



IDENTIFIKASI BAKTERI *Escherichia coli* PADA IKAN PELAGIS DAN DEMERSAL MENGUNAKAN METODE KULTUR DAN POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

IDENTIFICATION OF BACTERIUM *Escherichia coli* IN PELAGIC AND DEMERSAL FISH BY CULTURE AND POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) METHODS

Iftachul Farida*, Ni Putu Kumala Dewi

Program Studi Pengolahan Hasil Laut, Politeknik Kelautan dan Perikanan Jembrana,
Desa Pengambangan Kecamatan Negara, Kabupaten Jembrana, Bali, 82218, Indonesia

*Korespondensi: farida.iftachul89@gmail.com (I Farida)

Diterima 4 Januari 2023 – Disetujui 29 Agustus 2024

ABSTRAK. Ikan merupakan komoditas yang mudah dan cepat membusuk (*high perishable food*), maka dari itu semenjak ditangkap dari laut memerlukan penanganan yang cepat, bersih, cermat dan dingin (*quick, clean, careful and cool*) agar pada saat didistribusikan atau dipasarkan ke konsumen ikan dalam keadaan segar serta terjaga mutunya. Banyaknya ikan pelagis dan ikan demersal yang diekspor ke mancanegara mengharuskan ikan yang di ekspor tersebut diuji kandungannya terutama cemaran mikroba, salah satunya adalah cemaran bakteri *Escherichia coli*. Tujuan dari penelitian ini untuk mengidentifikasi bakteri *Escherichia coli* pada ikan Pelagis dan Demersal dengan metode kultur dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Identifikasi bakteri *E. coli* menggunakan dua metode yaitu metode kultur dan PCR menggunakan primer gen *lacZ*. Hasil didapatkan bahwa penggunaan metode pengujian kultur dan PCR dalam mengidentifikasi bakteri *E. coli* pada ikan demersal dan pelagis menunjukkan hasil yang sama yaitu sebanyak 7 (47%) sampel positif mengandung cemaran *E. coli* dengan kode sampel yang sama dan melebihi batas cemaran bakteri *E. coli* menurut SNI 2729:2013 tentang ikan segar yaitu <3 APM/g.

KATA KUNCI: Cemaran, gen *lacZ*, mikroba.

ABSTRACT. Fish is a commodity that easily and quickly decomposes (*high perishable food*), therefore, since being caught from the sea, it requires fast, clean, careful and cool handling so that when it is distributed or marketed to fish consumers in fresh condition and maintained quality. The large number of pelagic fish and demersal fish exported to foreign countries requires that the exported fish be tested for its content, especially for microbial contamination, one of which is *Escherichia coli* contamination. The purpose of this study was to identify *Escherichia coli* bacteria in Pelagic and Demersal fish using culture and *Polymerase Chain Reaction* (PCR) methods. Identification of *E. coli* bacteria used two methods, namely the culture method and PCR using the *lacZ* gene primer. The results showed that the use of culture and PCR testing methods in identifying *E. coli* bacteria in demersal and pelagic fish showed the same results, namely 7 (47%) positive samples containing *E. coli* contamination with the same sample code and exceeding the limit for bacterial *E. coli* contamination according to SNI 2729:2013 regarding fresh fish, namely <3 APM/g.

KEYWORDS: Contamination, *lacZ* gene, microbes.

1. Pendahuluan

Ikan merupakan komoditas yang mudah dan cepat membusuk (*high perishable food*), maka dari itu semenjak ditangkap dari laut memerlukan penanganan yang cepat, bersih, cermat dan dingin (*quick, clean, careful and cool*) agar pada saat didistribusikan atau dipasarkan ke konsumen ikan dalam keadaan segar dan terjaga mutunya. Kesegaran ikan merupakan suatu hal yang sangat penting untuk diperhatikan guna menentukan mutu dan harganya. Secara umum, setiap jenis ikan memiliki pola dan kecenderungan yang berbeda setiap spesiesnya dalam hal penurunan mutu ikan. Penurunan mutu tersebut biasanya dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu jenis dan kondisi biologis ikan, proses kematian, waktu, cara penanganan, dan fasilitas yang digunakan dalam penanganan ikan (Metusalach *et al.*, 2014).

Proses karantina ikan sangat penting dilakukan untuk menjaga keamanan pangan serta mencegah timbulnya penyakit pada manusia akibat mengonsumsi ikan maupun berbagai macam hasil olahan dari produk perikanan (Christanti *et al.*, 2019). Salah satu cara untuk mempertahankan mutu dari produk perikanan yaitu dengan melakukan pengujian pada produk perikanan. Hal tersebut penting dilakukan untuk mengawasi kualitas produk perikanan sehingga dapat memberikan jaminan keamanan pangan bagi konsumen/masyarakat (FAO, 2014).

Uji mikrobiologi adalah salah satu pengujian yang menggunakan perubahan sifat mikroba terhadap lingkungan sebagai tolak ukurnya. Pengujian mikrobiologi ditujukan untuk produk perikanan yang telah terkontaminasi bakteri patogen, salah satunya ialah *E. coli*. Menurut Ummamie *et al.*, (2017), bakteri yang dapat menjadi penyebab infeksi salah satunya adalah *E. coli*. Bakteri ini mudah menyebar dengan mencemari air dan mengkontaminasi bahan yang bersentuhan dengannya. *E. coli* menyebabkan gangguan pencernaan serta mengganggu sistem kerja dari organ lambung.

Pada persyaratan mutu ikan segar yang diuji sesuai dengan SNI 01.2729.2.2006 tentang ikan segar (BSN, 2006) yaitu ikan harus bersih, bebas dari setiap bau yang menandakan pembusukan, bebas dari tanda dekomposisi dan pemalsuan, bebas dari sifat – sifat alamiah lain yang dapat menurunkan mutu serta tidak membahayakan kesehatan. Secara organoleptik kenampakan mata cerah dan cemerlang, bau segar, serta tekstur elastis, padat dan kompak.

Banyaknya ikan pelagis dan ikan demersal yang diekspor ke mancanegara mengharuskan ikan yang di ekspor tersebut diuji kandungannya terutama cemaran mikroba, salah satunya adalah cemaran bakteri *Escherichia coli*. Umumnya bakteri *E. coli* akan tumbuh pada ikan yang penanganannya kurang higienis, seperti air dan es yang digunakan untuk pencucian tidak bersih atau sudah terkontaminasi bakteri *E. coli* sebelumnya. Oleh sebab itu perlu dilakukan uji mikrobiologi untuk mengidentifikasi adanya bakteri *E. coli* pada ikan pelagis dan demersal terutama pada ikan yang akan di ekspor.

Identifikasi *E.coli* dapat dilakukan menggunakan beberapa metode, yaitu menggunakan uji *Most Probable Number* (MPN), *Petrifilm*, dan metode teknik agar sebar. Namun masih belum ada penelitian yang menggunakan media kultur dan PCR untuk mengidentifikasi bakteri *E.coli* pada produk perikanan. Berdasarkan latar belakang tersebut maka dilakukan pengujian bakteri *E.coli* pada ikan segar jenis pelagis dan demersal menggunakan metode kultur dan PCR.

2. Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama bulan November sampai Januari 2022. Identifikasi *E. coli* menggunakan metode kultur dan PCR yang dilaksanakan di BKIPM Denpasar, Bali.

2.1. Alat dan Bahan

Sampel yang digunakan terdiri dari ikan pelagis dan demersal dalam bentuk beku dan segar. Sampel tersebut didapatkan dari beberapa perusahaan perikanan di wilayah Bali yang menguji mutu mikrobiologi di BKIPM Denpasar, primer yang digunakan untuk mendeteksi bakteri *E. coli* menggunakan target gen *lacZ* yang menghasilkan 875 bp produk PCR sesuai yang dilaporkan oleh (Molina *et al.*, 2015) yaitu ZL-1675 (5'-ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC-3') dan ZR-2548 (5'-CACCATG CCGTGGGTTT CAATATT-3'), *nuclease free water*, *agarose*, *gel red*, *TAE Buffer*, *aquades*, dan alkohol.

2.2. Pengujian Media Kultur (SNI 01-2332.1-2015)

Coliform merupakan golongan bakteri yang merupakan campuran antara bakteri fekal dan bakteri non fekal. *E. coli* termasuk dalam bakteri coliform fekal. Media yang digunakan pada proses pengujian *E. coli* yaitu *Lauryl Tryptose Broth* (LTB) dan *Butterfield's Phosphate Buffer* (BFP). Pembuatan media pengujian *Lauryl Tryptose Broth* (LTB) dilakukan dengan menimbang bahan media *Lauryl Tryptose Broth* dan menambahkan *aquades* yang dimasukkan kedalam erlenmeyer selanjutnya ditutup dengan aluminium

foil lalu dihomogenkan menggunakan hot plate magnetic, setelah homogen dimasukkan kedalam tabung reaksi 9 ml yang berisi tabung *Durham* lalu disterilkan didalam autoclave selama 15 menit dengan suhu 121°C, begitu pula dengan pembuatan media *Butterfield's Phosphate Buffer* (BFP) yaitu dengan mencampurkan BFP stock dengan aquades yang dimasukkan kedalam labu Erlenmeyer selanjutnya ditutup dengan alumunium foil lalu dihomogenkan.

2.3. Pengujian Bakteri *E. coli* Menggunakan Teknik PCR

Sampel produk perikanan yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 15 sampel yang terdiri dari ikan pelagis dan demersal. Sampel ikan yang masuk ke BKIPM Denpasar berasal dari beberapa wilayah di sekitar Bali, yaitu Badung, Denpasar, Gianyar, Tabanan, dan Jembrana. Sampel yang masuk ke BKIPM Denpasar diambil dari kegiatan surveilen (pemantauan) yang terdiri dari tiga grade, yaitu grade A, B, dan C dengan berat minimal 250 gram.

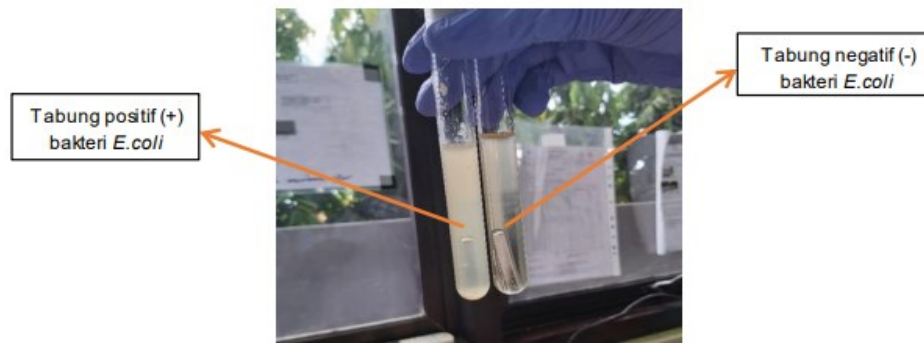
Persiapan dan perlakuan sampel pada amplifikasi PCR untuk *E. coli* mengacu pada metode SNI 2332.1:2015 dengan menggunakan media pengkayaan *Lauryl Sulfate Broth* (LTB) yang dilanjutkan dengan isolasi pada media L-EMBA. Koloni bakteri berbentuk bulat berwarna hijau metalik pada media L-EMBA terindikasi sebagai bakteri *E. coli*. Hasil tersebut dilanjutkan dengan pengujian ekstraksi DNA dan amplifikasi menggunakan PCR.

Bakteri yang digunakan sebagai kontrol positif merupakan bakteri target pengujian dan bakteri lainnya sebagai non-target pengujian yang dimiliki oleh Balai KIPM Denpasar. Pengembangbiakan bakteri dilakukan pada media BFP dan LTB dengan pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} . Koleksi bakteri tersebut diinkubasi selama 48 jam pada suhu 36°C. Stok bakteri dilakukan ekstraksi DNA dengan mengacu pada metode dari (Sahu *et al.*, 2019) dengan modifikasi yaitu 500 µL stok bakteri dimasukkan pada microtube 1,5 mL dan disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 15.000× rpm menggunakan alat sentrifugasi dingin (Cleaver Scientific Ltd., UK). Kemudian supernatan dibuang dan ditambahkan 200 µL *Nuclease-free water* (NFW; Qiagen, Germany) pada *microtube* dan dilakukan vortex. Proses dilanjutkan pemanasan bakteri pada *thermoblock* (Labnet, China) dengan suhu 95 °C selama 6 menit.

Sampel positif *E. coli* yang telah di ekstraksi kemudian di amplifikasi, selama 1 jam 34 menit untuk memperpanjang rantai DNA dengan cara membuat *master mix* sampel kontrol positif dan negatif, kemudian sebanyak 2 µl dari sampel dimasukkan dalam master mix 0,2 ml. Selanjutnya tahap elektroforesis diawali dengan pembuatan agar, lalu masukkan sampel ke dalam *well* yang terdapat marker, kontrol positif dan negatif, kemudian di elektroforesis dengan Voltase 100 Volt selama 25 menit. Langkah akhir dari metode pengujian bakteri *Escherichia coli* yaitu pembacaan hasil elektroforesis dengan alat UV Transilluminator.

3. Hasil dan Pembahasan

Dalam pemeriksaan bakteri *E.coli* menggunakan metode MPN dilakukan uji pendugaan (*presumptive test*) dan uji penegasan (*confirmative test*). Media pada tabung yang digunakan adalah *Butterfield's Phosphate Buffered* (BFB) dan LTB. Pada media BFB umumnya digunakan untuk pengkayaan dan pengenceran dalam pengujian mikrobiologi bakteri *E. coli* (Hermawan, 2018), sedangkan media LTB digunakan dengan tujuan untuk menumbuhkan bakteri pada setiap tabung reaksi karena mengandung *tryptose*, *lactose*, *sodium*, *lauryl sulfate* dan akuades (BSN 2006). Hasil positif ditunjukkan dengan tabung reaksi dalam kondisi keruh dan terdapat gas pada tabung *Durham*, sedangkan tabung dengan kondisi yang jernih dan tidak terdapat gas pada tabung *durham* menunjukkan hasil negatif (**Gambar 1**).



Gambar 1. Sampel Positif Bakteri *E. coli* pada Media LTB Ditunjukkan Dengan Tabung Kondisi yang Keruh dan Terdapat Gas pada Tabung *Durham* sedangkan Sampel Negatif Ditunjukkan Dengan Tabung Kondisi Yang Jernih dan Tidak Terdapat Gas pada Tabung *Durham*.

Tahap berikutnya perhitungan terhadap tabung-tabung yang positif diduga bakteri *E. coli*. **Tabel 1** menunjukkan bahwa enumerasi bakteri *coliform* terutama *E. coli*. Tabel tersebut menunjukkan bahwa nilai tertinggi pada sampel 723 DFS dengan jenis ikan demersal yaitu sebesar 11 APM/g dan memiliki nilai terendah yaitu < 3,0 APM/g pada sampel 706 PGS, 707 DFF, 708 PGF, 715 DFS, 723 DFF, 723 PGF, 723 PGS, dan 722 PGF.

Tabel 1. Hasil Enumerasi Uji Penduga Bakteri *coliform* Terutama *E. Coli*.

Kode Produk	Jenis Ikan	APM/g	Keterangan
706 PGF	Ikan Pelagis Beku	< 3,0	Negatif
707 DFF	Ikan Demersal Beku	< 3,0	Negatif
708 PGF	Ikan Pelagis Beku	< 3,0	Negatif
708 DFF	Ikan Demersal Beku	3,6	Positif
714 PGF	Ikan Pelagis Beku	3,0	Positif
715 DFS	Ikan Demersal Segar	< 3,0	Negatif
715 PGS	Ikan pelagis Segar	3,6	Positif
718 DFF	Ikan demersal Beku	3,0	Positif
721 PGF	Ikan pelagis Beku	6,1	Positif
723 DFF	Ikan demersal Beku	< 3,0	Negatif
723 DFS	Ikan demersal Segar	11	Positif
723 PGF	Ikan pelagis beku	< 3,0	Negatif
723 PGS	Ikan pelagis segar	< 3,0	Negatif
724 DFF	ika demersal beku	3,6	Positif
722 PGF	Ikan pelagis beku	< 3,0	Negatif

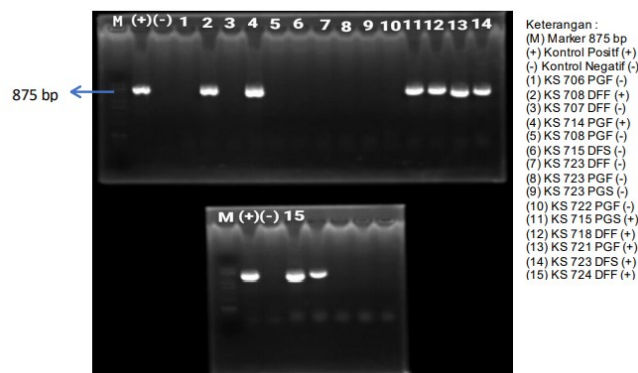
Pada beberapa biakan positif pada uji penduga bakteri *coliform* diambil satu ose dan diinokulasikan pada media L-EMBA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Karakteristik koloni bakteri yang berbentuk bulat dan berwarna hijau metalik menandakan keberadaan bakteri *E. coli*. Hasil uji pada media selektif L-EMBA dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 2. Hasil isolasi koloni bakteri pada media L-EMBA yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam berwarna hijau metalik yang terindikasi sebagai bakteri *E. Coli*.

3.1.1. Hasil Pengujian Bakteri *E. coli* Menggunakan Teknik PCR

Selama periode November – Januari 2022 didapatkan 15 sampel produk perikanan yang terdiri dari ikan pelagis dan demersal dalam bentuk segar dan beku. Setiap sampel tersebut dikultur dan diekstraksi kemudian diamplifikasi menggunakan mesin PCR. Primer yang digunakan adalah primer *E.coli* LacZ untuk mendeteksi keberadaan bakteri *E.coli*. Sampel yang positif dicurigai sebagai bakteri *E. coli* kemudian dilakukan uji PCR untuk menegaskan bahwa koloni yang tumbuh merupakan bakteri *E. coli*. Hasil uji PCR memperlihatkan pita fragmen DNA dengan ukuran 875 bp yang menunjukkan pada sampel ikan terdapat bakteri *E. coli*, sedangkan sampel yang tidak menunjukkan pita fragmen DNA menunjukkan bahwa tidak ditemukan bakteri *E. coli*. Dari 15 sampel ikan yang terdiri dari 8 ekor ikan pelagis dan 7 ekor ikan demersal dalam penelitian ini sebanyak 7 (47%) sampel positif mengandung cemaran bakteri *E. coli*. Hasil pengujian sampel ikan menggunakan teknik PCR dapat dilihat pada **Gambar 3** berikut ini.



Gambar 3. Hasil Amplifikasi Sampel Ikan Demersal dan Pelagis Tampak Pita Pada Posisi 875 bp Menggunakan Teknik PCR; M= Marker; Kontrol Positif, Kontrol Negatif; 1-15 = Sampel Ikan; 2, 4, 11, 12, 13, 14, dan 15 Sampel Positif Mengandung Cemaran Bakteri *E. Coli*.

Sebanyak 7 sampel positif *E.coli* dengan kode 708 DFF, 714 PGF, 715 PGS, 718 DFF, 721 PGF, 723 DFS, dan 724 DFF. Penelitian yang dilakukan Bakri *et al.*, (2015) melaporkan terdapat perbedaan hasil antara metode kultur dan PCR dalam mendeteksi keberadaan bakteri *E. coli* O157:H7. Teknik PCR memiliki tingkat sensitivitas 100% dan spesifitasnya 78%.

Berdasarkan **Tabel 1** diantara 15 sampel ikan yang terdiri dari ikan demersal dan pelagis yang telah diuji, terdapat 7 sampel yang melebihi batas cemaran bakteri *E. coli* menurut SNI 2729:2013 tentang ikan segar yaitu <3 APM/g. Beberapa faktor dapat mempengaruhi kontaminasi bakteri *E. coli* diantaranya faktor higienitas dan sanitasi lingkungan sangat berpengaruh dalam pemindahan bakteri *E.*

coli ke tubuh manusia, kebiasaan mengonsumsi makanan yang higienitasnya rendah atau dengan sanitasi lingkungan yang kurang baik (Buktiwetan *et al.*, 2001). Faktor lain yang dianggap berperan adalah konsumsi produk hewani menjadi sumber kontaminasi bakteri *E. coli* seperti penggunaan produk hewani yang tidak dimasak dengan prosedur yang benar sehingga dapat meningkatkan kontaminasi dan berakhir dengan peningkatan resiko infeksi (Buktiwetan *et al.*, 2001; Brooks *et al.*, 2010).

Prinsip penentuan angka bakteri coliform adalah bahwa adanya pertumbuhan bakteri coliform yang ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung Durham setelah diinkubasi pada media yang sesuai. Media kultur LTB mengandung laktosa yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri non enterik dan menumbuhkan bakteri enterik sebagai dasar kemampuannya untuk memfermentasi laktosa menjadi asam dan gas. Oleh sebab itu hasil uji yang positif ditunjukkan dengan pembentukan gas yang terdapat pada tabung durham (Bambang *et al.*, 2014).

Penggunaan primer *lacZ* dari strain *E. coli* juga dilakukan untuk mendeteksi secara spesifik bakteri *E. coli* berdasarkan karakteristik yang dimiliki bakteri *E. coli* dengan menghasilkan enzim β -Galactosidase yang dapat mereaksikan laktosa di dalam tubuh manusia (Zhang *et al.*, 2012) oleh bakteri usus (Isfahani *et al.*, 2017). Target gen *lacZ* memberikan efisiensi yang baik dalam mendeteksi bakteri *E. coli* dan coliform (Molina *et al.*, 2015). Target gen lain yang digunakan untuk mendeteksi *E. coli* yaitu *stx1*, *stx2*, *bfpA*, *eae*, *lt*, *st*, *ial* dan *ipaH* hanya mengkhusus untuk mendeteksi strain *E. coli* yang memiliki patogenitas (Fialho *et al.*, 2013). Berdasarkan kondisi tersebut primer yang digunakan untuk mendeteksi target gen *lacZ* digunakan dalam penelitian ini untuk mendeteksi keberadaan bakteri *E. coli* secara spesifik (Nur Hasanah *et al.*, 2022).

4. Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan metode pengujian kultur dan PCR dalam mengidentifikasi bakteri *E. coli* pada ikan demersal dan pelagis menunjukkan hasil yang sama. Sebanyak 7 (47%) sampel positif mengandung cemaran *E. coli* dengan kode sampel yang sama. dan melebihi batas cemaran bakteri *E. coli* menurut SNI 2729:2013 tentang ikan segar yaitu <3 APM/g.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Politeknik Kelautan dan Perikanan Jember yang telah membantu dalam proses penelitian ini. Selain itu, penulis juga mengucapkan terima kasih kepada BKIPM Denpasar yang telah menyediakan fasilitas dalam penelitian ini dan pengambilan data.

Daftar Pustaka

- Bambang, A.G., Fatimawali., Novel S.K., (2014) Analisis cemaran bakteri coliform dan identifikasi *Escherichia coli* pada air isi ulang dari depot di kota Manado. *Pharmakon Jurnla Ilmiah Farmasi*. Vol. 3 No. 3. ISSN 2302-2493.
- [BSN] Badan Standarisasi Nasional. (2013). *SNI 2729:2013 tentang Ikan Segar*. Diterbitkan di Jakarta.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. (2006). *SNI Ikan Segar – Bagian 2: Persyaratan Bahan Baku (01-2729.2-2006)*. Jakarta. Badan Standardisasi Nasional.
- Bakri, Z., M. Hatta., Muh. N.M. (2015). Deteksi keberadaan bakteri *Escherichia coli* o157:H7 pada feses penderita diare dengan metode kultur dan PCR. *JST Kesehatan*, April 2015, Vol. 5 No. 2: 184 – 192.
- Buktiwetan P, Surjawidjaja J, Salim O, Aidilifit M, Lesmana M. (2001). Diare bakterial: etiologi dan kepekaan Antibiotika di dua Pusat Kesehatan Masyarakat di Jakarta. *Jkedokter Trisakti* 2001: 20:57-65.
- Brooks, GF., Jawetz, Melnick & Adelberg's. *Medical Microbiology 25th edition*. (2010) New York: McGraw-Hill Companies. Chapter 15.

- Christanti, S.D., Azhar, M.H. (2019). Identifikasi bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella* sp. pada produk beku perikanan di Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya II, Jawa Timur. *Journal of Aquaculture Science*. Oktober 2019 Vol 4 (2): 62-72.
- Fialho, O. B., Souza, E. M. De, Dallagassa, C. D. B., Pedrosa, D. O., Klassen, G., Irino, K., Paludo, K. S., Assis, D., Surek, M., Ara, E., Souza, M. De, Farah, S., & Fadel-picheth, C. M. T. (2013). Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli* Using a Two-System Multiplex-PCR Protocol. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 161(January), 155–161. <https://doi.org/10.1002/jcla.21578>.
- Hermawan, (2018). Uji Bakteri Fecal Coliform pada Cincau Hitam yang berada di Pasar Segiri Samarinda. [skripsi]. Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.
- Isfahani, B. N., Fazeli, H., Babaie, Z., Poursina, F., Moghim, S., & Rouzbahani, M. (2017). Evaluation of Polymerase Chain Reaction for Detecting Coliform Bacteria in Drinking Water Sources. *Advanced Biomedical Research*, 1–3. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.216783>.
- Metusalach, Kasmianti, Fahrul, Jaya I. (2014). Pengaruh Transportasi Terhadap Mutu Dan Harga Ikan Dari Pelabuhan Perikanan Pantai Lempasing Ke Daerah Konsumen. *Jurnal Albacore*, Volume 2, No 2, Juni 2018, Hal 209-219.
- Molina, F., López-acedo, E., Tabla, R., Roa, I., Gómez, A., & Rebollo, J. E. (2015). Improved detection of *Escherichia coli* and coliform bacteria by multiplex PCR. *BMC Biotechnology*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0168-2>.
- Nur Hasanah., Putu E.S., Imanuddin R., Ni Nyoman E., Wahyu A.N., Hidayati K., Ni Putu S.S.A., Ida Ayu M.M.D., (2022). Deteksi dini kontaminasi *Vibrio parahaemolyticus* dan *Escherichia coli* pada produk perikanan dengan Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Sain Veteriner*, Vol. 40 No. 2 Agustus 2022, Hal. 171-182.
- Zhang, W., Wang, C., Huang, C. Y., Yu, Q., Liu, H. C., Zhang, C. W., & Pei, X. F. (2012). Construction and Secretory Expression of β -Galactosidase Gene from *Lactobacillus Bulgaricus* in *Lactococcus Lactis*. *Biomedical and Environmental Sciences*, 25(2), 203–209. <https://doi.org/10.3967/0895-3988.2012.02.012>.

