit untuk mendeteksi spesies tertentu (Rahayu, 2022). Beberapa penelitian deteksi *Listeria monocytogenes* dengan cara PCR telah dilakukan oleh Acheamfour *et al.* (2024), Demerdash & Raslan (2019) serta Mutsyahidan *et al.* (2016), namun belum ada penelitian tentang validasi metode deteksi *Listeria monocytogenes* pada nugget ayam.

Deteksi *Listeria monocytogenes* pada nugget ayam memerlukan tahapan pengkayaan untuk memastikan bahwa bakteri yang terdeteksi adalah bakteri viabel karena persyaratan mutu nugget ayam sesuai peraturan BPOM nomor 13 tahun 2019 adalah ketiadaannya sebagai sel viabel dalam 25 g nugget ayam. Tuntutan untuk mempersingkat waktu pengujian dan peluang memanfaatkan teknologi *real time* PCR dengan memperhatikan ketentuan persyaratan mutu nugget ayam mendasari pengembangan metode deteksi yang mengombinasikan



metode kultur konvensional dan teknologi PCR. Kombinasi dua metode uji ini dapat mempersingkat waktu pengujian dari 5 hari menjadi 2 hari untuk menyimpulkan *Listeria monocytogenes* negatif/25 g sampel. Sebelum diterapkan untuk pengujian rutin di laboratorium, diperlukan validasi metode uji karena metode ini merupakan metode modifikasi dari metode baku (ISO 17025:2017). Validasi metode uji merupakan suatu proses pengujian di laboratorium untuk memberikan bukti obyektif bahwa persyaratan khusus untuk penggunaan tertentu telah terpenuhi (FDA, 2019) sehingga hasil uji valid dan dapat dipercaya.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel nugget ayam, media mikrobiologi, bakteri uji dan pereaksi. Sampel yang digunakan adalah nugget ayam (Champ). Media uji mikrobiologi yang digunakan adalah *Half Fraser Broth* (Neogen), *Fraser Broth* (Neogen), *Listeria Selective Agar Base acc Ottaviani and Agosti* (Merck), *Palcam* agar (Merck). Bakteri uji eksklusifitas, penentuan limit deteksi, sensitifitas dan *robustness* adalah *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 yang diperoleh dari Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional (PPPOMN) Badan POM. Bakteri uji inklusifitas yang digunakan sebanyak 30 strain (Tabel 1). Pereaksi yang digunakan terdiri dari pereaksi *master mix*, kit *SureFast Listeria 3plex one* Congen dan kit *Analytical Profile Index (API) Listeria*. Komposisi pereaksi *master mix* ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Bakteri Uji Inklusifitas

No	Strain	Jumlah strain diuji	Asal
1.	<i>Listeria ivanovii</i>	1	ATCC 19119
2.	<i>Listeria</i> sp	1	Isolat makanan
3.	<i>Listeria</i> sp 679	1	Isolat makanan
4.	<i>Listeria</i> sp 1016	1	Isolat makanan
5.	<i>Listeria innocua</i>	1	ATCC 33090
6.	<i>Salmonella typhimurium</i>	1	ATCC 14028
7.	<i>Salmonella enteritidis</i>	1	ATCC 1307
8.	<i>Salmonella</i>	1	FNCC 134
9.	<i>Salmonella</i> sp sv Abony	1	NCTC 6017
10.	<i>Eschericia coli</i>	1	ATCC 25922
11.	<i>Shigella sonei</i>	1	ATCC 9290
12.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	ATCC 27853
13.	<i>Cronobacter sakazakii</i>	1	ATCC 51329
14.	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	ATCC 13048
15.	<i>Bacillus cereus</i>	1	ATCC 11788
16.	<i>Bacillus subtilis</i>	1	ATCC 6633
17.	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	ATCC 25923
18.	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	ATCC 29212
19.	<i>Vibrio cholerae</i>	1	Inaba
20.	<i>Salmonella</i>	1	Isolat medis



21. <i>Bacillus cereus</i> 333	1	Isolat makanan
22. <i>Salmonella</i>	1	FNCC 50
23. <i>Salmonella</i>	1	FNCC 135
24. <i>Klebsiela</i>	1	Isolat makanan
25. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	ATCC 12228
26. <i>Salmonella enteridis</i>	1	0029
27. <i>Salmonella tranora</i>	1	NCTC 10252
28. <i>Salmonella</i>	1	IPBCC
29. <i>Kocuria rhizophila</i>	1	ATCC 9341
30. <i>P.aeruginosa</i> 797	1	Isolat makanan

Tahapan Penelitian

Validasi metode alternatif deteksi *Listeria monocytogenes* dilakukan sesuai ISO 16140-4:2020 dan ISO 22118:2011. Parameter validasi terdiri dari penentuan limit deteksi, uji selektifitas, uji sensitifitas dan *robustness*.

Metode alternatif yang divalidasi merupakan kombinasi metode kultur konvensional sesuai ISO 11290-1:2017 dan metode deteksi *real time* PCR sesuai prosedur yang dijelaskan oleh Congen (2023). Metode validasi yang dilakukan bertipe *paired study*, yaitu terdapat kesamaan porsi uji dan prosedur pada perlakuan pengkayaan awal (ISO 16140-2:2016). Perbedaan metode alternatif dan metode referensi adalah perlakuan pengujian setelah tahap inkubasi pengkayaan primer.

Uji Pendahuluan

Penghitungan jumlah bakteri target yang digunakan untuk mencemari sampel dilakukan dengan metode angka lempeng total sesuai ISO 4833-1:2013 dengan kesetaraan kekeruhan standar 1 Mac Farland. Nilai ALT 1 Mac Farland *Listeria monocytogenes* yang digunakan untuk mencemari sampel berdasarkan data hasil uji pendahuluan sebelumnya adalah $1,0 \times 10^9$ koloni/mL.

Perlakuan sampel

Bakteri yang digunakan untuk mencemari sampel dikondisikan mengalami stres lingkungan, yaitu dengan pemanasan isolat pada suhu 50°C selama 15 menit, kemudian dicemarkan pada sampel sesuai konsentrasi yang diinginkan. Sampel yang telah dicemari selanjutnya disimpan selama 2 minggu dalam *freezer* suhu -20°C sebelum dilakukan tahapan pengujian validasi metode (ISO 16140-2:2016).

Penentuan Limit Deteksi

Metode penentuan limit deteksi dilakukan sesuai ISO 16140-4:2020. Uji penentuan limit deteksi/ *limit of detection* (LOD) dilakukan dengan dua perlakuan sampel, yaitu sampel negatif dan sampel positif. Sampel negatif adalah sampel tanpa cemaran bakteri yang diuji 1 kali ulangan. Sampel positif adalah sampel yang dicemari *Listeria monocytogenes* dengan tiga tingkat konsentrasi, yaitu 0,5 koloni/25 g, 1,5 koloni/25 g dan 10 koloni/25g. Sampel positif konsentrasi 0,5 koloni/g diuji 20 ulangan sedangkan sampel positif dengan konsentrasi 1,5



koloni/25 g dan 10 koloni/25 g diuji 5 ulangan. Semua perlakuan sampel diuji secara paralel menggunakan metode deteksi dengan *real time* PCR dan metode referensi sesuai 11290-1:2017.

Uji Selektifitas

a. Inklusifitas

Uji inklusifitas dilakukan terhadap bakteri 30 strain bakteri dengan konsentrasi 10^3 koloni/mL (AOAC, 2012). Pengujian dilakukan pada isolat bakteri tanpa dicemarkan ke sampel (ISO 16140-2:2016). Uji inklusifitas *Listeria monocytogenes* dilakukan terhadap 30 strain bakteri non-*Listeria monocytogenes*

b. Eksklusifitas

Uji eksklusifitas dilakukan terhadap 50 strain bakteri target jika tersedia (ISO 22118:2011) dengan konsentrasi 10^2 koloni/mL (FDA, 2019 dan AOAC, 2012). Pengujian dilakukan pada isolat bakteri tanpa dicemarkan ke sampel (ISO 16140-2:2016). Penelitian ini hanya menggunakan satu isolat *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

Uji Sensitifitas

Uji sensitifitas metode dilakukan dengan tiga perlakuan, yaitu sampel negatif, sampel positif dan kontrol positif. Sampel negatif adalah sampel tanpa dicemari bakteri. Sampel positif adalah sampel yang dicemari *Listeria monocytogenes* dengan dua tingkat konsentrasi, yaitu 1,5 koloni/25 g dan 10 koloni/25g. Kontrol positif adalah media pengkaya primer (*half fraser broth*) yang dicemari *Listeria monocytogenes* dengan konsentrasi 10 koloni/25g. Semua perlakuan sampel dan kontrol positif dikerjakan 5 ulangan dan diuji menggunakan metode deteksi dengan *real time* PCR dan metode referensi sesuai ISO 11290-1:2017.

Uji Robustness

Pengujian *robustness* dilakukan pada sampel positif dengan konsentrasi 1,5 koloni/ 25 g. Pengujian *robustness* dilakukan dengan kombinasi perbedaan pengujian, waktu pengujian, volume *master mix* dan suhu *annealing*. Kombinasi perlakuan ditampilkan pada Tabel 2. Masing-masing perlakuan diuji oleh 2 orang berbeda pada 2 hari yang berbeda.

Tabel 2. Simulasi Pengujian *Robustness*

Faktor yang diubah Perlakuan	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Volume <i>master mix</i>	Tetap	Tetap	Tetap	+1 μ L	+1 μ L	+1 μ L	-1 μ L	-1 μ L	-1 μ L
Suhu <i>annealing</i>	Tetap	-1°C	+1°C	Tetap	-1°C	+1°C	Tetap	-1°C	+1°C

Deteksi *Listeria monocytogenes* dengan *real time* PCR

Semua kelompok perlakuan ditumbuhkan menggunakan media pengkaya primer (*half fraser broth*) dan diinkubasi selama pada 30°C selama 24-26 jam (11290-1:2017). Pengujian selanjutnya dilakukan sesuai prosedur pada user manual *SureFast Listeria 3plex one* (Congen, 2023). Biakan hasil pengkayaan primer dipipet



sebanyak 200 μL dimasukkan dalam *tube* 2 mL yang berisi 500 μL *buffer lysis*. Suspensi biakan kemudian vorteks selama 30 detik, kemudian suspensi dipanaskan dalam *waterbath* dengan suhu 95°C selama 10 menit dan dibiarkan dalam suhu ruang selama 1 menit sebelum dianalisis lebih lanjut. Apabila terdapat partikel pengganggu, suspensi disentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Suspensi DNA dapat disimpan pada suhu -20°C apabila tidak langsung digunakan.

Disiapkan pereaksi *master mix* dengan komposisi sesuai Tabel 3. Sebanyak 20 μL *master mix* dipipetkan ke dalam *well plate* PCR, selanjutnya 5 μL *template* DNA sampel dipipetkan ke dalam *well* yang telah berisi *master mix*. Analisis PCR disertai lima kontrol reaksi terdiri dari kontrol *master mix*, kontrol ekstraksi, kontrol positif (tersedia dalam kit), kontrol zero (media sebelum diinkubasi) dan kontrol media (media setelah diinkubasi). Alat PCR disetting dengan target *Listeria monocytogenes* (*reporter* Cy5, *quencher* none), *Listeria* spp (*reporter* ROX, *quencher* none) dan IAC ((*reporter* VIC/HEX, *quencher* none). Profil *run method* PCR sebagai berikut: denaturasi suhu 95°C selama 60 detik, diikuti 45 siklus pada suhu 95°C selama 15 detik dan suhu 60°C selama 30 detik.

Deteksi *Listeria monocytogenes* dengan metode referensi (ISO 11290-1:2017)

Semua kelompok perlakuan ditumbuhkan menggunakan media pengkaya primer (*half fraser broth*) dan diinkubasi selama pada 30°C selama 24-26 jam. Biakan hasil pengkayaan primer dipipet secara aseptik sebanyak 0,1 mL ke dalam 10 mL *Fraser broth* dikocok homogen dan diinkubasi pada 37°C selama 24 $\pm$ 2 jam. Satu ose biakan dari media *half fraser broth* dan *fraser broth* digoreskan pada lempeng media agar *Listeria selective agar base acc Ottaviani and Agosti* (ALOA) dan Palcam agar kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 $\pm$ 2 jam dengan posisi lempeng dibalik. Adanya pertumbuhan koloni spesifik pada lempeng diamati dengan ciri-ciri seperti Tabel 3. Koloni spesifik yang tumbuh pada media ALOA dan Palcam diinokulasikan pada media TSA untuk diuji konfirmasi dengan kit API *Listeria*.

Tabel 3. Ciri Morfologi *Listeria monocytogenes* dan *Listeria* spp pada Media Selektif

	Media Selektif	Ciri Khas Morfologi Koloni
<i>Listeria monocytogenes</i>	ALOA	Koloni <i>blue-green</i> dikelilingi halo <i>opaque</i>
	Palcam	Koloni <i>grey-green</i> dengan titik hitam di tengah dan dikelilingi halo
<i>Listeria</i> spp	ALOA	Koloni <i>blue-green</i> tanpa halo <i>opaque</i>
	Palcam	Koloni <i>grey-green</i> dengan titik hitam dan dikelilingi halo

Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini diperoleh dari hasil perbandingan nilai limit deteksi, selektifitas, sensitifitas dan robustness dengan standar persyaratan ISO 16140-2:2016 untuk limit deteksi dan sensitifitas, FDA 2019 untuk selektifitas serta ISO 22118:2011 untuk *robustness*



HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Pendahuluan

Berdasarkan hasil konfirmasi terhadap jumlah suspensi bakteri yang digunakan untuk mencemari sampel, nilai *real* 1 Mac Farland *Listeria monocytogenes* adalah $4,6 \times 10^8$ koloni/mL. Terdapat penurunan jumlah bakteri sejumlah 540 koloni/mL atau 11,4%. Hal tersebut disebabkan adanya proses stres lingkungan, yaitu pemanasan dan pembekuan yang diberikan pada bakteri sebelum digunakan sebagai pencemar serta subjektivitas penyetaraan kekeruhan bakteri. Stres lingkungan bertujuan untuk mengkondisikan bakteri pada sampel yang sebenarnya ada di lapangan (ISO 16140-2:2016).

Penurunan jumlah bakteri penelitian ini lebih besar dibandingkan penelitian Suharyono (2010) dan Mulyawanti (2008). Suharyono (2010) menyatakan bahwa pemanasan bakteri pada suhu 60°C selama 10 menit menyebabkan tingkat kematian sel sebesar 0,5%, sedangkan Mulyawanti *et al.* (2008) menyatakan bahwa kontaminasi *Listeria monocytogenes* pada dada ayam, daging, bayam, keju dan ikan turun 10 koloni setelah dibekukan selama 240-300 hari. Perbedaan jumlah bakteri berpengaruh pada konsentrasi cemaran yang ditambahkan pada sampel. Penyesuaian perhitungan konsentrasi bakteri ditampilkan pada Tabel 4

Tabel 4. Penyesuaian Konsentrasi Cemaran Bakteri

Estimasi bakteri yang dicemarkan	Jumlah sebenarnya bakteri yang dicemarkan
0,5 koloni/25 g	0,2 koloni/25 g
1,5 koloni/25 g	0,7 koloni/25g
10 koloni/25 g	4,6 koloni/25 g

Limit Deteksi

Penurunan jumlah bakteri yang digunakan untuk mencemari sampel berpengaruh terhadap nilai LOD yang dihasilkan. Hasil pengujian limit deteksi metode *real* time PCR dan metode referensi ISO 11290-1:2017 ditampilkan pada Tabel 5.

Nilai LOD metode alternatif adalah 0,7 koloni/25 g, karena dari ke lima ulangan pada sampel yang dicemari bakteri 0,7 koloni/25 g semua dapat terdeteksi oleh metode alternatif. Nilai LOD metode alternatif lebih besar dibandingkan LOD metode referensi (11290-1:2017). Nilai LOD terkecil metode referensi adalah 0,5 koloni/25g.

Nilai LOD metode referensi ISO 11290-1:2017 yang digunakan sebagai acuan adalah nilai LOD paling kecil diantara 6 nilai LOD sampel yang divalidasi oleh metode referensi karena nugget ayam tidak termasuk salah satu makanan yang divalidasi. Enam jenis makanan yang divalidasi metode referensi adalah *minced meat*, *rillettes*, *seafood*, produk susu, sayur dan sampel lingkungan. *Minced meat* adalah sampel yang paling mendekati karakteristik nugget ayam dengan nilai LOD 1 koloni/25g. Apabila laboratorium menggunakan acuan LOD *minced meat* maka nilai LOD metode alternatif lebih kecil dibandingkan nilai LOD metode referensi. Nilai LOD metode alternatif laboratorium lebih kecil dibandingkan nilai LOD baso ikan ($8,3 \times 10^2$ koloni/g), otak-otak ($2,9 \times 10^2$



koloni/g), pempek ($6,3 \times 10^3$ koloni/g) pada penelitian yang telah dilakukan oleh Mutsyahidan *et al.* (2016). Perbedaan nilai LOD ini disebabkan oleh perbedaan metode perhitungan, perhitungan LOD pada penelitian ini berdasarkan perhitungan LOD metode kultur konvensional karena metode alternatif mengombinasikan kultur konvensional dan PCR, sedangkan Mutsyahidan *et al.* 2016 menghitung LOD dari jumlah bakteri yang mampu dideteksi oleh PCR.

Nilai LOD relatif atau RLOD metode dinyatakan sebagai perbandingan nilai LOD metode alternatif dan LOD metode referensi. Sehingga nilai RLOD metode adalah 1,4. Apabila laboratorium mengambil pendekatan nilai LOD metode referensi yang diuji paralel dengan metode alternatif maka nilai LOD relatif menjadi lebih rendah, yaitu 1. Nilai keberterimaan RLOD untuk validasi *paired study* tidak boleh lebih besar dari 1,5 (ISO 16140-2:2016), dengan demikian dapat disimpulkan hasil validasi pada parameter RLOD memenuhi persyaratan.

Tabel 5. Data Hasil Penentuan Limit Deteksi

Replikasi	0,2 koloni/25 g		0,7 koloni/25 g		4,6 koloni/25 g	
	Metode alternatif (nilai Ct)	Metode referensi	Metode alternatif (nilai Ct)	Metode referensi	Metode alternatif (nilai Ct)	Metode referensi
1	0	0	1 (33,68)	1	1 (33,13)	1
2	0	0	1 (35,06)	1	1 (33,31)	1
3	1 (37,30)	1	1 (34,26)	1	1 (33,28)	1
4	0	1	1 (33,68)	1	1 (35,29)	1
5	0	0	1 (34,50)	1	1 (40,35)	1
6	0	0				
7	1 (37,76)	1				
8	0	1				
9	0	1				
10	1 (41,95)	1				
11	0	0				
12	0	0				
13	0	0				
14	0	0				
15	0	0				
16	0	1				
17	0	0				
18	1 (36,02)	1				
19	1 (42,98)	1				
20	0	0				
Jumlah	5	9	5	5	5	5

Keterangan : 0= tidak terdeteksi, 1= terdeteksi

Uji Eksklusifitas dan Inklusifitas

Nilai LOD metode alternatif menjadi dasar penentuan konsentrasi bakteri (FDA, 2019 & AOAC, 2012) yang digunakan untuk uji eksklusifitas, yaitu 70 koloni. Jumlah bakteri uji eksklusifitas idealnya 50 strain jika tersedia, sedangkan uji inklusifitas minimal dilakukan terhadap 30 strain (ISO 22118:2011). Validasi metode alternatif ini



hanya menggunakan 1 strain bakteri *Listeria monocytogenes*. Congen (2023) melaporkan validasi metode menggunakan kit yang sama dengan penelitian ini juga menggunakan satu strain *Listeria monocytogenes* untuk uji eksklusifitas. Hal tersebut disebabkan oleh keterbatasan strain *Listeria monocytogenes* dan belum pernah ditemukan adanya cemaran *Listeria monocytogenes* dalam produk makanan yang diuji di BBPOM di Jakarta.

Tabel 6. Hasil Uji Inklusifitas dan Eksklusifitas

No	Strain	Jumlah strain diu	Asal	Hasil Amplifikasi PCR (Nilai Ct)	
				<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria spp</i>
1.	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	ATCC 7644	Terdeteksi (28,60)	Terdeteksi (27,5)
2.	<i>Listeria ivanovii</i>	1	ATCC 19119	Tidak terdeteksi	Terdeteksi (33,34)
3.	<i>Listeria sp</i>	1	Isolat makanan	Tidak terdeteksi	Terdeteksi (35,23)
4.	<i>Listeria sp 679</i>	1	Isolat makanan	Tidak terdeteksi	Terdeteksi (27,70)
5.	<i>Listeria sp 1016</i>	1	Isolat makanan	Tidak terdeteksi	Terdeteksi (24,83)
6.	<i>Listeria innocua</i>	1	ATCC 33090	Tidak terdeteksi	Terdeteksi (29,41)
7.	<i>Salmonella typhimurium</i>	1	ATCC 14028	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
8.	<i>Salmonella enteritidis</i>	1	ATCC 1307	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
9.	<i>Salmonella</i>	1	FNCC 134	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
10.	<i>Salmonella sp sv Abony</i>	1	NCTC 6017	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
11.	<i>Eschericia coli</i>	1	ATCC 25922	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
12.	<i>Shigella sonnei</i>	1	ATCC 9290	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
13.	<i>Pseudomonas aeruginos</i>	1	ATCC 27853	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
14.	<i>Cronobacter sakazakii</i>	1	ATCC 51329	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
15.	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	ATCC 13048	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
16.	<i>Bacillus cereus</i>	1	ATCC 11788	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
17.	<i>Bacillus subtilis</i>	1	ATCC 6633	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
18.	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	ATCC 25923	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
19.	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	ATCC 29212	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
20.	<i>Vibrio cholerae</i>	1	Inaba	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
21.	<i>Salmonella</i>	1	Isolat medis	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
22.	<i>Bacillus cereus 333</i>	1	Isolat makanan	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
23.	<i>Salmonella</i>	1	FNCC 50	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
24.	<i>Salmonella</i>	1	FNCC 135	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
25.	<i>Klebsiela</i>	1	Isolat makanan	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
26.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	ATCC 12228	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
27.	<i>Salmonella enteridis</i>	1	0029	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
28.	<i>Salmonella tranora</i>	1	NCTC 10252	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
29.	<i>Salmonella</i>		IPBCC	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
30.	<i>Kocuria rhizophila</i>		ATCC 9341	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
31.	<i>P.aeruginosa 797</i>	1	Isolat makanan	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi

Keterangan = Terdeteksi: terjadi amplifikasi PCR, menghasilkan nilai Ct, Tidak terdeteksi: tidak terjadi amplifikasi PCR, undetermined



Hasil pengujian eksklusifitas dan inklusifitas (Tabel 6) menunjukkan hal yang sama dengan hasil validasi yang dilakukan oleh Congen (2023), yaitu uji eksklusifitas terjadi amplifikasi PCR dan uji inklusifitas tidak terjadi amplifikasi PCR. Hasil ini sesuai dengan syarat keberterimaan uji selektifitas bahwa uji eksklusifitas harus terdeteksi dan uji inklusifitas harus tidak terdeteksi (FDA, 2019).

Metode alternatif juga dapat mendeteksi keberadaan *Listeria monocytogenes* dan *Listeria* spp secara simultan sehingga dalam waktu bersamaan dapat diketahui keberadaan jenis *Listeria* yang ada pada produk. Pada pengujian dengan metode referensi, sering ditemukan koloni spesifik *Listeria monocytogenes* pada media selektif namun setelah dikonfirmasi menunjukkan *Listeria* spp.

Sensitifitas Metode

Deteksi *Listeria monocytogenes* secara *real time* PCR dan metode standar konvensional diuji sensitifitasnya secara paralel untuk mengetahui perbedaan sensitifitas ke dua metode. Hasil pengujian menunjukkan sensitifitas yang sama antara ke dua metode (Tabel 7).

Tabel 7. Hasil Pengujian Sensitifitas Metode

Replikasi	Sampel negatif (0 koloni/25 g)		Sampel positif (1,5 koloni/25 g)		4,6 koloni/25 g		Kontrol positif (4,6 koloni/25g)	
	Metode alternatif (nilai Ct)	Metode referensi	Metode alternatif (nilai Ct)	Metode referensi	Metode alternatif (nilai Ct)	Metode referensi	Metode alternatif (nilai Ct)	Metode referensi
1	0	0	1(33,68)	1	1(33,13)	1	1(32,45)	1
2	0	0	1(35,06)	1	1(33,31)	1	1 (31,53)	1
3	0	0	1(34,26)	1	1(33,28)	1	1 (32,28)	1
4	0	0	1(33,68)	1	1(35,29)	1	1 (31,79)	1
5	0	0	1(34,50)	1	1(40,35)	1	1(35,47)	1

Keterangan: 0 = tidak terdeteksi (negatif), 1= terdeteksi (positif)

Tabel 8. Data Hasil Uji Sensitifitas

PA	NA	ND	PD	FP	N	ND-PD ND+PD	AL	SE _{alt} (%)	SE _{ref} (%)	RT	FPR
15	5	0	0	0	20	0 0	3 6	100	100	100	0

Keterangan= PA: *positive agreement*, NA: *negative agreement*, ND: *negative deviation*, PD: *positive deviation*, FP: *false positive*, AL: *acceptance limit*, SE_{alt}: sensitifitas metode alternatif, SE_{ref}: sensitifitas metode referensi, RT: *relative trueness*, FPR: *false positive ratio*

Hasil pengujian sensitifitas metode alternatif ditabulasi menjadi tabel 10 untuk menentukan selisih dan jumlah deviasi negatif dan deviasi positif. Tabel 10 menunjukkan tidak adanya deviasi positif dan deviasi negatif. Selisih dan jumlah deviasi positif dan deviasi negatif (ND-PD dan ND+PD) adalah 0, memenuhi persyaratan ISO 16140-2:2016, yaitu nilai ND-PD tidak boleh lebih dari 3 dan nilai ND+PD tidak boleh lebih dari 6. Nilai *relative trueness*nya 100% dengan rasio *false* positif 0% dan selektifitas 100%. Nilai selektifitas ini juga selaras dengan



hasil amplifikasi PCR pada uji eksklusifitas dan inklusifitas. Hasil penelitian ini menunjukkan hal yang sama dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Kim, *et al* (2014). Kim *et al* (2014) membandingkan sensitifitas metode deteksi *Listeria monocytogenes* menggunakan kultur murni untuk tiga metode, yaitu kultur konvensional, PCR konvensional dan *real time* PCR.

Robustness

Parameter validasi untuk mengetahui ketahanan metode terhadap variasi kecil pada pengujian (ISO 22118:2011) diuji melalui *robustness*. Pengujian ini dilakukan dengan variasi perbedaan waktu, volume *master mix*, suhu *annealing* dan personil penguji. Hasil pengujian *robustness* ditampilkan pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil Pengujian *Robustness*

Perlakuan	Hasil amplifikasi (nilai Ct)	
	Penguji 1	Penguji 2
A	Terdeteksi (29,74)	Terdeteksi (29,21)
B	Terdeteksi (27,31)	Terdeteksi (29,32)
C	Terdeteksi (28,73)	Terdeteksi (31,20)
D	Terdeteksi (29,86)	Terdeteksi (27,83)
E	Terdeteksi (28,84)	Terdeteksi (29,82)
F	Terdeteksi (29,86)	Terdeteksi (30,00)
G	Terdeteksi (29,74)	Terdeteksi (28,78)
H	Terdeteksi (28,77)	Terdeteksi (29,82)
I	Terdeteksi (29,74)	Terdeteksi (31,45)

Variasi kecil pada reaksi yang dilakukan seperti penambahan volume *master mix*, pengurangan volume *master mix*, peningkatan suhu *annealing*, penurunan suhu *annealing*, perbedaan personil penguji dan waktu pengujian tidak berpengaruh pada hasil pengujian. Hal ini menunjukkan metode alternatif *robust*. Variasi perubahan reaksi dimaksudkan untuk mengetahui pengaruh pemipetan, suhu, waktu dan orang. Faktor-faktor tersebut berperan penting dalam menentukan keberhasilan pengujian berbasis PCR.

Berdasarkan hasil validasi metode alternatif deteksi *Listeria monocytogenes* dengan cara *real time* PCR yang dilakukan paralel dengan metode referensi ISO 11290-1:2017 menunjukkan validasi memenuhi syarat keberterimaan. Metode alternatif dapat diterapkan di laboratorium BBPOM di Jakarta.

Kelemahan metode ini adalah hanya menggunakan satu strain bakteri eksklusifitas, pengujian harus dikonfirmasi dengan metode referensi ISO 11290-1:2017 ketika hasil pengujian terdeteksi *Listeria monocytogenes* serta biaya pengujian relatif lebih mahal dibandingkan dengan metode konvensional. Faktor biaya memberikan dampak linier terhadap percepatan waktu pengujian yang bermuara pada peningkatan efektifitas dan efisiensi pengawasan obat dan makanan.



KESIMPULAN

Metode alternatif deteksi *Listeria monocytogenes* pada nuget ayam secara *real time* PCR yang dikombinasikan dengan metode kultur konvensional memenuhi kriteria keberterimaan validasi sesuai ISO 16140-2:2016 untuk limit deteksi dan sensitifitas, FDA 2019 untuk selektifitas serta ISO 22118:2011 untuk *robustness* dengan nilai LOD 0,7 koloni/25g.

DAFTAR PUSTAKA

- Acheamfour CL, Parveen S, Gutierrez A, Handy ET, Behal S, Kim D, East C, Xiong R, Haymaker JR, Micallef SA, Goldstein, RER, Kniel KE, Sapkota AR, Hashem F, Sharma M. 2024. Detection of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in alternative irrigation water by culture and qPCR-based methods in the Mid-Atlantic U.S. *Microbiology Spectrum* 12(4): 1-15. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03536-23>.
- AOAC International Methods Committee. 2012. Appendix J: Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. 1-21. AOAC International.
- Congen. 2023. User Manual SureFast *Listeria* 3plex one. 1-16. Congen Biotechnologie, Berlin
- El-Demerdash AS, Raslan MT. 2019. Molecular characterization of *Listeria Monocytogenes* isolated from different animal-origin food items from urban and rural Areas. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 7(s2): 51-56. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2019/7.s2.51.56>.
- FDA Food Program Regulatory Science Steering Committee. 2019. Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods and Feeds. 1-54. USFDA.
- ISO 17025:2017. General Requirements for The Competence of Testing and Calibration Laboratories.
- ISO 22118:2011. Microbiology of Food animal feeding stuffs - Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens - Performance characteristics.
- ISO 16140-4: 2020 Microbiology of the food chain- Method Validation. Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory.
- ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp- Part 1: Detection method.
- ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain- Horizontal method for the enumeration of microorganisms- Part 1: colony count at 30°C by the pour plate technique.
- Kim D, Chon J, Kim H, Kim H, Choi D, Kim Y. Comparison Of Culture, Conventional And Real-Time PCR Methods For *Listeria Monocytogenes* In Foods. 2014. *Korean J Food Sci Anim Resour* 34(5):665-673. DOI <http://dx.doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.5.665>.



- Lianou A, Raftopoulou O, Spyrelli E, Nychas GJE. 2021. Growth of *Listeria Monocytogenes* In Partially Cooked Battered Chicken Nuggets As A Function Of Storage Temperature. *Foods* 10(3): 1-14. <https://doi.org/10.3390/foods10030533>
- Maulidina R, Marlina ET, Utama DT. 2023. Mutu Mikrobiologi Produk Olahan Daging Yang Dijual Secara Daring Dari UMKM di Kota Bandung. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan* 4(2):83-100. DOI: 10.24198/jthp.v4i2.47313
- Mulyawanti I, Dewandari KT, Yulianingsih. 2008. Pengaruh Waktu Pembekuan Dan Penyimpanan Terhadap Karakteristik Irisan Buah Mangga Arumanis Beku. *J. Pascapanen* 5(1): 51-58
- Mutsyahidan AMA, Rahayu WP, Nurjanah S. 2016. Detection of *Listeria monocytogenes* in Indigenous Indonesian Snack Using Real Time Polymerase Chain Reaction. *Malaysian Journal Microb* 12(2): 177-181. <http://dx.doi.org/10.21161/mjm.78415>.
- Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 86 Tahun 2019 tentang Keamanan Pangan.
- Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan No. 13 Tahun 2019 tentang Batas Cemaran Mikroba dalam Pangan Olahan.
- Rahayu, EP. 2022. Evaluasi DNA untuk mendeteksi produk olahan daging yang diduga mengandung bahan yang bersumber dari babi dengan metode Taqman real time PCR [Tesis]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Depok:
- Shangkara AM. 2021. Deteksi cepat bakteri *foodborne pathogen Listeria monocytogenes* pada sampel pangan dengan metode real time PCR (Polymerase Chain Reaction) [Skripsi]. Jakarta: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta.
- Sipayung SM, Rahayu WP, Nurjanah S. 2023. Prevalensi Cemaran Bakteri Indikator Sanitasi Dan Patogen Pada Daging Ayam Dan Produk Olahannya Di Indonesia: Sistematika Review Dan Meta Analisis. *Jurnal Mutu Pangan* 10(2): 116-127. DOI: 10.29244/jmpi.2023.10.2.116
- SNI 01-6683-2014. Nugget Ayam (Chicken Nugget). Badan Standardisasi Nasional, Jakarta.
- Suharyono. 2010. Pengembangan Metode Pengkayaan Untuk Deteksi Sel *Listeria Monocytogenes* Rusak Subletal. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian* III(1):44-50.
- Suratin, Garry SR, Wardani, AK. 2020. Deteksi Cepat *Listeria monocytogenes* Pada Produk Pangan Hewani Yang Beredar Di Kota Malang Menggunakan Metode Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya Malang: