

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Keju Artisan

Keju merupakan gumpalan yang terbentuk karena adanya koagulasi protein susu oleh reaksi enzim renin atau enzim proteolitik dalam kondisi asam (Hutagalung dkk., 2017). Keju artisan merupakan keju yang dibuat secara tradisional dengan proses pembuatan yang minim mekanisasi karena diolah secara manual menggunakan tangan. Proses pembuatan keju artisan dimulai dengan penerimaan bahan baku (susu segar, garam non yodium, *rennet*, dan starter), pasteurisasi susu, pemberian starter berupa BAL (bakteri asam laktat), penambahan *rennet*, pemotongan *curd*, pemanasan *curd*, *Cheddaring*, penggaraman, pengepresan, fermentasi, dan pengemasan (Aditya dkk., 2024).

Produksi keju di Indonesia pada periode November 2023 hingga Februari 2024 didapatkan total produksi keju yang dipasarkan adalah 600 produk keju dengan 464 produk terdaftar di BPOM dan 136 produk tidak terdaftar (Lestari dkk., 2024). Permintaan keju di Indonesia meningkat setiap tahunnya dengan jumlah konsumsi keju di Indonesia mencapai 1.356 ons per kapita per tahun. Tren permintaan keju di Indonesia meningkat sebesar 12,5% per tahun (Pratiwi dkk., 2025).

Produk keju kaya akan protein, kalsium, vitamin, dan fosfor (Pal dkk., 2016). Kandungan gizi dalam 100 g keju adalah 22,8 g protein, 22,5 g lemak, 0,4 mg besi, 227 mg vitamin A, vitamin B12, 777 mg kalsium, 338 mg fosfor, dan 285 kalori energi (Wasliyah dkk., 2022). Kontaminasi mikroba pada keju

dapat terjadi ketika proses penanganan, dan faktor lingkungan (suhu ruangan dan kelembaban udara) (Pal dkk., 2016).

Proses penanganan pada produk pangan yang tidak higienis dapat menyebabkan pembentukan biofilm oleh bakteri patogen seperti *L. monocytogenes* pada permukaan alat produksi. Biofilm tersebut berfungsi sebagai pelindung bakteri sehingga meningkatkan resistensi bakteri terhadap produk sanitasi seperti desinfektan sehingga menjadi sumber kontaminasi silang (Koopmans dkk., 2022). Penggunaan bahan kemasan seperti plastik dan *wrapper* yang tidak disanitasi dengan baik dapat menjadi media transfer mikroba dari udara luar ke dalam produk. Kontaminasi dapat diperburuk oleh faktor lingkungan berupa tingkat kelembaban pabrik yang tinggi, yaitu RH 85 hingga 95%. Lingkungan yang lembab dapat mendukung stabilitas matriks biofilm dan memperpanjang viabilitas mikroba di udara dan permukaan alat (Salza dkk., 2024).

Bakteri seperti *S. aureus* dapat tumbuh selama proses produksi khususnya dalam beberapa jam awal sebelum pH susu turun terlalu rendah, yaitu pH di bawah 4 (Pal dkk., 2016). Susu merupakan sumber kontaminasi *L. monocytogenes* yang paling utama dan krusial. Kontaminasi dari pekerja dan lingkungan pabrik berperan besar dalam terjadinya kontaminasi *L. monocytogenes* dalam keju. Kontaminasi bisa berasal dari setelah proses pasteurisasi dari pekerja yang membawa bakteri atau lingkungan pabrik yang tidak higienis, seperti dari lantai, saluran air, dan *biofilm* (Koopmans dkk., 2022).

Jenis keju yang akan dijadikan sampel yang berjumlah 5 untuk penelitian.

Keju yang dijadikan sampel adalah *Cream Cheese*, *Mozzarella*, *Hallina*, *Brie*, dan *Cheddar*. Perbedaan setiap jenis keju ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Perbedaan Jenis Keju sebagai Sampel

Jenis Keju	Perbandingan Karakteristik	Sumber
<i>Cream Cheese</i>	Produk olahan susu yang memiliki tekstur lembut, rasa gurih, sedikit asam, dan konsistensi yang halus. Keju ini terbuat dari krim dengan susu atau krim dengan susu skim	Safari dkk., 2024
<i>Mozzarella</i>	Jenis keju pasta filata yang memiliki <i>curd</i> yang elastis. Pembuatan keju <i>Mozzarella</i> bisa dilakukan dengan kultur starter bakteri untuk mengasamkan susu dengan adanya rennet untuk pembentukan <i>curd</i> . Kultur starter bakteri yang digunakan adalah bakteri asam laktat.	Kumala dkk., 2024 Rohmatussolihat dkk., 2015
<i>Hallina</i>	Produk unggulan dari PT X yang merupakan keju yang dibuat tanpa proses pemeraman, sehingga masih dalam bentuk mentah atau segar	Lazarus dkk., 2019
<i>Brie</i>	Merupakan keju Prancis yang termasuk kategori keju halus dengan kandungan air berkisar dari 50% hingga 75% sehingga kelarutannya tinggi dan tidak mengandung terlalu banyak asam	Lazarus dkk., 2019
<i>Cheddar</i>	Merupakan produk hasil olahan susu dengan cita rasa tidak tajam dan tidak beraroma menyengat	Chrisnandari dkk., 2024

Keju memiliki standar dalam SNI yang harus ditaati sebelum diperjualbelikan kepada konsumen. Standar keamanan tersebut diatur pada Standar Nasional Indonesia (SNI) sebagai acuan wajib untuk menjamin produk keju memiliki mutu dan keamanan pangan yang terjamin. Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan menurut Badan Standardisasi Nasional (2009) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Pangan Menurut SNI 7388:2009

No. Ket Pangan	Kategori Pangan	Jenis Cemaran Mikroba	Batas Maksimum
01.6	Keju dan keju analog	APM <i>Escherichia coli</i>	10/g
		<i>Salmonella</i> sp.	Negatif/25g
	Keju (semua jenis)	<i>S. aureus</i>	1x10 ² koloni/g
		<i>L. monocytogenes</i>	Negatif/25g

(Sumber: Badan Standardisasi Nasional, 2009).

Penelitian yang dilakukan berfokus pada *S. aureus* dibandingkan *Salmonella* sp. dikarenakan adanya tingkat prevalensi global untuk *S. aureus* pada keju mencapai 100%. *S. aureus* juga dipilih karena risiko enterotoksin tahan panas yang bisa muncul akibat tingkat higiene pekerja yang buruk serta dari penyakit mastitis pada sapi. *S. aureus* lebih memiliki risiko mengkontaminasi rantai produksi yang diakibatkan karena adanya ketidak higienisan manusia dan penyakit dari hewan ternak secara langsung (Ndraha dkk., 2026).

B. Karakteristik *S. aureus*

S. aureus merupakan mikroba yang ada secara alami di kulit, hidung, dan membran mukosa manusia serta hewan yang sehat. Mikroorganisme ini juga merupakan patogen oportunistik yang dapat menyebabkan berbagai penyakit infeksi dengan tingkat keparahan yang beragam (Lozano dkk., 2016). Wabah keracunan yang ditemukan sering kali disebabkan karena *Staphylococcus aureus* yang terdapat di kulit manusia atau hewan (Castro dkk., 2016). Racun yang dihasilkan *S. aureus* adalah enterotoksin dengan suhu optimum pertumbuhannya adalah 40°C - 45°C, pH optimum pada 7 hingga 8, dan *water activity* 0,98

(Novitasari dan Diptaningsari, 2022).

Staphylococcus aureus dapat menyebar dari proses produksi makanan, permukaan alat yang sering tersentuh tangan, dan permukaan makanan selama proses pengolahan dan pengemasan (Chen dkk., 2019). Bakteri *S. aureus* juga bisa berasal dari susu sapi sebagai bahan utama pembuatan keju. Sumber *S. aureus* dapat berasal dari kulit sekitar ambing, tangan pemerah, kain yang digunakan untuk mengeringkan ambing, mesin pemerah dan lingkungan sekitar ambing (Hayati dkk., 2019).

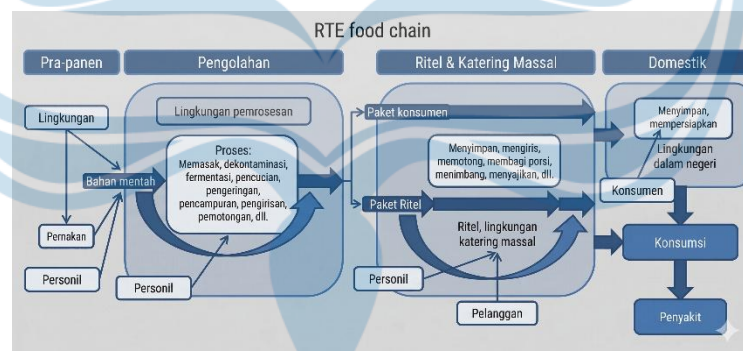
Faktor yang mendukung kelangsungan hidup *S. aureus* adalah suhu, pH, *water activity*, dan toleransi garam. Pertumbuhan *S. aureus* berada pada suhu 7°C hingga 48°C dengan suhu optimum pada 37°C dengan rentang pH 4 hingga 10 dengan pH optimum pada pH 6 hingga pH 7. Aw optimum pertumbuhan *S. aureus* adalah 0,98 dengan toleransi optimum pada garam 7% hingga 10%. *S. aureus* masuk dalam golongan bakteri Gram positif yang tidak membentuk spora bakteri sferis atau *coccus* yang termasuk dalam genus *Staphylococcus* (Novitasari dan Diptaningsari, 2022).

Inkubasi *S. aureus* dalam tubuh manusia minimal 7 jam setelah konsumsi makanan yang mengandung enterotoksin. Keracunan makanan terjadi ketika makanan tersebut mengandung *Staphylococcus* enterotoksin (SE) yang diproduksi oleh *S. aureus*. Gejala keracunan makanan yang mengandung *Staphylococcus* enterotoksin (SE) muncul setelah 1 hingga 6 jam setelah konsumsi dengan rata-rata munculnya gejala sekitar 3 jam setelah konsumsi. Gejala umum yang terjadi adalah mual, muntah, kram perut, dan diare. *S. aureus*

juga dapat menyebabkan berbagai masalah kesehatan seperti radang kulit, mastitis, infeksi saluran pernapasan, sepsis luka dan sindrom syok toksik. Wabah keracunan dengan jumlah 14 korban anak-anak dan *staff* disebabkan oleh keju ditemukan di Swiss dengan konfirmasi jika kontaminan utama adalah *S. aureus* dari susu yang digunakan (Novitasari dan Diptaningsari, 2022).

C. Karakteristik *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes merupakan bakteri patogen yang menjadi masalah dalam industri makanan, terutama jenis makanan *ready-to-eat*. Hal tersebut disebabkan karena banyak jalur yang memungkinkan adanya kontaminasi dari *L. monocytogenes* pada makanan. Tahap dari lingkungan, pengolahan, ritel, katering massal, dan domestik dapat menjadi alasan kontaminasi dari *L. monocytogenes*. *Ready to eat food chain* dapat ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Rantai Makanan *Ready to Eat* (Ricci dkk., 2017).

Gambar 1. menunjukkan bahwa *L. monocytogenes* dapat masuk dari tanah dan air, karena patogen ini dapat bertahan dalam tanah dalam waktu lama, yang berkisar antara beberapa bulan hingga lebih dari satu tahun. Lingkungan pertanian yang terkontaminasi dan menjadi sumber alami adanya kontaminasi *L. monocytogenes* pada bahan mentah. Proses pengolahan

makanan *ready to eat* dapat menjadi sumber kontaminasi *L. monocytogenes* jika *L. monocytogenes* dapat membentuk biofilm sehingga lebih tahan terhadap desinfektan. Proses pengolahan ringan seperti pencucian tidak dapat membunuh patogen tetapi proses intensif seperti pemanasan dapat mengeliminasi patogen (Ricci dkk., 2017).

L. monocytogenes dapat hidup di rentang suhu, pH, dan kadar garam yang luas sehingga sangat mudah mengkontaminasi makanan (Tjampakasari, 2021). Rentang suhu yang dimiliki *Listeria monocytogenes* adalah 0,5°C hingga 45°C dengan pH 4 hingga 9,6 (Pebrianti dkk., 2020). *L. monocytogenes* dapat hidup hingga kadar garam lebih dari 20% (Hingston dkk., 2017). Jenis makanan yang rentan menjadi media pertumbuhan bakteri ini adalah *seafood*, daging-dagingan, *dairy product* karena memiliki nutrisi lengkap dan kadar air tinggi, sayuran, makanan *ready-to-eat*, dan buah-buahan (Tjampakasari, 2021).

Konsumsi pangan yang terkontaminasi *Listeria monocytogenes* dapat menyebabkan listeriosis dengan gejala seperti demam, muntah, diare, dan dapat berkembang menjadi meningitis, bakteremia, keguguran pada ibu hamil, dan kematian bayi. Kontaminasi *L. monocytogenes* dilaporkan terjadi pada produk pangan fermentasi, seperti keju, kimchi, kefir, dan sosis (Pebrianti dkk., 2020). Kontaminasi *Listeria monocytogenes* pada keju dapat terjadi terutama karena susu tidak melalui proses pasteurisasi, sehingga terdapat kontaminasi selama proses pemerahan, transportasi, atau tempat penyimpanan susu (Campagnollo dkk., 2018).

Kontaminasi *L. monocytogenes* pada keju berasal sepenuhnya dari susu

mentah. Hal tersebut dikarenakan bakteri *L. monocytogenes* tersebar luas di lingkungan peternakan dan dapat terjadi kontaminasi susu dari sumber lingkungan seperti feses dan tanah (Campagnollo dkk., 2018). Habitat alami *L. monocytogenes* adalah tanah, tetapi *L. monocytogenes* juga dapat hidup di lingkungan pertanian, hewan, makanan, dan manusia (Bulajic dkk., 2021).

Kontaminasi *L. monocytogenes* juga dapat terjadi karena proses pemerahan, penyimpanan, atau transportasi. Berdasarkan penelitian ditemukan 6,3% sampel susu mentah di Irlandia terkontaminasi *L. monocytogenes* (Campagnollo dkk., 2018). Kontaminasi *L. monocytogenes* ditemukan pada susu segar yang diambil dari peternakan sapi perah di Makassar, Sulawesi Selatan (Prahesti dkk., 2017).

Konsentrasi *L. monocytogenes* pada masa awal simpan keju lunak yang telah didinginkan pada suhu 3,6°C hingga 10,9°C mencapai rata-rata sebesar $1,8 \pm 0,02$ log CFU/g. Peningkatan terjadi tepat sebelum keju dikonsumsi menjadi $10,9 \pm 4,4$ log CFU/g dikarenakan adanya peningkatan kemampuan adaptasi *L. monocytogenes* pada suhu dingin. Kontaminasi *L. monocytogenes* pada keju dapat menyebabkan 26 kasus listeriosis dalam populasi rentan (lansia, ibu hamil, dan individu dengan sistem imun rendah) sebanyak 10.000 orang sehingga memiliki prevalensi 0,26% (Campagnollo dkk., 2018).

D. Metode Deteksi Patogen berbasis Molekuler

Kontaminasi patogen pada bahan makanan dapat menyebabkan masalah kesehatan yang serius. Hal tersebut mengakibatkan adanya deteksi patogen pada bahan makanan untuk menghindari permasalahan kesehatan yang lebih serius.

Metode deteksi dengan cara konvensional seperti kultur bakteri dengan *streak plate* dan *total plate count* dapat memberikan hasil yang sensitif tetapi membutuhkan waktu yang cukup lama (lebih dari 1 hari). Berdasarkan Widyastuti dan Nurdyansyah (2017), menyatakan bahwa metode *Polymerase Chain Reaction* lebih sering dipilih untuk deteksi patogen karena kecepatan dan sensitivitasnya, meskipun masih banyak yang mengandalkan metode kultur konvensional seperti BPOM di Indonesia.

PCR merupakan teknologi biologi molekuler yang mengamplifikasi runtutan DNA atau RNA spesifik menjadi jutaan *copy* yang disebut *amplicon*. Metode ini memiliki kelebihan karena mendeteksi secara cepat, spesifik, dan sensitif. (Mustofa, 2024). Kekurangan metode PCR adalah terdapat tingkat kesalahan dalam pembacaan nilai ambang siklus yang disebabkan karena konsentrasi *template* yang digunakan, terdapat senyawa inhibitor, dan tidak terdapat kontrol endogen yang benar dan standar prosedur yang baku (Nugroho dkk., 2021). Kekurangan lain metode PCR dibandingkan metode konvensional seperti kultur bakteri adalah memerlukan biaya yang lebih mahal (Rizky dkk., 2021).

Metode PCR memiliki 3 tahap, yaitu denaturasi, *annealing*, dan ekstraksi. Metode PCR memerlukan cetakan DNA, primer, $MgCl_2$, dNTP, dan enzim Taq-polimerase. Primer adalah urutan nukleotida yang memiliki panjang tertentu sebagai inisiator reaksi PCR (Widyastuti dan Nurdyansyah, 2017).

PCR dimanfaatkan untuk menemukan sekuen DNA spesifik yang dimiliki oleh kontaminan pada deteksi kontaminasi bahan pangan oleh mikroorganisme.

Desain primer yang akan digunakan harus sesuai dengan sekuen DNA target sehingga produk PCR yang dihasilkan dapat menunjukkan ada tidaknya hasil amplifikasi DNA dari mikroorganisme kontaminan yang menjadi target deteksi (Widyastuti dan Nurdyansyah, 2017). Sekuen DNA target sudah diketahui, contohnya terdapat tiga ekspresi gen virulensi *L. monocytogenes* (*Iap*, *hly*, dan *prfA*) yang telah diteliti untuk menentukan target paling sesuai bagi amplifikasi DNA spesifik dengan primer khusus gen (Kumar dkk., 2015). Sekuen DNA target yang sesuai atau tidak sesuai dapat dinilai setelah melihat hasil visualisasi produk PCR dengan elektroforesis gel agarosa (Widyastuti dan Nurdyansyah, 2017).

Denaturasi merupakan tahap awal terjadinya pembukaan rantai ganda DNA menjadi rantai tunggal sebelum enzim *polimerase* bekerja. *Annealing* merupakan tahap penempelan primer pada rantai tunggal DNA dengan waktu 30 hingga 45 detik. Ekstensi merupakan tahap enzim *polymerase* bekerja dalam pemanjangan sekuens DNA dengan suhu 72°C (Khairunnisa dan Lestari, 2024).

Hasil pengujian PCR ditentukan berdasarkan panjang produk DNA. Panjang produk PCR tersebut ditentukan dengan mensejajarkan pita DNA target dengan marker yang memiliki skala penanda panjang DNA. Hasil positif didapatkan jika posisi pita DNA sesuai dengan panjang produk yang diharapkan (Khairunnisa dan Lestari, 2024).

E. Most Probable Number

Most Probable Number (MPN) merupakan metode yang menggunakan data dari hasil pertumbuhan mikroorganisme dari medium cair dalam serial

tabung sehingga menghasilkan kisaran jumlah mikroorganisme dalam jumlah perkiraan terdekat. Metode MPN menggunakan media cair dalam tabung reaksi dengan perhitungan didasarkan pada jumlah tabung positif. Kelebihan metode MPN adalah akurasi dapat mengikuti banyaknya tabung sehingga akurasi tinggi maka jumlah tabung yang digunakan harus banyak dan memiliki sensitivitas baik. Kekurangan metode MPN adalah tidak dapat digunakan untuk pengamatan morfologi suatu mikroorganisme (Agista dan Purwantisari, 2020).

F. Desain Primer

Primer yang dibutuhkan dalam PCR adalah primer yang spesifik. Hal tersebut dikarenakan primer yang tidak spesifik menyebabkan terjadinya amplifikasi di daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau tidak ada daerah genom yang teramplifikasi. Hal tersebut menjadi alasan diperlukannya desain primer pada proses PCR yang dilakukan pada situs NCBI. Hal yang perlu diperhatikan pada saat pemilihan primer adalah panjang primer untuk meminimalkan risiko penempelan primer pada genom lain dan *temperature melting* (T_m) untuk menentukan keberhasilan *annealing*. Kriteria lainnya untuk hasilkan primer yang baik adalah memiliki *self 3' complementarity* yang rendah sehingga tidak terjadi penempelan antar pasangan primer dan membentuk struktur *hairpin* (Saraswati dkk., 2019).

Dimer merupakan struktur yang terbentuk antara pasangan primer yang akan bersatu karena memiliki basis yang saling melengkapi. Penempelan primer pada DNA cetakan terjadi pada suhu *annealing* yang optimal, yang nantinya akan terjadi bersamaan dengan pembentukan dimer. Permasalahan yang kerap

kali terjadi adalah primer menempel satu sama lain, sehingga bukan menempel pada DNA cetakan (Saraswati dkk., 2019).

Primer *forward* merupakan primer dengan arah sintesis maju (5' ke 3') sedangkan *reverse* merupakan primer dengan arah sintesis terbalik (3' ke 5'). Pasangan primer yang baik dapat dilihat pada pasangan primer *forward* 5'-AACATTGAGGACCAGTCTAGCGA-3' dengan primer reverse R2: 5'-CCAGCAGATAGGTGCCTTCAC-3'. Hal tersebut dikarenakan primer memiliki panjang 18-30 bp dengan primer *forward* adalah 23 bp dan primer *reverse* adalah 21 bp. Perbedaan panjang primer antara primer *reverse* dan *forward* diperbolehkan selama berada pada panjang yang optimal, yaitu 18-30 basa. Panjang primer akan memengaruhi spesifitas, waktu *annealing*, dan *melting temperature* saat PCR berlangsung (Messe dkk., 2020).

Melting temperature yang dimiliki pasangan basa tersebut adalah sama sebesar 57,8°C, karena hasil amplifikasi terbaik biasanya diperoleh jika primer memiliki T_m sebesar 52-58°C. T_m merupakan temperatur yang mengakibatkan duplex DNA akan terpisah menjadi utas tunggal. *GC content* pasangan primer tersebut berkisar antara 45-60% dengan 47,8% pada primer *forward* dan 57,1% pada primer *reverse*. Syarat karakter primer yang baik memiliki *GC content* antara 45-60% dengan *GC content* merupakan persentase banyaknya jumlah basa nitrogen G dan C pada primer yang akan mempengaruhi *melting temperature* dan tendensi *re anneal* yang lebih cepat (Messe dkk., 2020).

Struktur sekunder primer dapat berpengaruh pada kualitas dan kuantitas produk PCR, karena dapat mengurangi kemampuan penempelan primer pada

cetakan. Hal yang harus dihindari pada desain primer adalah primer dimer dan primer *hairpin*. *Self dimer* terbentuk oleh interaksi intermolekuler antara dua molekul primer yang sama, sehingga primer homolog terhadap diri sendiri (Messe dkk., 2020).

G. Isolasi Bakteri Patogen

Isolasi bakteri merupakan teknik pengambilan bakteri dari medium atau dari lingkungan asal, yang kemudian akan ditumbuhkan di medium buatan sehingga diperoleh biakan murni (Sabbathini dkk., 2017). Teknik yang dilakukan adalah *streak plate*, yaitu metode yang menggunakan *loop ose* dan menggoreskannya ke permukaan media agar (Mikdarullah dan Nugraha, 2017). Medium buatan merupakan medium yang dibuat sama seperti lingkungan hidup mikroorganisme dengan komposisi nutrisi yang dibutuhkan mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembang biak (Atmanto dkk., 2022).

Isolasi bakteri bertujuan untuk mendapatkan biakan yang murni. Prinsip isolasi bakteri adalah pemisahan satu jenis bakteri dari bakteri lain (Sabbathini dkk., 2017). Media selektif digunakan untuk memastikan bahwa organisme yang tumbuh hanya organisme yang diinginkan, hal tersebut dikarenakan media selektif memungkinkan beberapa jenis organisme untuk tumbuh dan menghambat organisme yang tidak ditarget (Atmanto dkk., 2022). Hal tersebut dapat dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media padat, sehingga sel mikroba dapat membentuk koloni sel (Sabbathini dkk., 2017).

H. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA merupakan metode pemurnian DNA dengan metode fisik atau kimia dengan tujuan untuk memisahkan DNA dari membran sel, protein, dan komponen seluler lainnya. Metode ekstraksi DNA dengan fisik seperti pemanasan dan iradiasi *microwave*. Metode ekstraksi DNA dengan kimiawi seperti penggunaan NaOH dan kit komersial (Prayogo dan Chakim, 2025).

Isolat DNA yang dihasilkan akan di amplifikasi menggunakan PCR sehingga isolat yang diekstrak diharapkan mengandung konsentrasi dan kemurnian yang tinggi. Metode ekstraksi DNA dapat dilakukan dengan NaOH dan kit komersial (Ghina dkk., 2018). Metode ekstraksi DNA menggunakan *kit komersial* menggunakan merek Geneaid *Genomic DNA* (Rahmadara dkk., 2022). Perbedaan ekstraksi DNA menggunakan NaOH dan kit komersial dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Perbedaan Ekstraksi NaOH dan Kit Komersial

Aspek Perbandingan	Metode NaOH	Metode Kit Komersial
Kelebihan	Kualitas dan kuantitas yang baik serta memiliki kelebihan berupa mudah, cepat, murah, dan ramah lingkungan (Ghina dkk., 2018).	Kemurnian yang dimiliki tinggi karena proses ekstraksi DNA lebih panjang (Ghina dkk., 2018).
Kekurangan	Kemurnian yang dimiliki lebih rendah dibandingkan <i>kit komersial</i> karena tidak ada pencucian dan pemurnian DNA dan proses presipitasi hanya dilakukan satu kali untuk memisahkan media dengan sel bakteri (Ghina dkk., 2018).	Biaya yang lebih mahal, waktu lama, dan proses pengerjaan yang lebih sulit (Ghina dkk., 2018) Hasil konsentrasi DNA yang rendah karena proses pemurnian yang lebih ketat sehingga terjadi kehilangan sebagian DNA selama proses ekstraksi (Prayogo dan Chakim, 2025).

Lanjutan Tabel 3.

Mekainsme Lisis	Dinding sel dapat dirusak jika terjadi sel kontak dengan basa kuat, sehingga dapat digunakan untuk ekstraksi DNA.	Menggunakan sistem pemurnian khusus dan larutan presipitasi protein (Ghina dkk., 2018).
Penanganan Kontaminan	Tidak adanya penambahan protein <i>precipitation solution</i> seperti yang ada pada kit komersial. Protein <i>precipitation solution</i> mampu mengendapkan senyawa protein, sehingga DNA dapat terpisah dari protein (Ghina dkk., 2018).	Menggunakan <i>protein precipitation solution</i> untuk mengendapkan protein, sehingga DNA terpisah dengan bersih (Ghina dkk., 2018).
Gram Negatif	Efisiensi lisis tinggi karena peptidoglikan tipis dan tidak memerlukan tambahan enzim seperti lisozim (Belinda dkk., 2021)	Lisis terjadi cepat dengan bantuan lisis <i>buffer</i> yang ada dalam kit (Belinda dkk., 2021)

I. Optimasi PCR Multipleks

PCR multipleks merupakan metode pemeriksaan molekuler dengan amplifikasi lebih dari satu sekuen gen target dalam satu tabung reaksi PCR. Keunggulan metode ini adalah adanya kontrol internal dari amplifikasi beberapa fragmen sekaligus. Hal tersebut berfungsi untuk mengetahui adanya hasil negatif palsu. Reaksi negatif atau gagal jika seluruh produk tidak tampak pada visualisasi. Hasil negatif palsu dikatakan jika hanya satu atau beberapa produk saja dari seluruh fragmen yang di amplifikasi tidak tampak (Anwar dkk., 2019). Optimasi PCR multipleks dapat dilakukan dengan metode *one-run*, yaitu proses amplifikasi secara bersamaan pada masing-masing target dengan metode konvensional PCR. Metode mPCR menghindari *cross-amplified condition* (Kumalasari dkk., 2022).

J. Strategi Pengendalian Kontaminasi Patogen

Metode deteksi menggunakan *polymerase chain reaction* merupakan metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi kontaminasi dari patogen pada sampel keju tetapi hasil yang didapatkan merupakan keseluruhan dari DNA yang terdapat pada sampel sehingga bakteri yang telah mati masih dapat terdeteksi pada proses PCR. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Sunarno dkk. (2013), yaitu bakteri mati yang masih memiliki DNA masih dapat terdeteksi. Teori tersebut didukung oleh pernyataan Kurniawati dkk. (2022), yaitu meskipun PCR dapat mendeteksi sel mati dan sel hidup yang tidak dapat dikultur tetapi tetap menjadi pertimbangan bahwa sampel yang diteliti sudah terkontaminasi bakteri yang masih hidup sebelum dilakukan berbagai proses yang dapat menurunkan konsentrasi kontaminasi bakteri patogen.

Strategi yang dapat digunakan untuk mencegah terjadinya kontaminasi adalah meningkatkan kualitas susu mentah yang dapat dilakukan dengan meningkatkan higienitas dari proses pemerahan susu hingga proses pengolahan keju. Penanganan dari segi pengolahan keju dapat memastikan proses pengolahan sesuai untuk mengaktivasi patogen dan pengendalian biofilm dengan sanitasi rutin. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Ndraha dkk. (2026), yaitu pengolahan keju harus memastikan pH yang dimiliki keju sesuai untuk menciptakan lingkungan asam yang dapat menginaktivasi bakteri patogen serta pengendalian biofilm dengan sanitasi rutin pada peralatan yang digunakan sehingga tidak mengontaminasi keju secara berulang.

K. Hipotesis

1. Patogen *S. aureus* dan *L.monocytogenes* diprediksi dapat ditemukan sebagai kontaminan di keju artisan di PT X dan keberadaannya dapat dideteksi hingga konsentrasi 10^2 hingga 10^3 CFU/mL dengan prevalensi .
2. Metode amplifikasi PCR pada keju memiliki efektivitas yang tinggi untuk mendeteksi keberadaan *S. aureus* dan *L. monocytogenes* pada keju artisan dengan batas deteksi (*Limit of Detection*) mencapai 10^2 hingga 10^3 CFU/mL.

